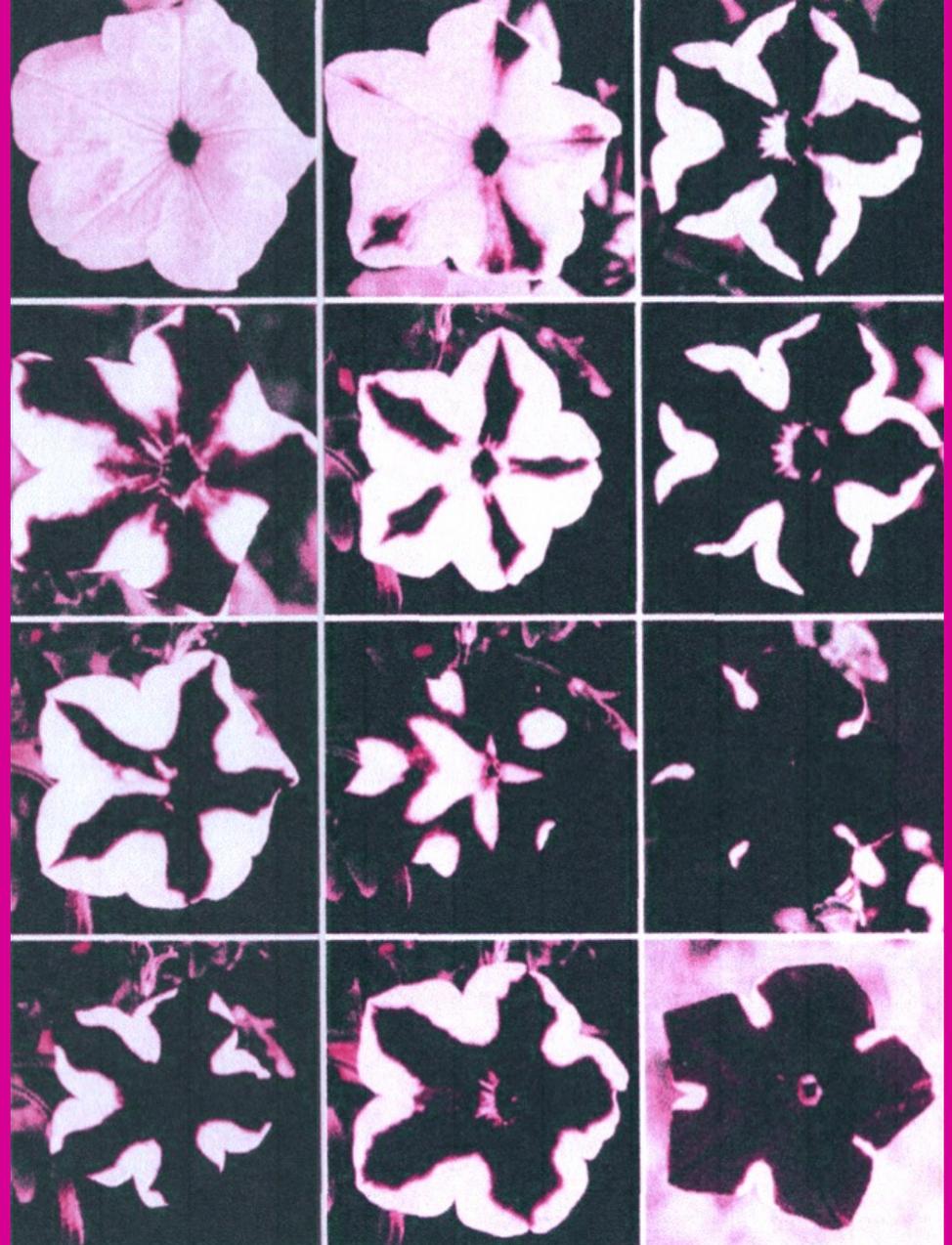


Dalla cosoppressione ai non-coding RNA





Nobel price 2006

**for their discovery of
“RNA interference – gene silencing by double-stranded RNA”**



Andrew Z. Fire

USA

Stanford University
School of Medicine
Stanford, CA, USA



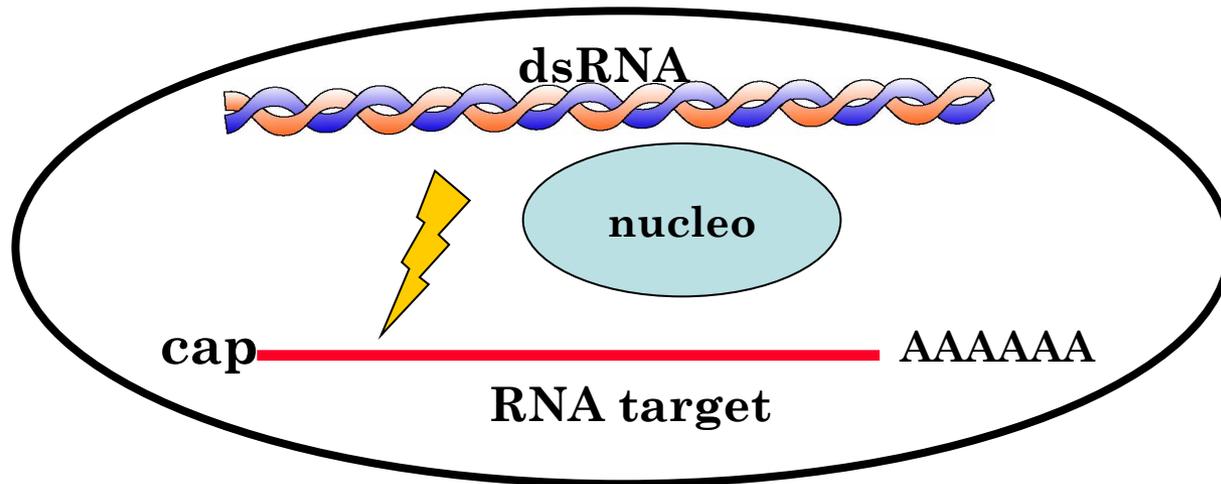
Craig C. Mello

USA

University of Massachusetts
Medical School
Worcester, MA, USA

Che cosa è l' RNA interference?

L' RNA interference (RNAi) è un processo naturale di silenziamento dell' espressione genica post-trascrizionale iniziato da RNA a doppio filamento (dsRNA) di sequenza omologa al gene target.



RNA interference

Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS)

PTGS/TGS

Virus-Induced Gene Silencing (VIGS)

Homology-Dependent Gene Silencing (HDGS)

Quelling

Co-Suppression

Cosoppressione

La sovraespressione del gene CHS (*Chalcone synthase*) in petunia porta alla perdita della pigmentazione del fiore



L' introduzione di un transgene causa **la soppressione**
sia del gene introdotto che di quello endogeno.

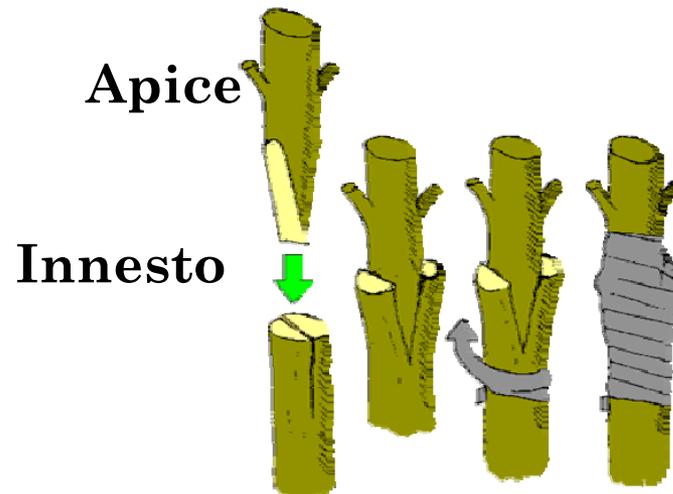
Cosuppression was first described in two similar studies of the chalcone synthase (*chs*) gene in *Petunia*. Attempts to increase gene expression by introduction of an additional copy of *chs* fused to a strong, constitutive promoter unexpectedly produced a significant number of transgenic plants displaying decreased abundance of both transgenic and endogenous *chs* mRNA, as manifested by wholly or partially white flower petals. **This silencing caused by over expression of an endogenous gene was termed cosuppression. Cosuppression is a post-transcriptional, homology-dependent process associated with siRNA accumulation.**

RdRP mediated synthesis of asRNA from a sense mRNA template, mediates production of dsRNA in the cosuppression pathway. **How specific sense mRNA species are targeted for this catalytic process is unknown**, though various models have invoked **the presence of an mRNA accumulation threshold or the production of an “aberrant RNA” molecules from highly expressed transgenes**

Un segnale mobile trasmette il silenziamento genico

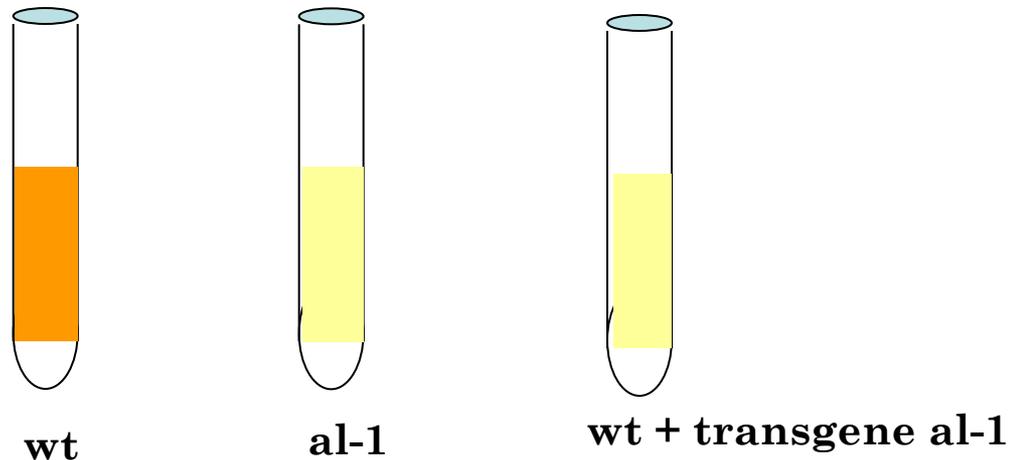
In Neurospora: il silenziamento genico puo' essere trasferito da nucleo a nucleo in ceppi eterocariotici

In piante: PTGS e' indotto in un apice che venga innestato su di una pianta silenziata



Quelling

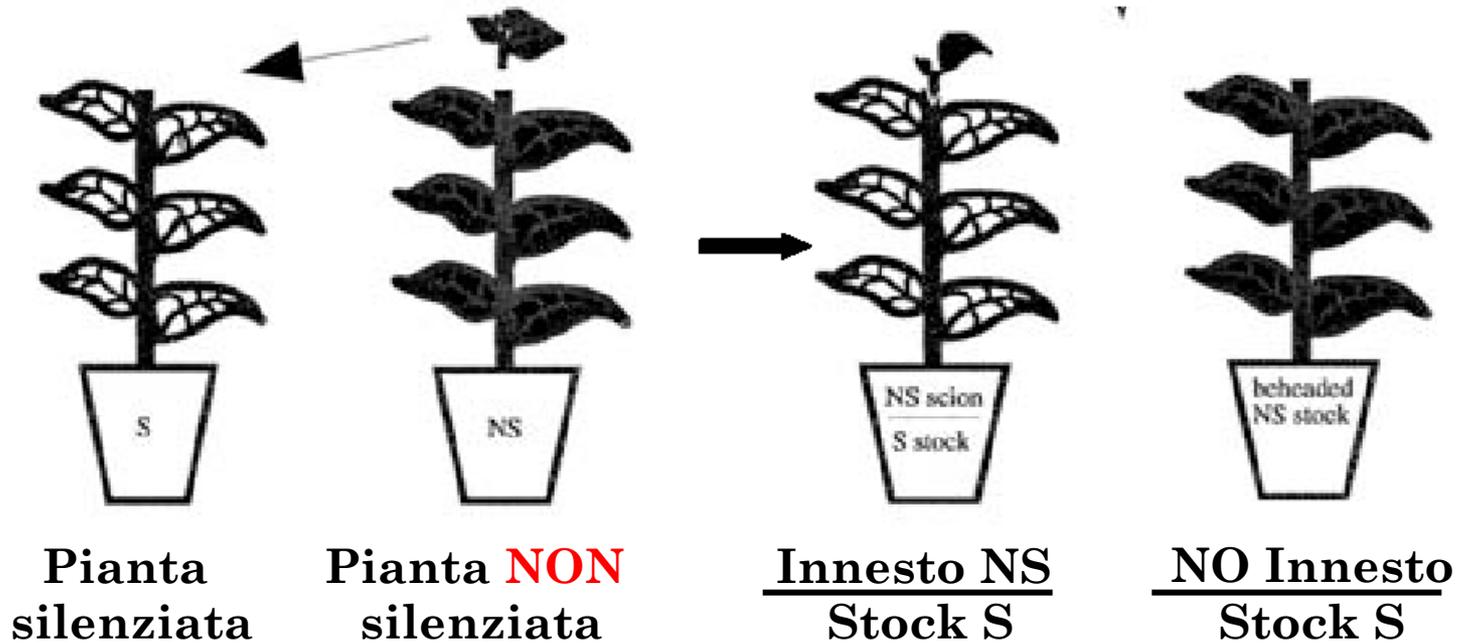
Nel fungo filamentoso *Neurospora crassa* l'introduzione di un transgene (*albino-1*) (*al-1*) causa il silenziamento del gene *albino-1* endogeno omologo codificante per un gene del pathway biosintetico di pigmenti carotenoidi.



L' introduzione di un transgene causa la soppressione sia del gene introdotto che di quello endogeno.

Un segnale mobile trasmette il silenziamento genico

Esperimenti di innesti con tabacco transgenico



Piante trasformate

35S-Nia 2 (nitrato reductase) 35S-Nii1 (nitrito reductase)

Fenotipo silenziato: clorosi delle foglie

- ✓ de novo PTGS degli innesti NS con efficienza del 100%
- ✓ La trasmissione della co-soppressione dalle piante S agli innesti NS è locus-specifico ma locus-indipendente:
 - indipendente dal transgene utilizzato
 - indipendente dal numero di copie del T-DNA
 - indipendente dalla struttura del transgene
 - indipendente dalla posizione genomica del T-DNA
- ✓ **PTGS non è indotto/causato dalla tecnica dell'innesto:**
innesti NS su piante WT non diventano S
- ✓ La trasmissione della co-soppressione è unidirezionale:
da pianta S ad innesto NS
- ✓ Il segnale di silencing è **(trans)gene-specifico**

RNA interference nei Nematodi

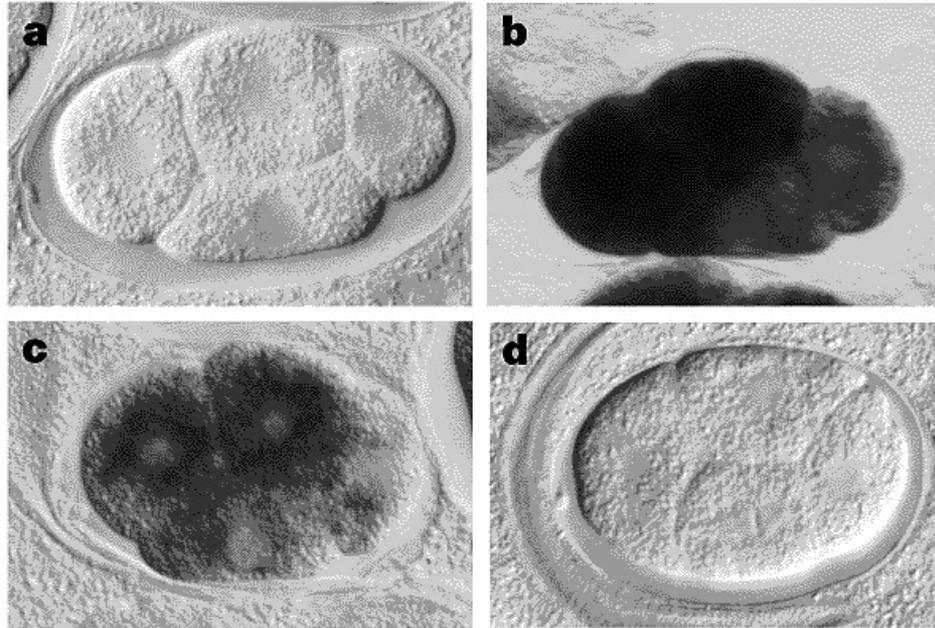
Guo e Kemphues (1995), usano RNA antisenso per studiare la funzione del gene *par-1*. Come atteso, l'iniezione dell'antisenso abolisce l'espressione di *par-1*.

Curiosamente, pero', anche l'iniezione del controllo senso abolisce l'espressione di *par-1*!!!!

Fire e Mello (1998), iniettano per primi dsRNA in *Caenorhabditis elegans* ed ottengono un silenziamento molto piu' efficace che con il solo antisenso.

RNA interference nei Nematodi

Inibizione dell'espressione di *mex3* in *C. elegans* mediante RNAi



mex-3B antisense or dsRNA was into the gonads of adult animals, fed for 24 h. 4-cell-stage embryos are shown. a, Negative control showing lack of staining in the absence of the probe. b, Embryo from uninjected parent (showing normal pattern of endogenous *mex-3* RNA). c, Embryo from a parent injected with purified *mex-3* antisense RNA. These embryos retain the *mex-3* mRNA, although levels may be somewhat less than wild type. d, Embryo from a parent injected with dsRNA corresponding to *mex-3B*; no *mex-3* RNA is detected.

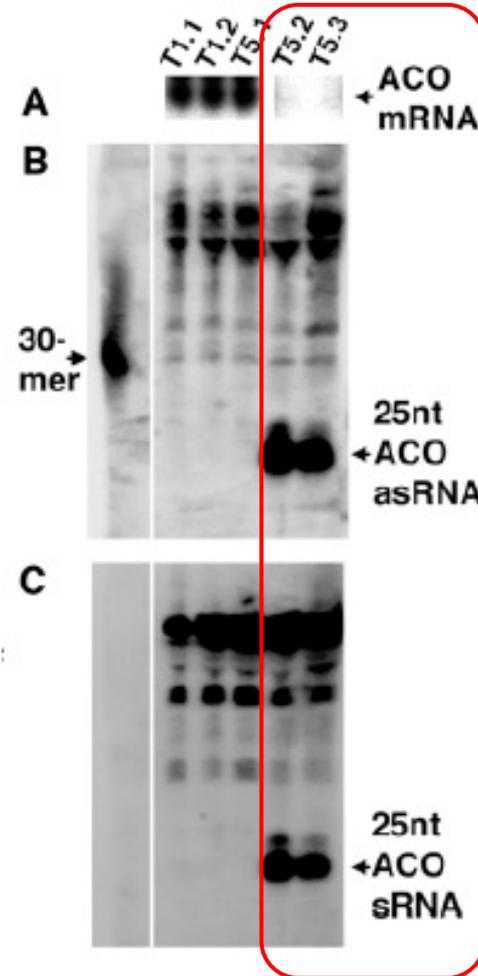
Cosuppression, PTGS, Quelling, VGS

apparivano inizialmente come processi differenti

L'identificazione in diversi organismi di mutanti difettivi in questi processi e la caratterizzazione di RNA molto piccoli ha permesso di formulare una teoria unificatrice

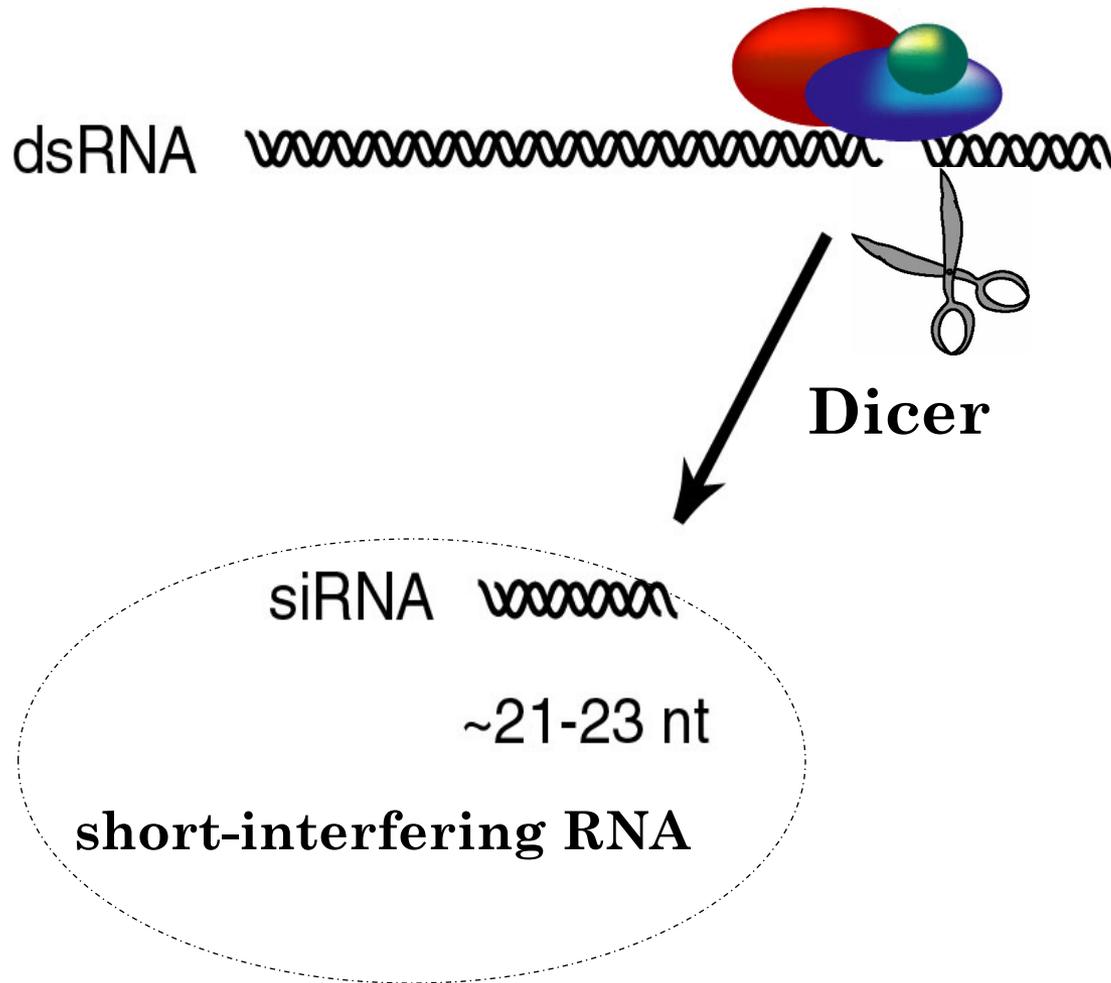
La presenza di piccoli RNA correla con l' RNA interference

- In piante in cui sta avvenendo PTGS sono presenti RNA di circa 25 nt, che sono assenti in piante non silenziate
- Questi piccoli RNA sono complementari sia al senso che all'antisenso del gene silenziato



Prima fase:

processamento del dsRNA in frammenti di 21-23 nt

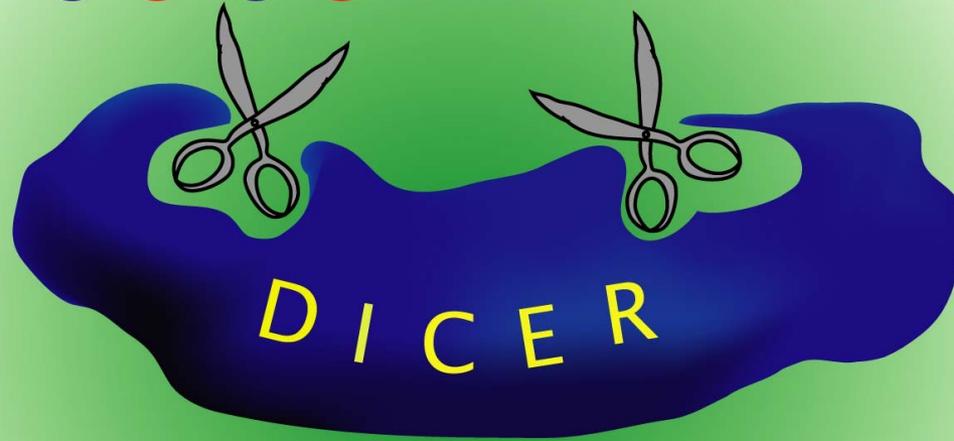


Dicer contiene due domini di tipo RNAsi III

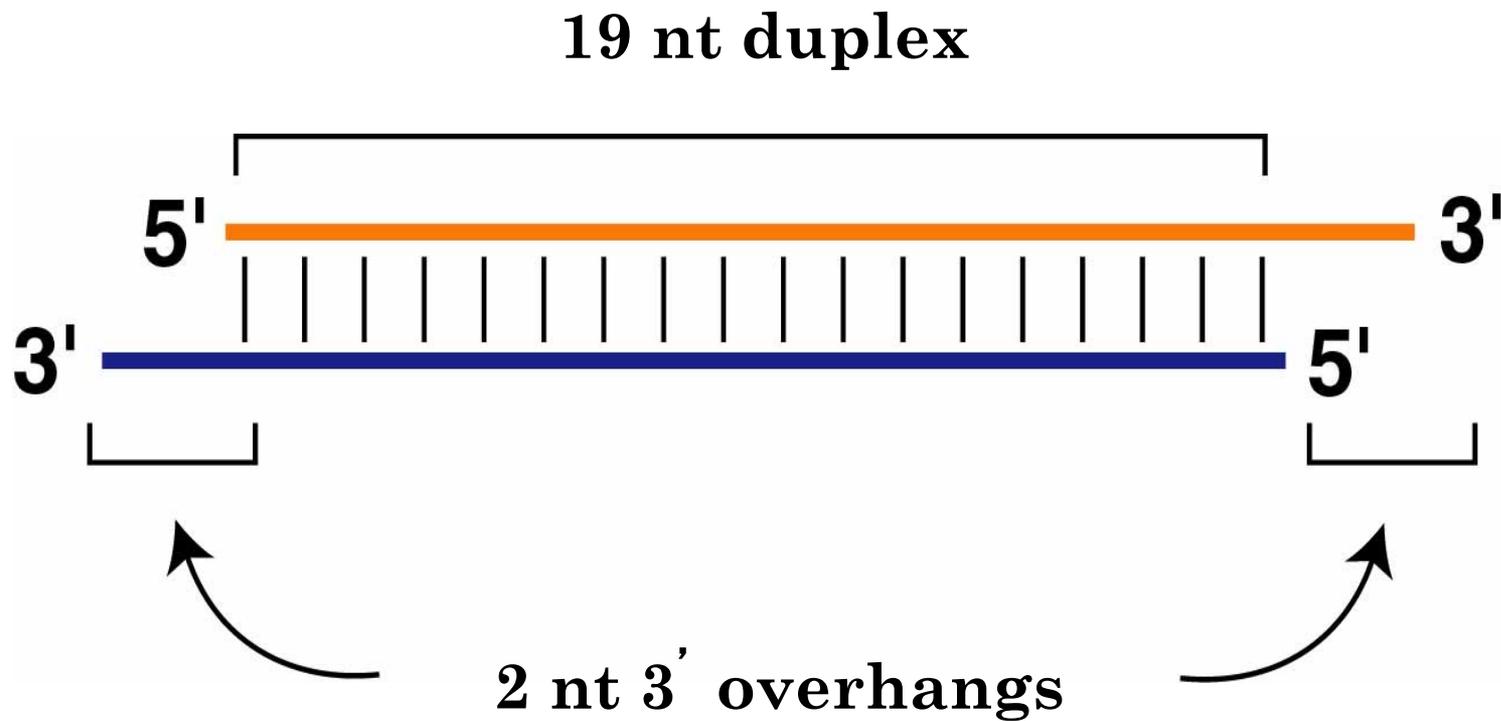
dsRNA lungo



siRNAs

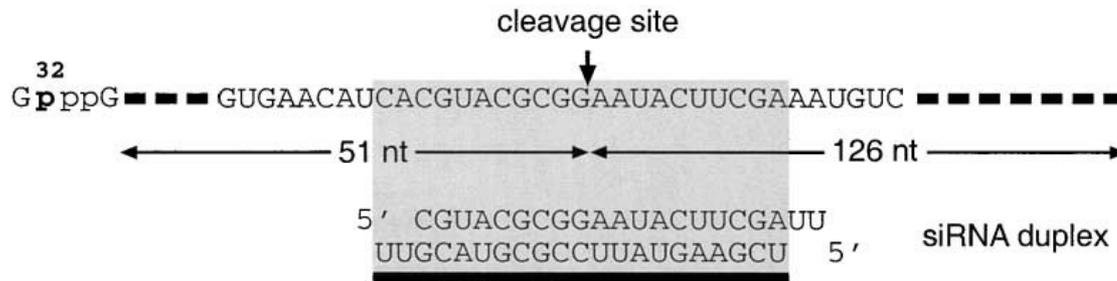


Gli siRNA hanno una struttura definita

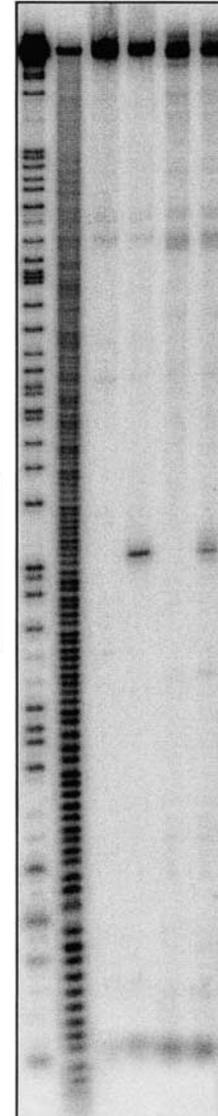


Seconda fase:

Il filamento antisenso degli siRNA guida il taglio

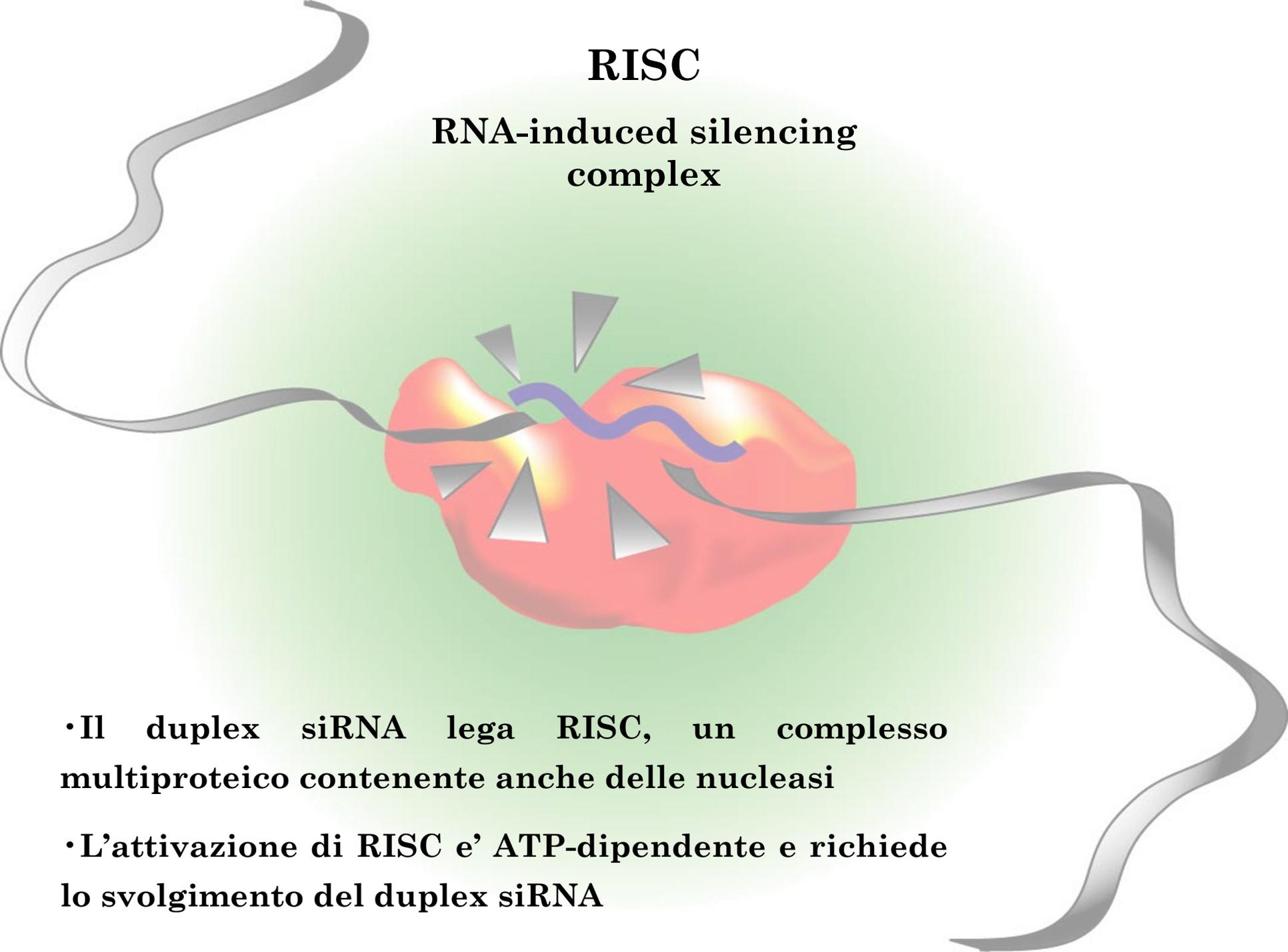


antisense siRNA

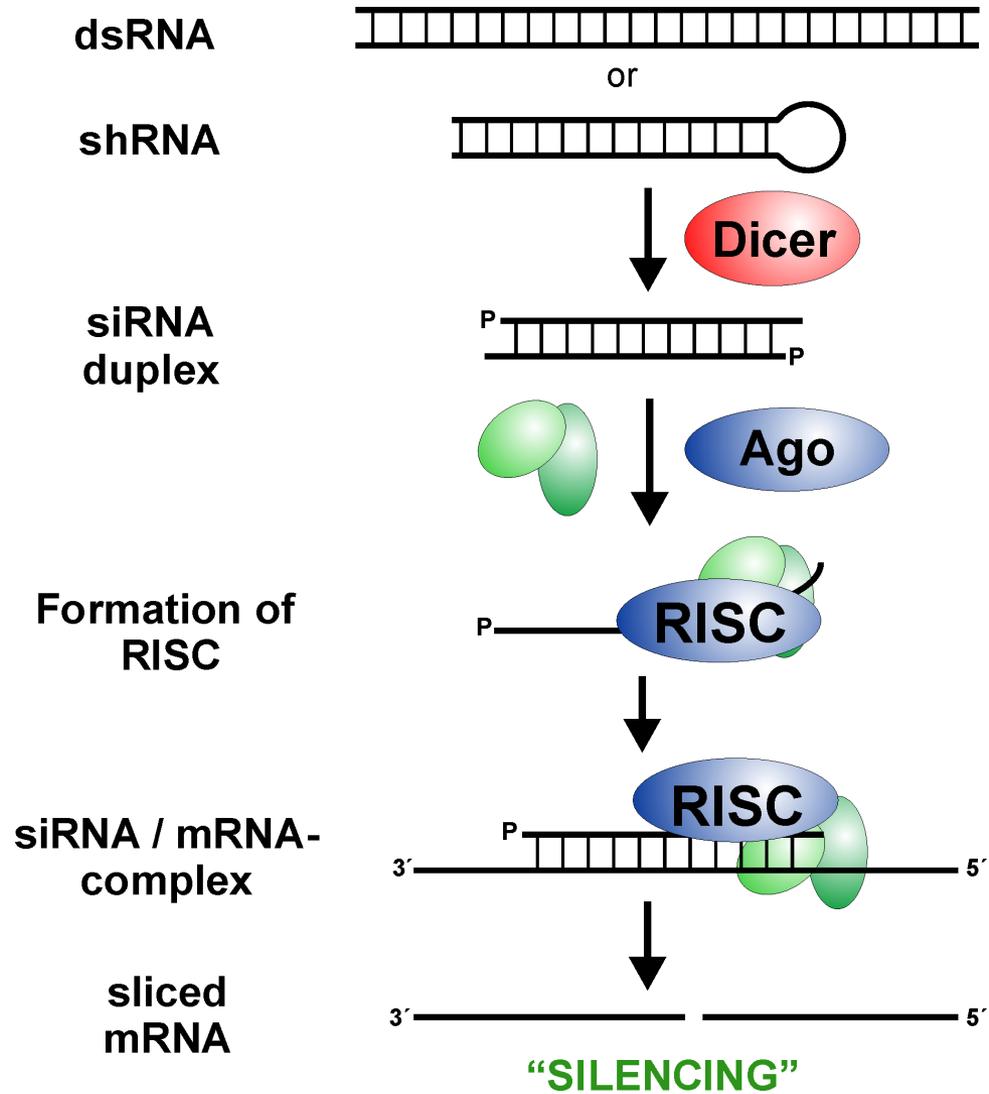


RISC

**RNA-induced silencing
complex**



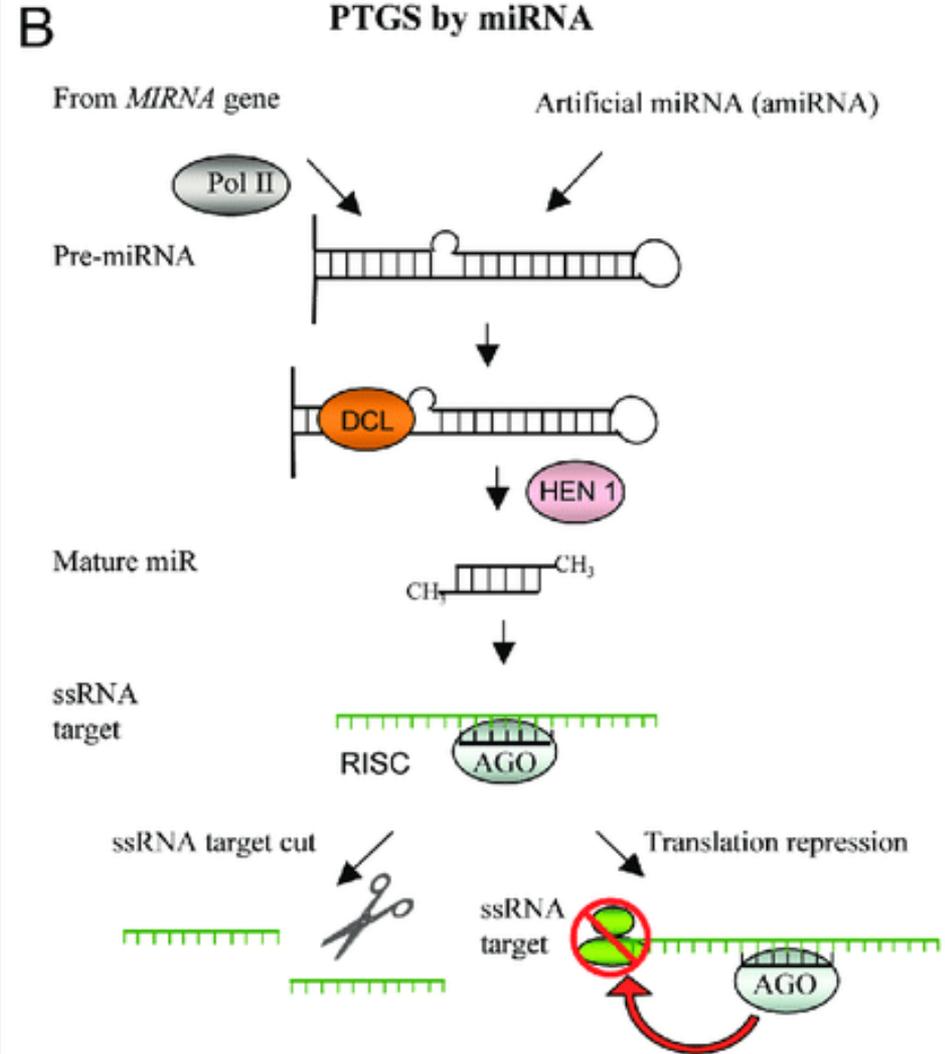
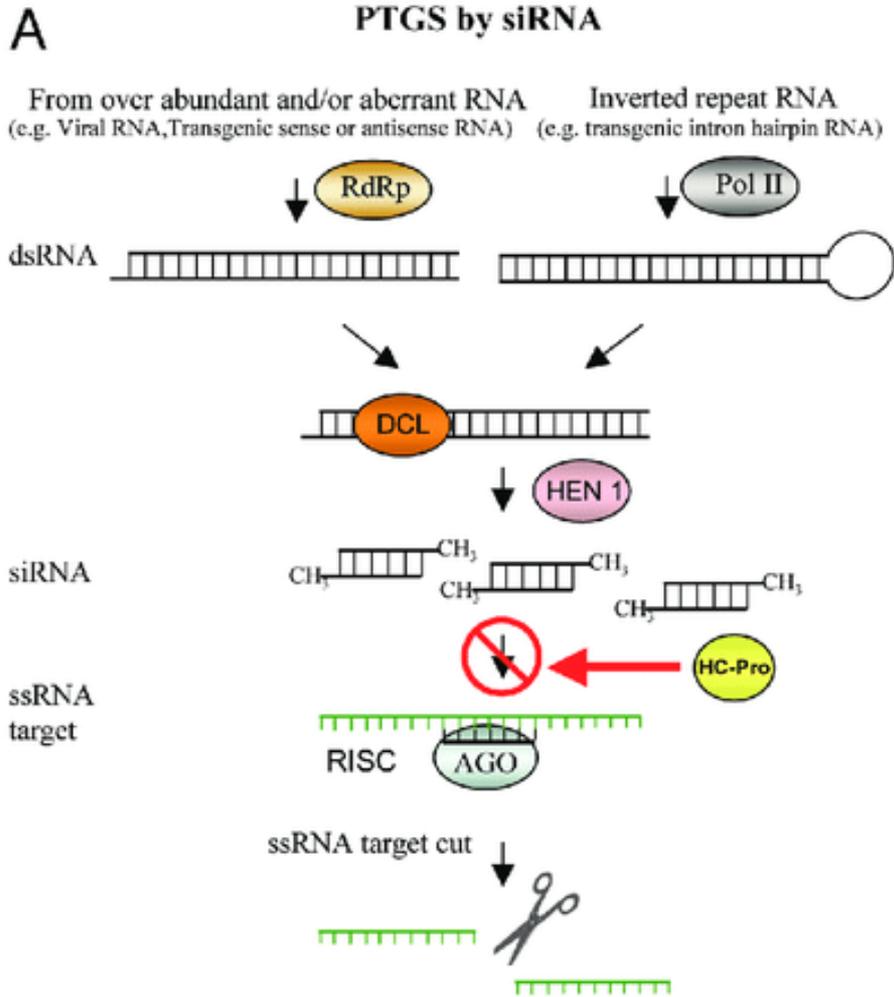
- Il duplex siRNA lega RISC, un complesso multiproteico contenente anche delle nucleasi
- L'attivazione di RISC e' ATP-dipendente e richiede lo svolgimento del duplex siRNA



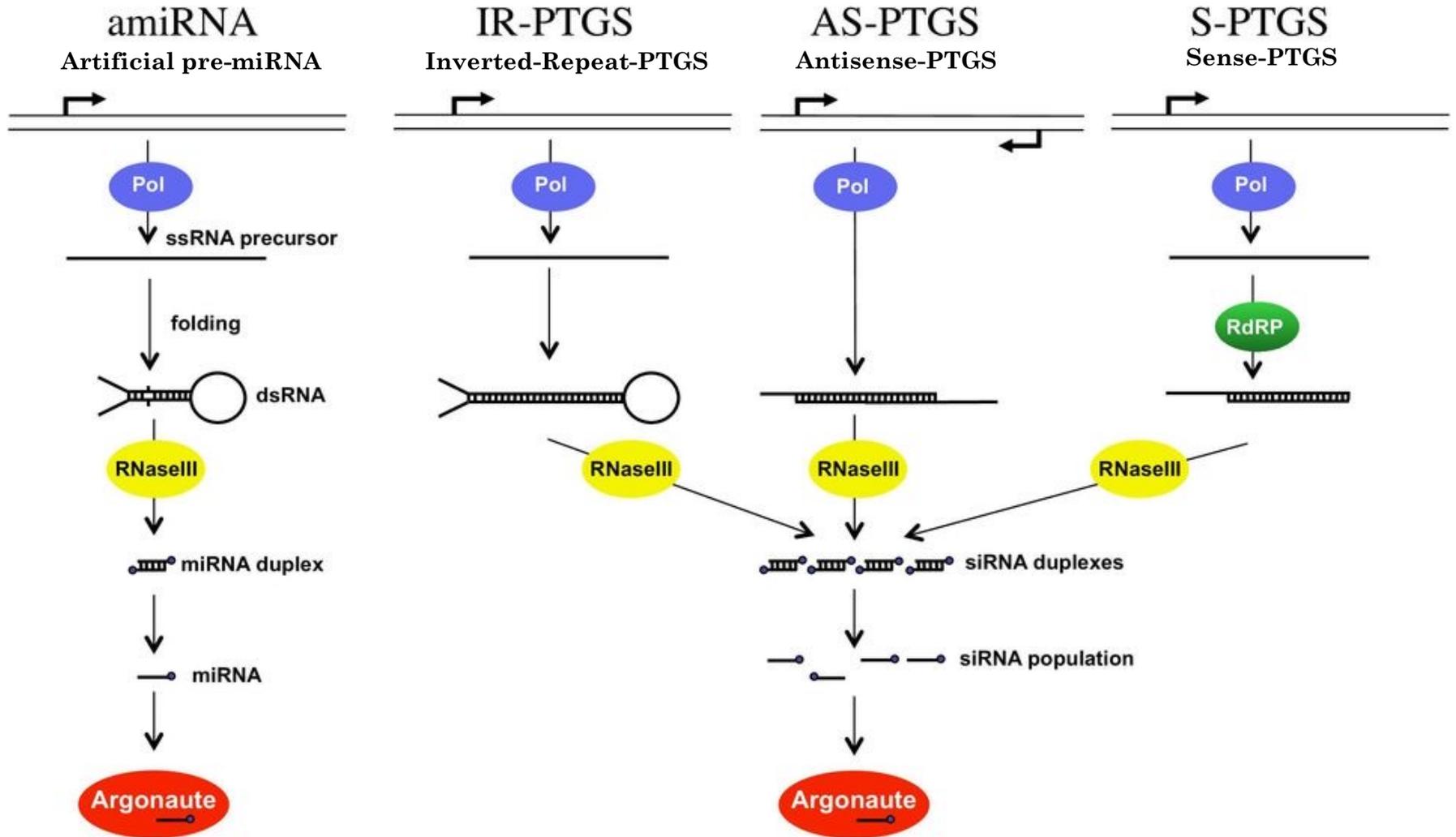
Funzioni dell'RNAi

- **Controllo di acidi nucleici parassiti esogeni (= virus)**
- **Controllo di acidi nucleici parassiti endogeni (= trasposoni)**
- **Regolazione temporale dello sviluppo mediante repressione della traduzione (e controllo della stabilita' di mRNA): miRNA**
- **Regolazione dello stato della cromatina**

Il processamento di siRNA e miRNA



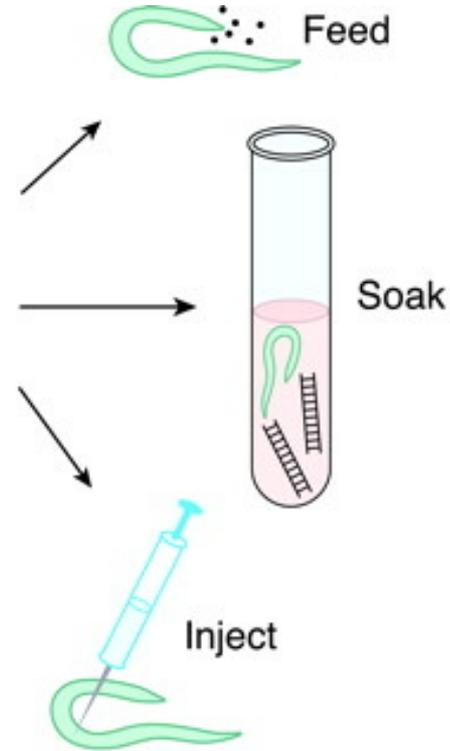
Artificial RNAi strategies based on endogenous pathways



RNA interference nei Nematodi

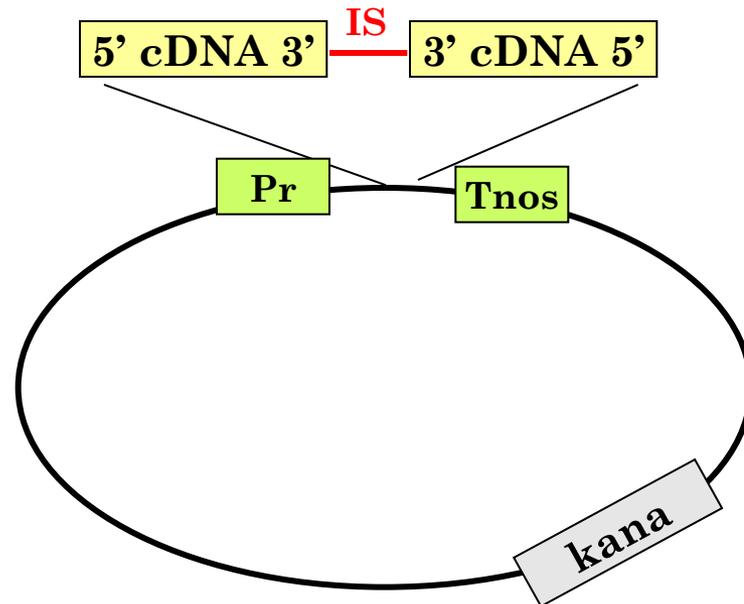
Modalita' di somministrazione:

- “Feeding”
- “Soaking”
- Iniezione

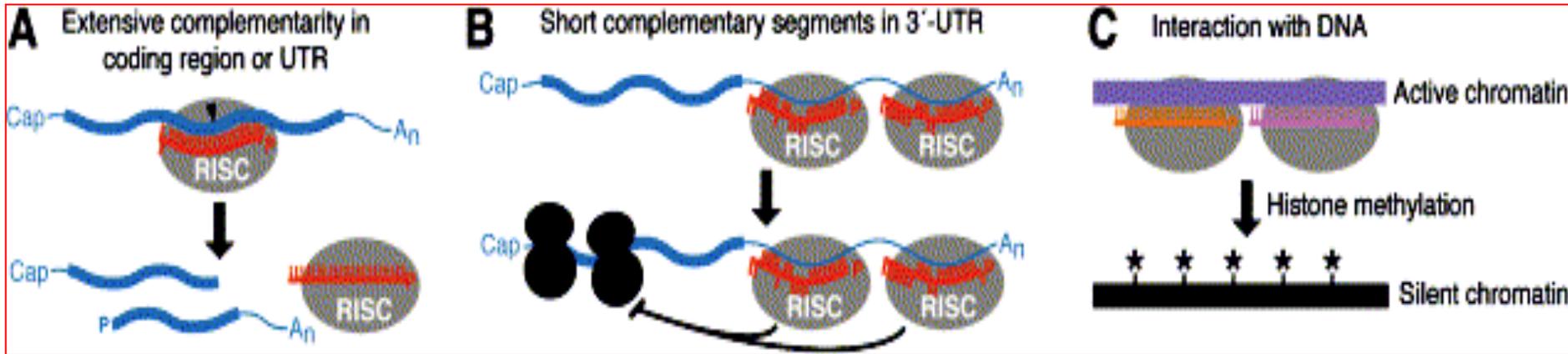


RNA interference in Piante

Espressione in vivo di sequenze ripetute invertite omologhe al gene da silenziare



Meccanismi post-trascrizionali



**Taglio nucleolitico
dovuto a miRNA o
siRNA**

**Repressione
traduzionale dovuta a
miRNA o siRNA**

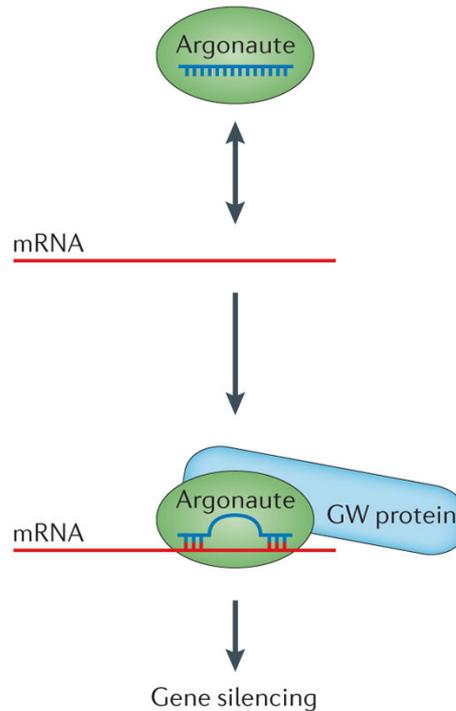
**Silenziamento
trascrizionale
causato da siRNA**

Argonaute proteins are **key players in all small-RNA-guided gene-silencing** processes that have been identified and characterized so far. They are **highly conserved**, and family members are found in all eukaryotes, with the exception of *Saccharomyces cerevisiae*, which has lost the small RNA machinery

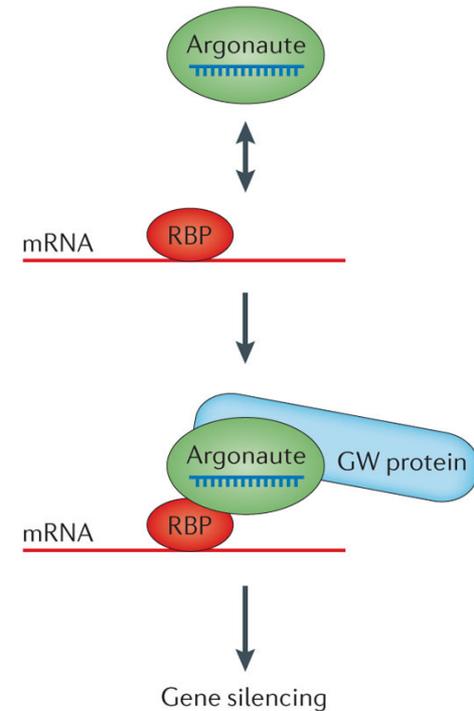
Argonaute proteins are the direct binding partners of small RNAs.

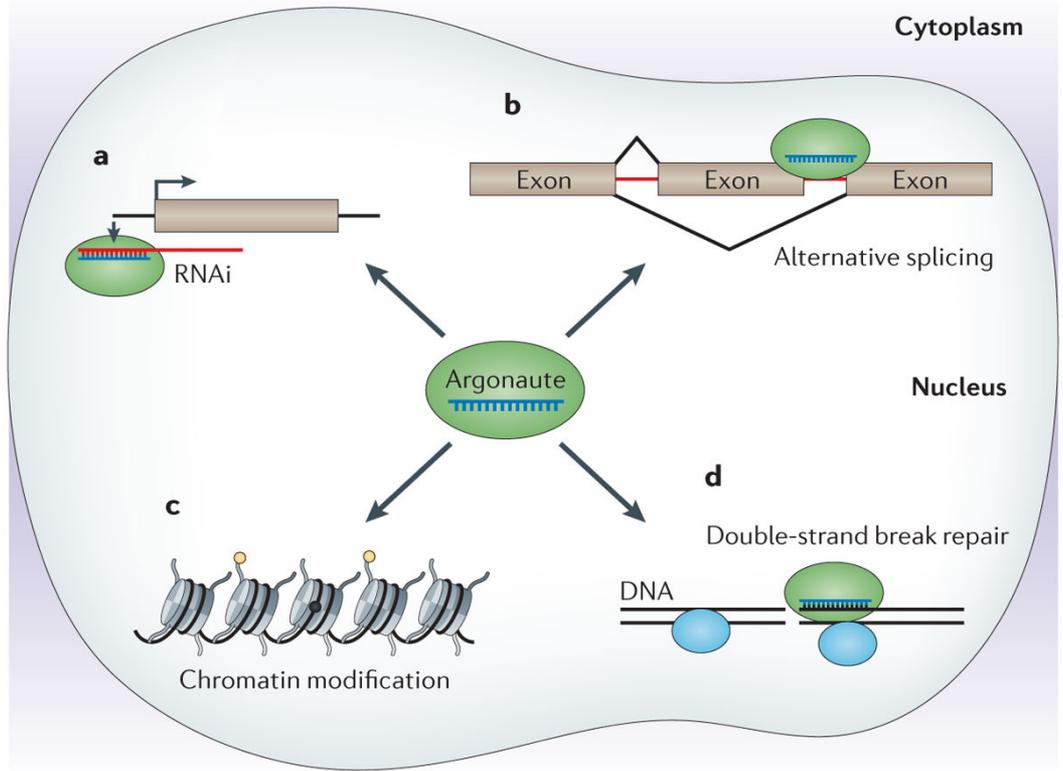
a) MicroRNAs (miRNAs) function as guides to bring AGO proteins to partially complementary sequences located on mRNAs. A GW scaffold protein interacts with the AGO protein and coordinates all the downstream silencing steps. b) AGO proteins can be recruited to target RNAs by protein-protein interaction with RNA-binding proteins. In subsequent steps, AGO proteins interact with a scaffold GW protein, which facilitates all downstream silencing processes. Whether binding of small RNAs to AGO proteins is required in such a model is unclear.

a miRNA-dependent recruitment



b miRNA-independent recruitment





Nature Reviews | **Genetics**

a) Cleavage-competent AGO proteins can localize to the nucleus, where they can **cleave complementary target RNAs** in a classical RNAi mechanisms. b) nuclear AGO proteins have been **involved in alternative splicing processes**. c) nuclear **AGO proteins engage in chromatin modification processes**, leading to transcriptional silencing. d) Small RNAs originating from ds break regions have been reported. It has been shown that **AGO proteins seem to influence ds break repair processes**.