

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali



Corso di Laurea Magistrale in Chimica delle Molecole Biologiche

**CORSO:** Biologia Molecolare

**A.A.** 2009-2010



**DOCENTE:** Marco Ruggiero

**STUDENTE:** Erica Secci

# INDICE

ABBREVIAZIONI USATE .....	2
1. INTRODUZIONE.....	3
2. LA STORIA E LA SCOPERTA.....	5
3. IL PROCESSO MOLECOLARE.....	9
3.1 Il meccanismo .....	9
3.2 Origine esogena ed endogena dei dsRNA.....	12
3.3 Amplificazione del silenziamento.....	16
4. FUNZIONE E SIGNIFICATO EVOLUTIVO.....	17
5. VARIAZIONE TRA ORGANISMI ED EVOLUZIONE .....	20
6. PROSPETTIVE FUTURE .....	22
6.1 siRNA nella ricerca di base .....	22
6.2 siRNA in biotecnologia.....	26
6.3 siRNA nella ricerca medica.....	28
6.3.1 Problematiche riguardanti la veicolazione <i>in vivo</i> .....	28
6.3.2 Applicazioni terapeutiche.....	33
6.3.2.1 Malattie genetiche e neurodegenerative.....	34
6.3.2.2 Malattie virali.....	36
6.3.2.3 Malattie oculari: la degenerazione maculare dell'anziano .....	38
6.3.2.4 Cancro.....	39
7. CONCLUSIONI .....	40
8. BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI.....	42

## ABBREVIAZIONI USATE

ssRNA	single strand RNA
mRNA	RNA messaggero
tRNA	RNA transfer
RNAi	RNA interference
dsRNA	double strand RNA
VIGS	virus-induced gene silencing
PTGS	post transcriptional gene silencing
siRNA	small interfering RNA
miRNA	micro RNA
RISC	RNA-interference silencing complex
RITS	RNA-induced transcriptional silencing
RNasi	ribonucleasi
shRNA	small hairpin RNA
RdRP	RNA dependent RNA polymerase
ApoB	apolipoproteina B
SNALP	particelle stabili acido nucleico-lipide
GFP	Green fluorescent protein
SCA1	ataxia spino cerebellare di tipo 1
ALS	sclerosi laterale amiotrofica
SOD	superossido dismutasi
HBV	virus dell'epatite B
HCV	virus dell'epatite C
RSV	virus respiratorio sinciziale
HSV-2	virus herpes simplex 2
VEGF	vascular endothelial growth factor

# 1. INTRODUZIONE

Il processo di espressione genica è di fondamentale importanza per tutti gli organismi viventi e la comprensione del suo meccanismo ha coinvolto scienziati per circa mezzo secolo conferendo ad alcuni di loro anche il Premio Nobel.

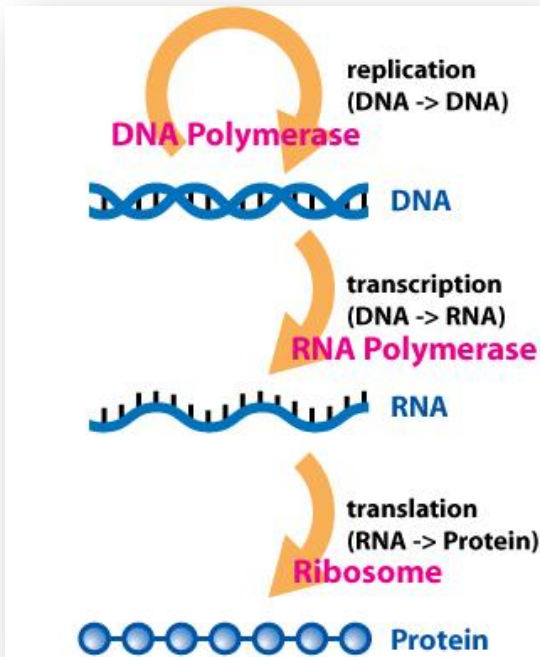


Figura 1 Dogma Centrale della Biologia

nel processo. Fu formulato il cosiddetto Dogma Centrale della Biologia Molecolare (Figura 1) secondo il quale il flusso delle informazioni che parte dal DNA nel nucleo cellulare e si concretizza nella sintesi proteica all'interno del citoplasma, passando per l'intermediario fondamentale mRNA.

All'inizio si credeva che l'RNA trasportatore dell'informazione genetica fosse l'RNA presente nei ribosomi; infatti, per molti anni fu formulata l'ipotesi "un gene  $\rightarrow$  un ribosoma  $\rightarrow$  una proteina". Però così non era. Nel 1961, François Jacob e Jacques Monod presentarono un nuovo modello del controllo genico, per il quale vinsero il Premio Nobel in Fisiologia e Medicina nel 1965 insieme con André Lwoff. Nel loro modello, proposero che il gene è trascritto in una specie specifica di RNA, l'RNA messaggero (mRNA), e che questo fosse tradotto in proteina dai ribosomi. Restava solo da capire come un'informazione scritta come sequenza di nucleotidi potesse essere tradotta invece in una sequenza di amminoacidi. Marshall Nirenberg e Gobind Khorana decodificarono quindi il codice genetico assegnando una corrispondenza biunivoca fra triplette di nucleotidi e amminoacidi (Premio Nobel per la Medicina nel 1968 insieme a Robert Holley). Francis Crick ha inoltre previsto che una molecola di RNA potesse agire come una sorta di adattatore tra mRNA e amminoacido;

La maggior parte dei geni risiede nei cromosomi localizzati nel nucleo delle cellule e si esprimono mediante le proteine sintetizzate nel citoplasma. Il materiale genetico è stato identificato come l'acido desossiribonucleico (DNA) nel 1944 [1] e la sua struttura a doppia elica è stata rivelata nel 1953 da Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins (Premio Nobel in Fisiologia e Medicina nel 1962). Il problema principale risultava quindi riuscire a capire come il DNA, isolato all'interno del nucleo, potesse dirigere la sintesi proteica nel citoplasma. È stato proposto che un altro acido nucleico, l'acido ribonucleico (RNA), a singolo filamento (ssRNA), agisca come intermediario

infatti, un RNA piccolo e stabile, l'RNA transfer (tRNA) fu presto identificato come tale adattatore. Fu così completata la spiegazione della sintesi proteica e quindi del dogma fondamentale della biologia.

Per molti anni si è creduto che mRNA corrispondesse a una sequenza ininterrotta di nucleotidi. È stata quindi una grande sorpresa quando, nel 1977, Philip Sharp e Richard Roberts mostrarono che la sequenza dell'mRNA poteva essere distribuita in modo discontinuo nel genoma (Premio Nobel nel 1993). Era inoltre noto che i trascritti primari, detti anche pre-mRNA, avessero lunghezza variabile e che fossero molto più lunghi rispetto a quanto atteso in base alle dimensioni delle proteine. Pertanto Sharp e Roberts dimostrarono, in modo indipendente, che i pre-mRNA sono modificati mediante la rimozione di sequenze interne che non vengono espresse (introni); mentre le sequenze che devono essere espresse (esoni) sono congiunte (spliced) insieme. L'mRNA maturo si associa quindi ai ribosomi, sede della traduzione e sintesi proteica.

Le proteine, così sintetizzate, diventano un costituente fondamentale delle cellule ed essenziale per svolgere moltissimi ruoli, come ad esempio strutturale (es. collagene ed elastina), di trasporto (es. emoglobina), di enzima (es. anidrasi carbonica, superossido dismutasi, ...), etc. Uno dei metodi per studiare il ruolo fisiologico e/o metabolico di una proteina è quello del knockout. Si definisce organismo knockout un organismo geneticamente modificato in cui è soppressa, a scopo di studio, l'espressione di un determinato gene rimuovendolo dal genoma. Tale soppressione è definita gene knockout (o knockout genico). L'osservazione di qualunque differenza dal normale comportamento può essere interpretata come una probabile funzione svolta da quella proteina. Come organismo in genere viene utilizzato il topo, poiché ha un metabolismo molto veloce per cui si possono studiare facilmente gli effetti dell'assenza della proteina oggetto di studio. Il primo topo knockout fu creato da Mario Capecchi, Martin Evans ed Oliver Smithies alla fine degli anni ottanta, ed è valso loro il Premio Nobel per la Medicina nel 2007. Riuscire però a ottenere topi knockout è difficile dal punto di vista biologico ed è molto dispendioso.

In questi ultimi anni è stata sviluppata una nuova tecnica che consente di silenziare un gene in modo specifico senza rimuoverlo dal genoma. Questa si basa sul principio della *RNA interference* (RNAi, in italiano interferenza RNA) per la cui comprensione i ricercatori statunitensi Andrew Z. Fire, della Stanford University School of Medicine, e Craig C. Mello, della Harvard University (Figura 2), vinsero il Premio Nobel per la Medicina e Fisiologia nel 2006 [2].



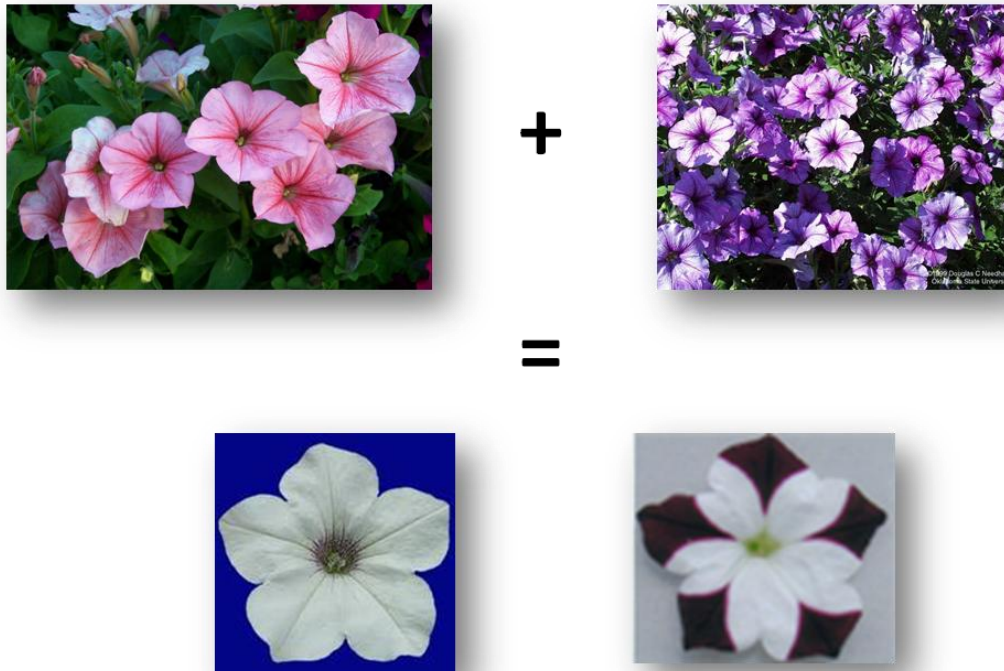
Figura 2 Andrew Fire e Craig Mello

RNAi è un processo di silenziamento genico post-trascrizionale e RNA-dipendente indotto RNA a doppio filamento (dsRNA). È una tecnica selettiva che non interviene direttamente sul genoma e per questo viene definita knockdown per differenziarsi dal knockout; ciò la rende quindi un valido strumento di ricerca. RNAi può essere infatti utilizzata in screening su larga scala spegnendo sistematicamente ogni gene nella cellula aiutando così ad identificare gli elementi principali per un particolare processo cellulare. Oltre che come metodo di studio delle proteine, la scoperta della RNAi ha aperto le porte a un'ampia ricerca in campo medico ed in particolare nello sviluppo di nuove cure per malattie associate alla produzione di particolari proteine e quelle virali.

I capitoli successivi hanno lo scopo di descrivere il principio della RNA interference e le implicazioni mediche ad esso associate.

## **2. LA STORIA E LA SCOPERTA**

Anche se tutte le cellule di un corpo possiedono un DNA perfettamente identico l'una all'altra, sono capaci di formare strutture diverse come occhi, pelle, denti, .... Ciò è possibile perché ogni cellula usa solo alcune parti del DNA e i geni vengono "accesi" o "spenti" a seconda di quello che la cellula deve fare. È stata la conoscenza di questi meccanismi negli anni '90 ad aprire la strada alla manipolazione genetica; cioè la possibilità di introdurre geni estranei nelle cellule per modificarne le caratteristiche. È una tecnica che è stata estensivamente usata ad esempio per produrre nuove varietà di fiori. Ma è proprio cercando di manipolare un fiore che ricercatori statunitensi e olandesi osservarono agli inizi degli anni '90 un evento che li lasciò perplessi [3]. In particolare, stavano lavorando sulla produzione di fiori di petunia con una colorazione più vivace e intensa. Per raggiungere questo scopo, introdussero in petunie rosa alcune copie aggiuntive del gene decodificante la chalcone synthase, un enzima chiave per la pigmentazione dei fiori nelle petunie normalmente colorate in rosa o viola. Inspiegabilmente, molte piantine transgeniche non avevano gli intensi colori attesi ma presentavano fiori con petali parzialmente o completamente bianchi (Figura 3).



**Figura 3** Le due piante in alto sono petunie wild-type; mentre le due in basso contengono transgeni che inducono soppressione sia del gene endogeno sia del transgene, generando zone bianche prive di pigmento nel fiore.

L'assenza di pigmentazione indicava che l'attività dell'enzima chalcone synthase era notevolmente ridotta; infatti, mediante un'analisi più precisa, i ricercatori furono in grado di scoprire che sia il gene endogeno sia il transgene erano stati soppressi. Per questo motivo, il fenomeno fu inizialmente definito come co-soppressione dell'espressione genica: il meccanismo molecolare, in ogni caso, rimaneva incognito [4]. Poco dopo, un evento correlato chiamato quelling fu osservato nel fungo *Neurospora crassa* [5], anche se non fu subito riconosciuto come collegato.

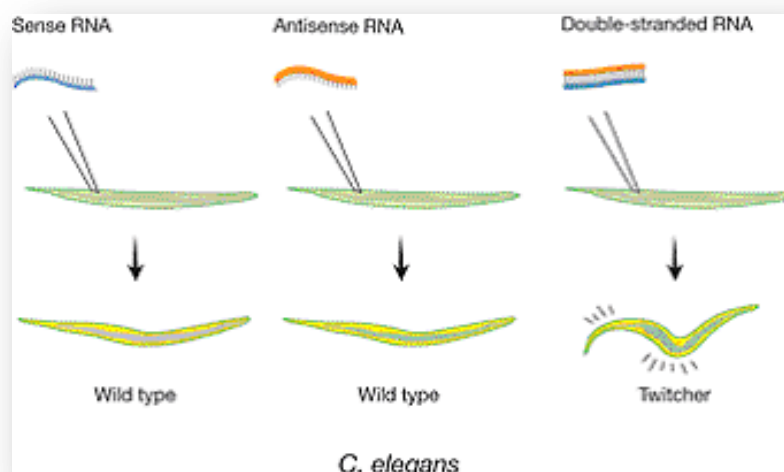
Ulteriori analisi del fenomeno nelle piante hanno indicato che la down regulation è dovuta ad un'inibizione post-trascrizionale dell'espressione genica tramite un aumento della velocità di degradazione dell'mRNA [6].

Alcuni anni più tardi, alcuni virologi vegetali fecero un'osservazione simile. Le loro ricerche erano indirizzate all'individuazione dei meccanismi di resistenza delle piante contro i virus. Era noto che le piante erano in grado di esprimere proteine specifiche virali. Tali proteine erano in grado di rendere le piante tolleranti o resistenti alle infezioni virali. Cosa del tutto inaspettata era che anche le piante aventi solo brevi frammenti degli RNA codificanti per quelle proteine erano in grado di resistere alle infezioni virali. Essi conclusero che tali molecole di RNA fossero in grado di attaccare i virus, inibendone la replicazione e la diffusione attraverso la pianta [7]. Fu provato anche l'esperimento inverso, cioè brevi sequenze geniche della pianta venivano introdotte all'interno dei virus. Ciò che si osservò fu che in seguito all'infezione con questi virus, le piante non erano più in

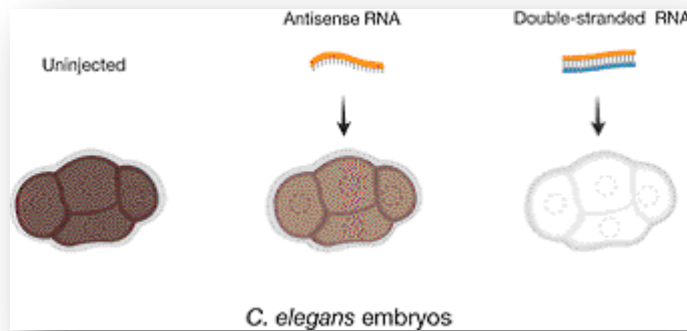
grado di produrre proteine codificate da quelli specifici geni. L'espressione di quelle proteine era quindi stata soppressa. I ricercatori chiamarono questo fenomeno silenziamento genico indotto da virus (o VIGS, dall'inglese virus-induced gene silencing). L'insieme dei fenomeni individuati fino a questo punto furono chiamati collettivamente come silenziamento genico post trascrizionale (o PTGS, dall'inglese post transcriptional gene silencing) [8, 9].

Queste osservazioni preliminari gettarono le basi per molte ricerche sul processo molecolare del silenziamento genico. Ispirati da questi primi risultati, gli americani Andrew Fire e Craig Mello iniettano dsRNA all'interno di *Caenorhabditis elegans*, un verme nematode, individuando un potente effetto di silenziamento. Il termine RNA interference fu coniato in questa occasione [10]. Il *C. elegans* era un sistema sperimentale utile poiché l'origine evolutiva di tutte le cellule di questo organismo è nota ed è possibile iniettare RNA in embrioni ai primi stadi ed osservare i cambiamenti rispetto al modello durante lo sviluppo.

Negli esperimenti preliminari dei due biologi venivano iniettate separatamente le sequenze degli RNA messaggero "senso" o "antisenso", cioè aventi la sequenza corrispondente o complementare a quella del gene in questione, e se ne studiarono gli effetti fenotipici. In entrambi i casi non ottennero risultati. La scoperta interessante avvenne in seguito all'iniezione di entrambe le sequenze di mRNA (senso e antisenso): il nematode presentava movimenti caratteristici, tipici degli esemplari nei quali il gene codificante la proteina muscolare veniva completamente soppresso (Figura 4). Infatti, ripetendo il test su cellule embrionali fu osservata una massiccia diminuzione nella quantità di mRNA solo dopo l'iniezione di dsRNA (Figura 5).



**Figura 4** Effetto fenotipico dopo l'iniezione di RNA *unc-22* a singolo o doppio filamento nella gonade di *C. elegans*. Il gene *unc-22* codifica per una proteina contenuta nelle miofibrille muscolari. È noto che una diminuzione dell'attività di *unc-22* provochi una forte contrazione nei movimenti. L'iniezione di dsRNA, ma non di ssRNA, ha indotto le contrazioni nella progenie [11].



**Figura 5** L'effetto sul contenuto di *mex-3* mRNA in embrioni dopo l'iniezione di RNA *mex-3* a singolo o doppio filamento nella gonade di *C. elegans*. L'mRNA *mex-3* è abbondante nelle gonadi e negli embrioni ai primi stadi. L'mRNA è stato perso dopo l'iniezione di dsRNA, mentre l'iniezione di RNA antisense ha soltanto ridotto il contenuto di mRNA in certa misura. Il grado di colore marrone riflette la quantità di mRNA presente [11].

Quando le sequenze di RNA senso e antisense si trovano nello stesso ambiente si appaiano per complementarità di basi formando un RNA a doppio filamento. Le molecole di dsRNA sono quindi in grado di rendere silente il gene che porta la loro stessa sequenza. Fire e Mello pubblicarono questi primi interessantissimi risultati su *Nature* nel febbraio del 1998 [10].

I principali risultati di tali esperimenti possono essere così riassunti:

- a) il silenziamento genico è indotto efficacemente mediante iniezione di dsRNA, invece solo debolmente o per nulla in seguito all'iniezione di ssRNA senso o antisense;
- b) il silenziamento è specifico per l'mRNA omologo al dsRNA iniettato, altri mRNA non sono coinvolti;
- c) il dsRNA deve corrispondere alla sequenza dell'mRNA maturo, né la sequenza del promoter né quelle relative agli introni inducono una risposta. Ciò indica presumibilmente un meccanismo citosolico post-trascrizionale;
- d) l'mRNA selezionato, ovvero omologo al dsRNA esogeno, scompare suggerendo una sua degradazione;
- e) soltanto poche molecole di dsRNA per cellula sono sufficienti a realizzare un silenziamento totale. Ciò indica che il dsRNA è amplificato e/o agisce cataliticamente piuttosto che in modo stechiometrico;
- f) gli effetti del dsRNA possono diffondersi tra i tessuti e persino alla progenie, suggerendo una trasmissione dell'effetto tra le cellule.

Per queste scoperte A. Fire e C. Mello vinsero il Premio Nobel per la Medicina e Fisiologia nel 2006 [2].

Per quanto riguarda comunque il precedente punto (c), nell'articolo su *Nature* non si trova una ferma posizione sulla questione se dsRNA agisce attraverso un meccanismo trascrizionale o post-trascrizionale. Tuttavia, in uno studio successivo pubblicato su *PNAS* lo stesso anno, Fire fornì buone prove al fatto che l'mRNA sia il target per il dsRNA (riconoscimento mediante strands complementari), e che l'mRNA bersaglio sia degradato prima della traduzione, confermando quindi un'azione del dsRNA a livello post-trascrizionale [12].

Fire e Mello osservarono inoltre che RNAi potesse fornire una spiegazione per il fenomeno di PTGS osservato per molti anni nelle piante. La loro scoperta fece quindi luce su molti esperimenti riguardante il flusso dell'informazione genetica che avevano creato non poca confusione nella comunità scientifica ponendo così le basi per un nuovo promettente filone di ricerca.

In seguito, il meccanismo della RNAi è stato scoperto in un largo numero di organismi, incluse le mosche della frutta, i trypanosomi, la planaria, l'hydra, il pesce zebra e il topo [13].

### **3. IL PROCESSO MOLECOLARE**

La RNAi è un processo specifico e potente portato avanti dalla cellula. Sebbene non tutti i dettagli del processo stesso siano ancora chiari, sembra che il cosiddetto RNAi machinery (macchinario dell'RNAi), una volta individuato una molecola di RNA a doppio filamento, sia in grado di avviare il meccanismo della RNAi, così com'è stato dimostrato da Fire e Mello nel 1998.

Poco dopo la scoperta della RNAi, si osservò che PTGS nelle piante è correlato a una popolazione di piccoli RNA (lunghi circa 25 nucleotidi), e che questo RNA contiene sia la sequenza senso che antisenso dell'RNA [14]. Fu quindi proposta l'ipotesi che questo RNA sia l'elemento determinante e fondamentale del PTGS così come dell'RNAi. La biochimica della RNAi è stata ulteriormente chiarita utilizzando come modello di studio un sistema *in vitro* costituito da estratti di embrioni di *Drosophila* [13].

#### **3.1 Il meccanismo**

Come è stato detto in precedenza, l'interferenza RNA inizia quando viene individuata una lunga catena a doppia elica di RNA. È stato dimostrato, nel sistema *in vitro* citato, che questo dsRNA viene processato in frammenti di dsRNA lunghi 21-23 nucleotidi (nt) [15] in accordo con i dati per

PTGS nelle piante [13]. Fu avanzata l'ipotesi che questi piccoli frammenti di dsRNA, chiamati siRNA (small interfering RNA), guidassero la rottura dell'mRNA.

L'enzima che compie l'azione di clivaggio del dsRNA è l'enzima Dicer (Figura 6), un enzima specifico per il dsRNA appartenente alla famiglia della RNasi III [16]. I membri della famiglia Dicer sono multi-dominio e sono costituiti da: un dominio RNasi III, un dominio PAZ (dal nome delle proteine Piwi, Argonaute e Zwiille), un dominio legante dsRNA, un dominio elicasi e uno di funzione sconosciuta.

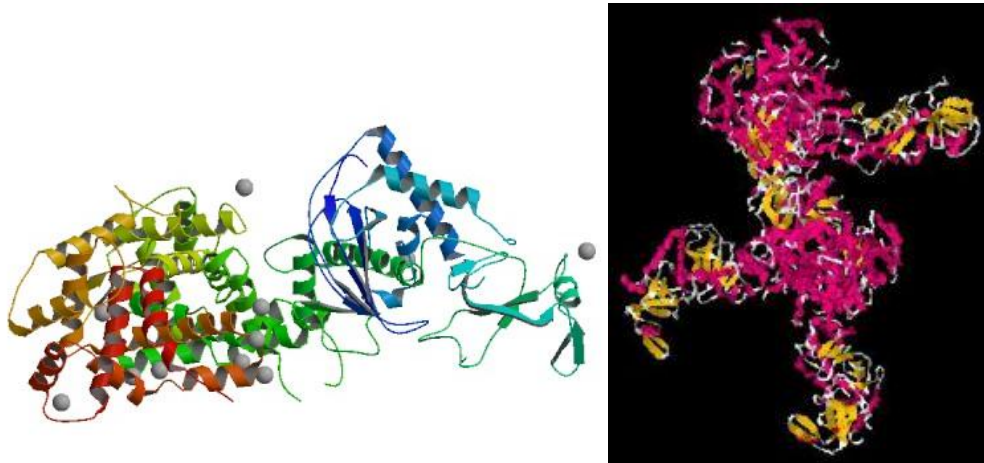


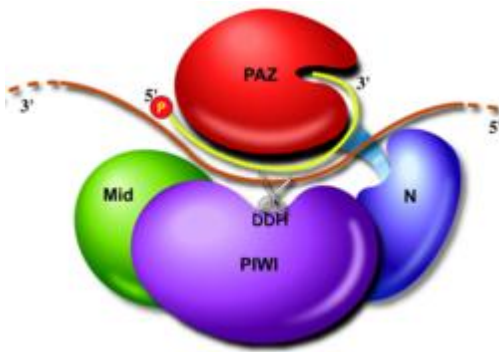
Figura 6 Enzima Dicer (a sinistra si ha il file PDB 2FFL che è la struttura cristallina del Dicer di *Giardia intestinalis*).

I siRNA così ottenuti sono lunghi  $n$  paia di basi, con  $n$  compreso generalmente tra 21 e 25, ma le due catene non sono tagliate in modo simmetrico. Se ad esempio si ha un siRNA lungo 21 paia di basi, si ha che 19 nucleotidi sono perfettamente accoppiati mentre due nt sporgono da ognuna delle due estremità 3' (Figura 7). Studi bioinformatica sul genoma di molti organismi suggeriscono che una lunghezza dei dsRNA di 21-25 nt massimizza riconoscimenti specifici mentre minimizza quelli che non lo sono [17]. Sembra che un ruolo di fondamentale importanza nell'enzima Dicer, sia svolto dalla particolare disposizione di quattro ioni manganese. Si pensa che siano proprio questi a operare il taglio asimmetrico nella catena di RNA a doppia elica creando così le sporgenze.

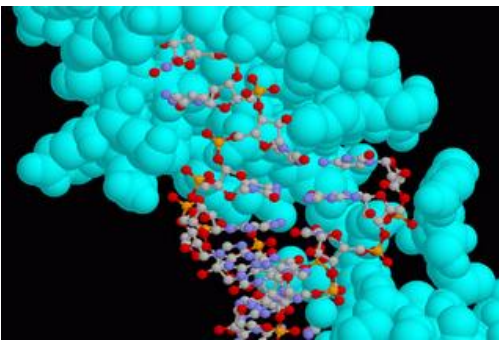


Figura 7 Struttura di siRNA.

Queste caratteristiche permettono di riconoscere facilmente i siRNA.



**Figura 8** Complesso RISC. Il disegno che mostra l'RNA antisenso (il filo giallo nel diagramma) legato al dominio PAZ, mentre in arancione si ha l'mRNA ad esso complementare.



**Figura 9** In blu è mostrato il dominio PAZ mentre con il modello ball and stick il siRNA.

Infatti, il siRNA ottenuto dall'azione catalizzata dalla proteina Dicer si associa ad un complesso enzimatico denominato RISC (dall'inglese RNA-interference silencing complex) legandosi al dominio PAZ (Figura 8).

Il binding tra siRNA e RISC è stato studiato mediante cristallografia ai raggi-X. È stato osservato, come è possibile vedere in Figura 9, che le due basi sporgenti all'estremità 3' si legano all'interno di una piccola tasca della proteina mentre l'estremità 5' fosforilata si appoggia esattamente sotto una sporgenza sulla superficie. Si ipotizza che il gruppo fosfato si leghi al sito mediante interazione elettrostatica con un catione bivalente, generalmente magnesio, e mediante stacking aromatico tra il nucleotide in posizione 5' e una tirosina altamente conservata [18].

L'RNA a doppio filamento viene aperto probabilmente da un'elicasi: solo il filamento di RNA antisenso rimane associato a RISC, mentre il filamento senso viene degradato.

Il complesso RISC è ora attivo ed è quindi in grado di scansionare molti mRNA presenti nel citosol fino a trovarne uno complementare al frammento di RNA antisenso incorporato nel complesso stesso. Non è ancora noto però, in quale modo avvenga questo processo.

Un dominio importante del complesso RISC è la *argonaute protein* (o *Argo*) in cui si ritrova un dominio RNasi H-like domain chiamato Piwi (Figura 8) [2]. Se l'appaiamento tra siRNA e mRNA è perfetto, la componente Argo del RISC è in grado di operare un taglio sull'mRNA (in genere il sito di taglio è centrale alla sequenza riconosciuta), lasciando integro il filamento derivante dal siRNA. I due frammenti di mRNA risultante saranno privi uno del cappuccio all'estremità 5' mentre l'altro della coda poliA all'estremità 3' e per questo saranno velocemente degradati dalle RNasi della cellula stessa. Ciò impedisce ovviamente la traduzione dell'mRNA e sintesi della rispettiva proteina, silenziando così l'espressione del gene corrispondente.

Nelle cellule le proteine argonaute, la componente catalitica del RISC, sono localizzate in regioni specifiche del citoplasma chiamate corpi-P (o anche corpi-GW), che sono regioni con alta velocità di "decadimento" di mRNA [19]. La rottura di questi corpi-P diminuisce l'efficienza dell'RNA interference, suggerendo che essi sono il sito di uno step cruciale nel processo RNAi.

L'intero meccanismo dell'interferenza RNA può essere quindi schematizzato con la seguente Figura 10.

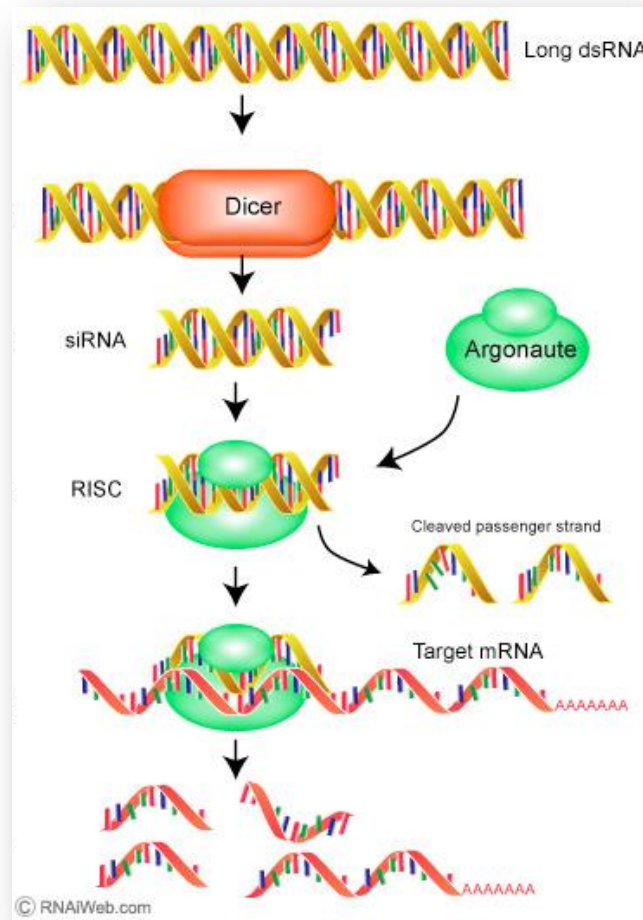


Figura 10 Step del meccanismo RNAi (del complesso RISC in verde è messo in evidenza il dominio catalitico Argonaute).

### 3.2 Origine esogena ed endogena dei dsRNA

Una volta spiegato il meccanismo resta da capire com'è possibile trovare dsRNA nell'ambiente cellulare che attivi il processo RNAi.

Ovviamente per quanto riguarda l'induzione dell'interferenza RNA come tecnica di studio, il dsRNA avrà un'origine esogena. Nei primi studi, i modi con cui è stato possibile integrare un dsRNA in *C. elegans* erano relativamente facili e sono:

- attraverso l'iniezione di dsRNA nelle gonadi del verme;
- immergendo i vermi in una soluzione di dsRNA (soaking method);

- iii. attraverso la somministrazione ai vermi di batteri contenenti plasmidi in grado di produrre dsRNA. È possibile, infatti, servirsi di batteri come *Escherichia Coli* come fonte di nutrimento per il verme così che trasferiscono l'RNA direttamente nel tratto intestinale dell'animale.

Quest'ultimo processo è molto efficiente e veloce, nonché molto meno oneroso rispetto ai primi due metodi [20]. Il dsRNA somministrato attraverso una qualsiasi di queste vie ha la capacità di propagarsi da cellula a cellula e di indurre un'interferenza di tipo sistematico in tutto l'organismo. In seguito a tali esperimenti la tecnica è stata poi usata con successo anche in piante, in *Drosophila* e in altri nematodi. Al contrario, il suo utilizzo inizialmente non è stato possibile per cellule di mammifero nelle quali il dsRNA può innescare una serie di reazioni a catena che portano a degradazione aspecifica degli mRNA. Se invece si è interessati ad indurre RNAi in sistemi cellulari o in particolari distretti, una volta selezionata la sequenza ottimale, si procede alla trasfezione facendo ricorso ad uno dei seguenti metodi che sono quelli maggiormente utilizzati:

- trasfezione diretta con dsRNA;
- trasfezione con un plasmide contenente due sequenze che codificano per l'RNA senso e antisenso che si vuole produrre (o due plasmidi ciascuno con una sequenza). Una volta trasfettata, la cellula produrrà i due strand dell'RNA che si uniranno a formare il dsRNA voluto;
- trasfezione con un plasmide contenente una sequenza che codifica per uno shRNA (small hairpin RNA), cioè un RNA unico che contiene la sequenza senso, uno spacer (5-6 basi) e la sequenza antisenso. Questo RNA avrà una struttura a forcina, poiché il senso e l'antisenso si appaieranno.

Questi sono i metodi con cui si può introdurre in modo artificiale un dsRNA in un sistema, ma ovviamente è un processo che avviene anche in natura ed in particolare durante le infezioni virali. Infatti, il ciclo vitale e replicativo di molti virus comprende un passaggio durante il quale il genoma virale è costituito di RNA a doppio filamento mentre molti agenti patogeni hanno un codice genetico organizzato direttamente in dsRNA. Ciò induce a pensare che il sistema della RNAi si sia evoluto per rispondere alle infezioni virali durante le quali i virus iniettano il loro genoma nelle cellule bersaglio.

Il dsRNA può essere anche di origine endogena oltre che esogena e la loro presenza è stata dimostrata ancora una volta grazie a studi sul *C. elegans*. Infatti, nei primi anni '90 i ricercatori che

studiavano lo sviluppo del verme fecero una scoperta inattesa: una mutazione in un solo gene distruggeva la cronologia dello sviluppo, impedendo al *C. elegans* di passare dal primo al secondo stadio larvale. Ricerche apposite permisero di identificare il gene mutato; infatti, rimuovendo la mutazione veniva ripristinata la capacità al *C. elegans* di proseguire il suo sviluppo attraverso tutti gli stadi larvali [21]. Tuttavia, la successiva caratterizzazione del gene e del prodotto genico si dimostrò alquanto sorprendente: il gene non codificava una proteina, ma un piccolo RNA molecolare. Negli anni successivi furono trovati altri geni codificanti piccoli dsRNA (di circa 21-23 nt) e ben presto si giunse alla dimostrazione dell'espressione universale di questi geni, dai batteri all'uomo. Fatto ancora più importante è che molti dei geni che codificavano i piccoli RNA erano simili nell'uomo, negli insetti e nei vermi. La scoperta di una nuova classe di geni che danno origine a questi piccoli RNA non codificanti sembrò spiegare in parte il numero inaspettatamente piccolo di geni codificati proteine del genoma umano. Secondo le stime condotte con metodi computazionali, il numero totale di geni umani destinati ai piccoli RNA non codificanti è compreso fra 200 e 255 [22], e in *C. elegans* arriva a 123 [23]. L'analisi della localizzazione nel genoma umano di 60 di questi piccoli RNA ha dimostrato che 33 erano localizzati in regioni intergeniche. Dei rimanenti, 13 erano presenti nell'orientamento corrispondente a quello degli introni dei trascritti codificanti, 7 nell'orientamento di senso negli introni di geni non codificanti e 7 nell'orientamento inverso all'interno di un introne [24]. Questi risultati suggerirono che i piccoli RNA non codificanti fossero trascritti dai propri promotori oppure derivassero da un pre-mRNA.

Gli RNA sintetizzati in modo endogeno non portano a siRNA, di origine soprattutto esogena, bensì producono i cosiddetti microRNA (miRNA) che, oltre che nel *C. elegans*, sono stati identificati anche in *Drosophila*, mosche, mammiferi e molti altri organismi. I miRNA maturi sono strutturalmente simili ai siRNA prodotti da dsRNA esterni; ma prima di raggiungere la maturità, i miRNA devono essere prima sottoposti ad un'ampia modifica post-trascrizionale. Generalmente il gene codificante per un miRNA è trascritto dalla RNA-polimerasi II che dà vita a un lungo trascritto primario (più di 1000 nt), noto come pri-miRNA, che presenta il cap, la poliadenilazione e in particolare contiene sequenze complementari, ripetute e invertite capaci di formare forcine di RNA (Figura 11). Nel nucleo, il pri-miRNA è processato dal complesso nucleare Microprocessore in un



**Figura 11** La struttura secondaria stem-loop di un pri-miRNA di *Brassica oleracea*

RNA, chiamato pre-miRNA, di lunghezza circa 70-100 nt e contenente ancora la struttura stem-loop [25]. Questo complesso è costituito dall'enzima Drosha appartenente alla famiglia delle RNase

III e dalla proteina Pasha in grado di legare dsRNA. Successivamente, le proteine RAN-GTP ed exportin 5 trasportano il pre-miRNA dal nucleo al citoplasma, dove la porzione double strand è legata e tagliata dal Dicer per produrre i miRNA maturi che possono essere ora integrati in un complesso proteico. Così come i siRNA, anche i miRNA formano particelle ribonucleoproteiche funzionali (RNP) contenenti un solo filamento dell'RNA non codificante [26] (Figura 12). Anche se questi complessi RNP potrebbero non essere unità funzionali facilmente distinguibili; come già definito in precedenza, con il termine RISC si indica un complesso contenente siRNA mentre con miRNP si indica invece un complesso contenente miRNA.

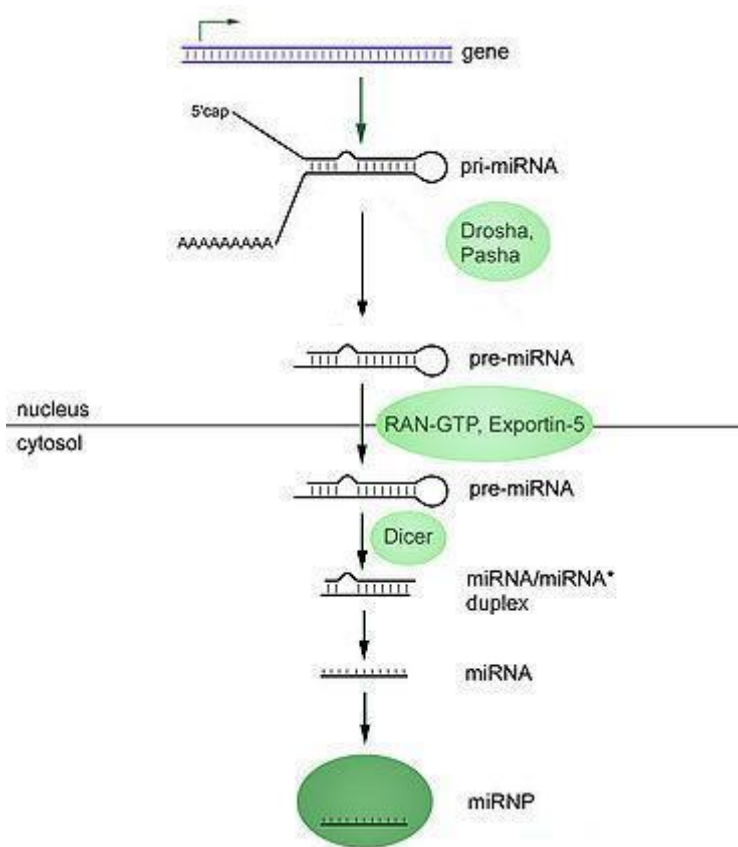


Figura 12 Biogenesi di miRNA

A differenza però di quanto succedeva con i siRNA, i miRNA spesso mostrano una complementarietà imperfetta con l'mRNA target e non si ha perciò la sua degradazione. Si può concludere quindi che i miRNA non portano ad un silenziamento totale del gene corrispondente all'mRNA target ma piuttosto ad una sua inibizione traduzionale e che ciò non è dovuto a differenze intrinseche fra siRNA e miRNA ma piuttosto scaturiscono dal livello di omologia con l'mRNA bersaglio [27].

Riassumendo, alcuni errori di appaiamento, localizzati soprattutto nella zona centrale, indirizzano l'mRNA verso la via dell'inibizione traduzionale, che appare rappresentativa per quanto riguarda gran parte dei miRNA animali. Viceversa, la complementarità perfetta, rappresentata da un siRNA, porta alla degradazione mirata dell'mRNA (Figura 13). Ovviamente la specificità con cui avviene l'appaiamento tra gli RNA è sensibile alle naturali variazioni nella sequenza del DNA genomico.

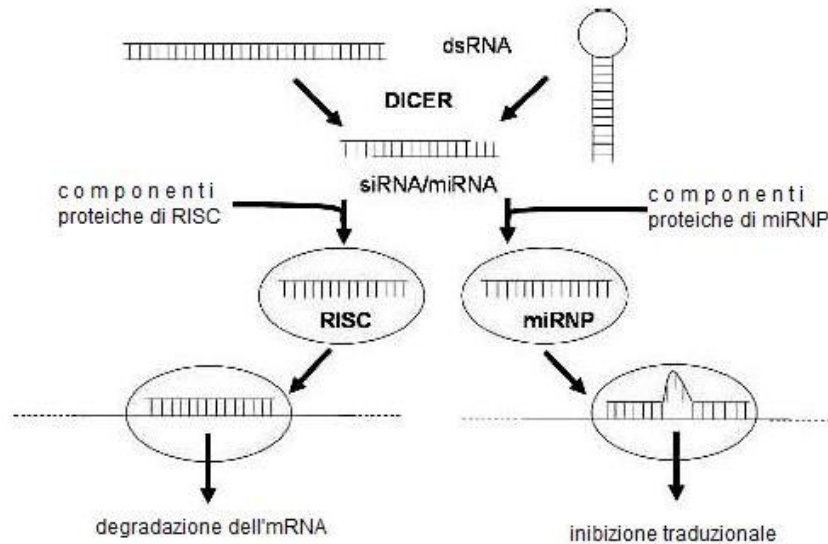


Figura 13 Meccanismo proposto per RNAi [28].

Anche se i risultati dell'azione di siRNA e di miRNA sono diversi, di solito nel termine interferenza RNA si includono sia gli effetti di silenziamento indotti da miRNA endogeni sia il silenziamento attivato da dsRNA estranei. In realtà la differenza di comportamento tra siRNA e miRNA non è così netta ma dipende dall'organismo in esame. Infatti, mentre ad esempio negli animali si riscontra il comportamento precedentemente descritto, nelle piante i miRNA endogeni danno invece un appaiamento perfetto con l'mRNA target inducendo silenziamento totale del gene.

### 3.3 Amplificazione del silenziamento

Nel punto (e) di pag. 8 è stato detto che i dsRNA nel *C. elegans* agiscono in modo catalitico poiché l'introduzione di una piccola quantità è sufficiente per realizzare un silenziamento totale. È stato infatti provato che in certi organismi, in particolari piante, vermi e funghi ma non nei mammiferi, una RNA dependent RNA polymerase (RdRP) gioca un ruolo importante nel generare e/o amplificare i siRNA [29]. La RdRP è una polimerasi che utilizza come template l'mRNA tagliato dal RISC e in particolare il frammento contenente il cap. Questo è un processo che porta alla sintesi

di un dsRNA e quindi di un nuovo substrato per il Dicer generando così ulteriori siRNA oltre a quelli già presenti. In alcuni organismi con un meccanismo RNAi endogeno (funghi, piante, vermi e mammiferi), si ha un altro step di amplificazione. In questo step i siRNA double strand (cioè non associati al RISC) si legano al suo mRNA target in un modo sequenza-specifico e serve come primer per RdRP che polimerizza lo strand antisense dell'RNA. Ovviamente anche questo dsRNA sarà substrato per il Dicer, e così via [30]. Quest'amplificazione, accoppiata con lo spreading tra le cellule, fa sì che si abbia un completo silenziamento. Lo spreading dell'RNAi è stato osservato anche nelle piante oltre che nei vermi, ma non nei mammiferi.

#### **4. FUNZIONE E SIGNIFICATO EVOLUTIVO**

Nel corso degli esperimenti sull'interferenza RNA apparve subito evidente l'importanza di tale meccanismo e gli studi proseguirono nell'individuazione dei vari ruoli in cui essa è coinvolta.

La dimostrazione di Fire e Mello che le cellule processino il dsRNA iniettato ed eliminino l'omologo ssRNA suggerisce che il meccanismo dell'RNAi si sia sviluppato in natura probabilmente per intervenire nella risposta immunitaria contro i virus o altro materiale genetico estraneo. Ciò avviene principalmente nel regno vegetale. Infatti, fu inizialmente mostrato che proprio le cellule di una pianta avevano un'efficace difesa contro i virus basata sul fenomeno dell'IPTG [31]. Come già detto, molti agenti patogeni hanno un codice genetico organizzato in RNA a doppio filamento che viene iniettato nella cellula bersaglio durante le infezioni. Quando la cellula si accorge del verificarsi di tale processo, i dsRNA virali vengono immediatamente riconosciuti dal complesso Dicer e in seguito viene attivato RISC che lo degrada permettendo alla cellula di sopravvivere all'infezione. Non solo la cellula scompone il dsRNA, ma cerca di individuare elementi simili, nell'eventualità sia andato perso un qualche RNA a singolo filamento durante la replicazione del virus (per il quale è più difficile riconoscere le forme nocive). I virus da pianta però hanno elaborato diverse strategie per reagire all'RNA interference. La principale è quella di produrre proteine che si legano a siRNA impedendone la normale funzione di distruggere l'mRNA virale. Oggi, è noto che l'interferenza RNA agisce come meccanismo antivirale non solo nelle piante, ma anche in vermi e mosche, mentre non è ancora chiaro quanto sia rilevante per i vertebrati, uomo compreso [32]. Oltre che contro virus, i genomi di alcune piante sono in grado di esprimere siRNA endogeni in risposta all'infezione di specifici tipi di batteri [33]. Questi effetti

possono far parte quindi di una risposta generalizzata a patogeni che agiscono mediante una down regolazione del metabolismo dell'ospite così da aiutare il processo infettivo.

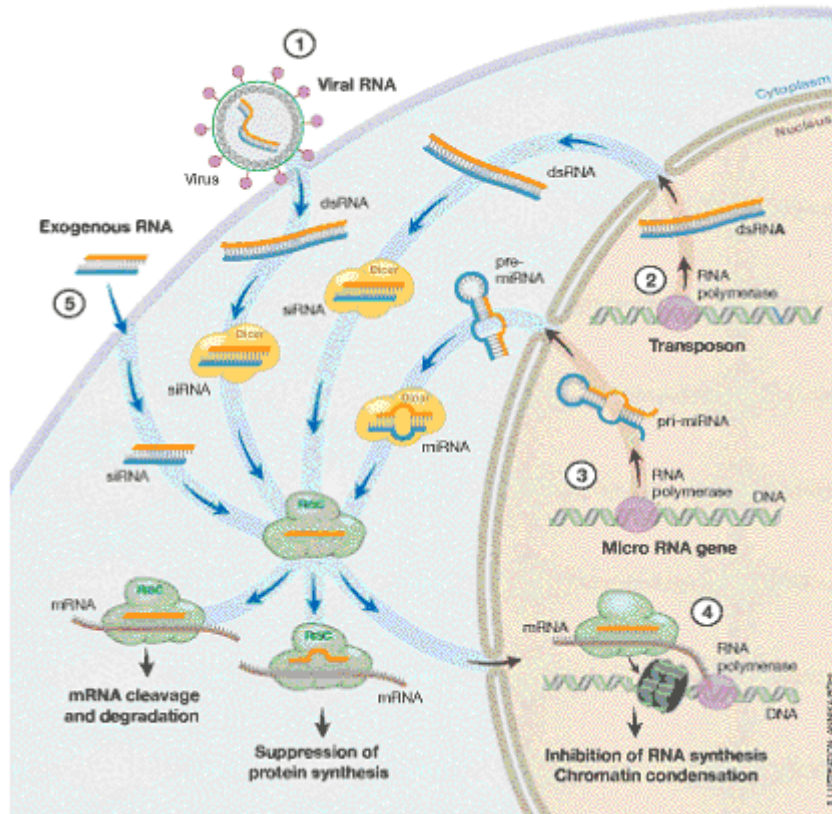
Un altro ruolo fondamentale che l'RNAi ha in natura è assicurare la stabilità del genoma bloccando l'azione dei trasposoni, sequenze di DNA che possono saltare da un punto all'altro del genoma. Questi "geni ballerini" sono presenti in tutti gli organismi e possono provocare danni anche gravi nel momento in cui s'inseriscono in punti sbagliati: possono, infatti, interrompere sequenze di geni fondamentali che, conseguentemente, non funzionano più e talvolta causare mutazioni che possono condurre a cancro o altre malattie. Questo ruolo dell'interferenza RNA è stato dimostrato mutando in *C. elegans* alcune componenti dell'RNAi machinery e ciò ha attivato i trasposoni causando disturbi nella funzione del genoma [34, 35]. Il meccanismo d'azione di molti trasposoni prevede un passaggio di trascrizione della loro sequenza in un RNA che può andare ad inserirsi in ogni punto del genoma. Alcune di queste molecole di RNA sono a doppio filamento e sono dunque il bersaglio ideale per l'RNAi. Piccoli dsRNA possono agire direttamente sulla cromatina (vedere in seguito) sopprimendo la trascrizione e questo può essere un altro modo per tenere inattivi i trasposoni. Anche se il meccanismo non è ancora stato completamente chiarito, è evidente che se l'RNA machinery non è efficiente, i trasposoni non sono tenuti sotto controllo e possono iniziare a saltare e causare effetti deleteri nel genoma. È stato ipotizzato che il silenziamento dell'RNA potesse rappresentare una sorta di "difesa immunitaria" del genoma stesso non solo dai virus esogeni ma anche da agenti endogeni. Quasi il 50% del nostro genoma è costituito infatti da elementi virali e trasposoni che hanno invaso il genoma nel corso dell'evoluzione. Il sistema dell'RNAi condivide importanti caratteristiche con il sistema immunitario dei vertebrati: riconosce il parassita invasore (dsRNA), solleva una prima risposta e in seguito la amplifica per eliminare completamente la componente straniera.

L'RNAi non ha però solo un ruolo di difesa ma è anche un meccanismo di fondamentale importanza nella regolazione dello sviluppo di un organismo. Ciò apparve subito evidente durante i primi studi sullo sviluppo appunto del *C. elegans* che portarono alla scoperta dei miRNA. Infatti, come già detto, questi studi mostrarono che la mutazione di geni codificanti per piccoli RNA impediva lo sviluppo del nematode. Studi analoghi furono effettuati anche sulla *Arabidopsis thaliana* in cui si individuarono alcuni RNA che controllano lo sviluppo della pianta [36]. Questi risultati portarono i ricercatori a suggerire che questi geni, codificanti un piccolo RNA a doppio filamento, possono fungere da regolatori dello sviluppo e fu osservato che il ruolo funzionale di questi piccoli RNA comprendeva la cronologia dello sviluppo, la morte cellulare, la proliferazione cellulare, l'ematopoiesi e l'organizzazione funzionale del sistema nervoso [37]. Si può concludere quindi che i piccoli RNA prodotti in modo endogeno, cioè i miRNA, svolgono un ruolo importante

nel controllo dell'espressione genica durante lo sviluppo. Per esempio, nelle piante la maggior parte dei geni regolati da miRNA sono fattori di trascrizione e per questo regolano interi network durante lo sviluppo modulando l'espressione di geni regolatori chiave. In molti organismi, incluso l'uomo, miRNA sono stati anche collegati alla formazione di tumori e alla modifica del ciclo cellulare; i miRNA agiscono quindi sia come oncogeni sia da soppressori tumorali [38]. In generale, la classe di miRNA rappresenta il 2-3% del numero totale dei geni nell'uomo, circa 500 miRNA in cellule di mammifero e una stima del numero dei loro target indica che i miRNA giocano un ruolo nella regolazione di circa il 30% dei geni. Perché avvenga però una regolazione a livello post-trascrizionale di questo tipo è ancora oggi oggetto di studio. Probabilmente una RNA polimerasi endogena riesce in qualche modo a sentire che un particolare RNA messaggero venga fabbricato in eccesso e a dare il via al processo di degradazione.

È noto però da studi nelle piante, che il silenziamento genico può avvenire anche a livello trascrizionale (TGS) e, dopo la scoperta dell'interferenza RNA, è stato mostrato che ciò avviene con un meccanismo analogo appunto all'RNAi [39, 40]. Nel lievito *S. pombe*, e in seguito in *Drosophila* e sistemi vertebrati, è stato trovato che un processo simile tiene le regioni eterocromatiche condensate e quindi sopprime la trascrizione. Oltre che alla formazione della struttura della eterocromatina, la RNAi risulta essere coinvolta anche nel dare struttura al centromero [41]. In più, è stato osservato che mediante il sistema dell'RNAi viene regolata anche l'attività dei geni nelle immediate vicinanze di blocchi condensati di cromatina. Il fenomeno non è ancora stato compreso a livello molecolare, anche se sembrano giocare un ruolo importante i miRNA che, accoppiandosi con sequenze complementari del DNA, modificano le proprietà dei cromosomi cambiando il livello di metilazione o di legame con gli istoni. Sembra che ciò avvenga in seguito al legame del dsRNA, complementare a quella particolare sequenza di DNA, al complesso RITS (RNA-induced transcriptional silencing). Nel lievito, questo complesso contiene la proteina argonaute, la proteina chromodomain Chp1, e la proteina chiamata Tas3 la cui funzione è sconosciuta [42]. È stato dimostrato inoltre che i piccoli RNA [43] e il macchinario di silenziamento dell'RNA hanno la capacità di dirigere la formazione di eterocromatina silente tramite la metilazione della lisina 9 dell'istone H3 [44]. L'induzione e la dispersione di regioni eterocromatiche richiedono le proteine argo e RdRP. Infatti, l'eliminazione di questi geni nel lievito *S. pombe* sconvolge la metilazione degli istoni e la formazione del centromero, causando un rallentamento o un blocco dell'anafase durante la divisione cellulare [45]. È comunque evidente che questa azione sulla cromatina è molto importante per il corretto funzionamento del genoma e per il mantenimento della sua integrità.

Appare chiaro come il meccanismo dell'interferenza RNA sia coinvolto in molti processi e tutti di vitale importanza per lo sviluppo e la sopravvivenza cellulare. Nella seguente figura sono schematizzati tutti i principali ruoli descritti per RNAi.



**Figura 14** Processi cellulari dipendenti dall'RNAi machinery. I complessi Dicer e RISC svolgono un ruolo importante nella distruzione di RNA virale estraneo (1), l'eliminazione di trascritti da elementi mobili come i trasposoni e DNA ripetitivo (2), il blocco della sintesi proteica condotta da miRNA generati dentro la cellula (3), e inibizione della trascrizione attraverso la condensazione della cromatina (4). Il macchinario RNAi è anche utilizzato quando siRNA è introdotta sperimentalmente nelle cellule per inibire l'attività di un gene specifico (5) [11].

## 5. VARIAZIONE TRA ORGANISMI ED EVOLUZIONE

La capacità di acquisire un dsRNA esterno e quindi indirizzarlo nel pathway della RNAi cambia secondo l'organismo. Gli effetti dell'interferenza RNA possono essere sia sistematici sia ereditabili nelle piante e *C. elegans*, mentre non lo è in *Drosophila* e mammiferi. Nelle piante, si pensa che RNAi si propaghi tramite il trasferimento di siRNA tra le cellule attraverso plasmodesmi (canali nelle pareti cellulari che permettono la comunicazione e i trasporti). L'ereditarietà deriva dalla metilazione dei promotori bersaglio dell'RNAi; il pattern di metilazione è mantenuto e copiato in ogni nuova generazione [46]. Una distinzione generale tra piante e animali si trova nel comportamento dei miRNA prodotti in modo endogeno; nelle piante, i miRNA sono di solito

perfettamente o quasi complementari ai loro geni target e induce quindi un taglio nell'mRNA, mentre negli animali i miRNA tendono ad essere più divergenti nella sequenza e inducono una repressione traslazionale.

In alcuni protozoi eucariotici, come *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*, manca interamente il pathway dell'RNA interference [47, 48]. La maggior parte o tutti i componenti del pathway sono mancanti anche in alcuni funghi, in particolare in *Saccharomyces cerevisiae*, mentre uno studio recente ha però rivelato la presenza di RNAi in altre specie di lievito come *Saccharomyces castellii* e *Candida albicans*. Il fatto che in alcuni ascomiceti e basidiomiceti manca l'RNAi machinery indica che le proteine necessarie per il silenziamento dell'RNA sono state perse in modo indipendente da molte famiglie di funghi, probabilmente a causa dell'evoluzione di un nuovo pathway con funzioni simili, o per la mancanza di un vantaggio selettivo in alcune nicchie [49]. L'espressione genica nei procarioti è influenzata da un sistema basato sull'RNA simile in alcuni aspetti all'interferenza RNA. In questi organismi, infatti, i geni codificanti per RNA controllano l'abbondanza o la traduzione degli mRNA producendo un RNA complementare che si accoppia quindi al messaggero. Tuttavia questi RNA regolatori non sono generalmente considerati analoghi dei miRNA perché non è coinvolto l'enzima Dicer [50]. È stato suggerito che il sistema di interferenza CRISPR nei procarioti sia analogo al sistema di interferenza RNA negli eucarioti, sebbene nessuna delle componenti proteiche sia omologa [51].

Sulla base di un'analisi filogenetica, il più recente e comune antenato di tutti gli eucarioti era molto probabilmente già in possesso di un primo RNAi machinery. L'assenza del pathway in alcuni eucarioti ha fatto pensare ad una caratteristica derivata [52]. Questo sistema di RNAi ancestrale conteneva probabilmente almeno una proteina Dicer-like, un argonauta, una proteina Piwi, e una RdRP che potevano anche aver svolto altri ruoli cellulari. Studi su larga scala di genomica comparativa indicavano che il gruppo degli eucarioti corona già possedevano queste componenti, che potevano quindi essere associati da un punto di vista funzionale con gli esosomi e cioè con la degradazione dell'RNA [53]. Questo studio suggerisce anche che la famiglia di proteine argonauta, che è condivisa tra gli eucarioti, la maggior parte degli Archea, e almeno alcuni batteri (come *Aquifex eailicus*), è omologa e si è originariamente evoluta da componenti di un iniziale sistema di traduzione. È generalmente accettato che la funzione ancestrale del sistema RNAi sia stata di difesa immunitaria contro elementi genetici esogeni, come trasposoni e genomi virali [52, 54]. Funzioni correlate come la modifica degli istoni potrebbero essere già state presenti in un antenato dei moderni eucarioti, anche se altre funzioni come la regolamentazione dello sviluppo da parte di miRNA si pensa si siano evolute in seguito [52]. I geni dell'RNA interference, come componenti

del sistema immunitario antivirale innato in molti eucarioti, sono coinvolti quindi in una lotta evolutiva contro i geni virali. Studi di velocità evolutiva in *Drosophila* hanno dimostrato che i geni del pathway RNAi sono soggetti ad una forte selezione direzionale e sono tra i geni più veloci ad evolvere nel genoma del sistema [55].

## 6. PROSPETTIVE FUTURE

### 6.1 siRNA nella ricerca di base

Dopo la scoperta della RNAi in *C. elegans* [10] le crescenti conoscenze sulla RNAi hanno fornito ai ricercatori nuovi e potenti strumenti utilizzabili in vitro e in vivo per analizzare la funzione dei geni. RNA a doppio filamento viene sintetizzato con una sequenza complementare al gene d'interesse e introdotto in una cellula o organismo, dove è riconosciuto come materiale genetico esogeno e attiva il processo della RNAi. Usando questo meccanismo, i ricercatori possono causare un drastico calo nell'espressione del gene target e studiando gli effetti di questa diminuzione si può ricavare il ruolo fisiologico del gene prodotto. Ovviamente questa tecnica non è applicabile al silenziamento di geni essenziali la cui inattivazione comprometterebbe la vitalità della cellula. Dal momento che RNAi non abolisce totalmente l'espressione del gene viene chiamata tecnica knockdown, come già detto in precedenza. Sforzi massivi di biologia computazionale sono stati diretti verso il disegno di dsRNA di successo che massimizzino il gene knockdown ma minimizzando gli effetti off-target. Con il termine off-target si indicano gli effetti aspecifici e nascono quando un RNA introdotto ha una sequenza che può dare un'ibridazione crociata con trascritti contenenti regioni di omologia parziale con la sequenza del siRNA. In questo caso si riduce l'espressione di molti geni con prodotti proteici coinvolti in differenti funzioni cellulari contemporaneamente. Questi problemi accadono più frequentemente quando i dsRNA contengono sequenze ripetitive. È stato stimato da studi sul genoma di *H. sapiens*, *C. elegans* e *S. pombe* che circa il 10 % dei possibili siRNA possono avere sostanzialmente degli effetti off-target [17] e per questo sono stati implementati degli algoritmi per il disegno di siRNA che sono automaticamente controllati per eventuali reazioni crociate. Ciò è di fondamentale importanza, poiché questi effetti aspecifici sull'espressione cellulare non sono transitori e, una volta attivati, sono sostenuti durante l'intero corso del trattamento con il siRNA. A seconda dell'organismo e del sistema sperimentale, dsRNA esogeni possono essere disegnati come un lungo filamento per essere quindi tagliati dal Dicer oppure come piccoli dsRNA che

fungono come siRNA. Lunghi dsRNA (alcune centinaia di paia di basi) possono essere usati per indurre artificialmente RNAi in funghi, piante, insetti e vermi. Si sono incontrati in questo modo, invece, alcuni potenziali ostacoli all'utilizzo della RNAi nelle cellule di mammifero poiché lunghe molecole di dsRNA (generalmente più lunghe di 30 bp) inducono la risposta dell'interferone, una forma di immunità innata che reagisce in modo non specifico a materiale genetico estraneo [56]. La maggioranza delle cellule di mammifero sono capaci di esercitare, infatti, una potente risposta antivirale se esposte ad intermedi di replicazione virale in forma di dsRNA. Una componente cruciale di questa risposta è una proteina chinasi attivata dal dsRNA, la PKR, che fosforila e inattiva EIF-2a inducendo a sua volta l'inibizione generalizzata della traduzione. Inoltre, il dsRNA attiva il sistema della 2,5'-oligoadenilato polimerasi/RNasi L e reprime IκB, portando alla morte cellulare programmata. Tuttavia, Elbashir e coll. [57] hanno descritto la possibilità di innescare il sistema della RNAi nelle cellule di mammifero usando corti siRNA (21-22 nt) sintetizzati in vitro in modo tale che abbiano la struttura di un miRNA e senza indurre la risposta dell'interferone e la conseguente risposta apoptotica. Dal momento che la presenza citosolica dei miRNA è del tutto naturale tale approccio promette infatti di essere molto efficace, permettendo di incorporare minori concentrazioni di siRNA per avere un silenziamento molto più efficiente e selettivo. Gli ovociti e le cellule embrionali di topo ai primi stadi sono privi invece di questa reazione a dsRNA esogeni e sono quindi un comune sistema modello per lo studio di effetti knockdown nei mammiferi [58].

È stato dimostrato che la progettazione del duplex di siRNA per il silenziamento genico richiede l'accurata conoscenza di un segmento dell'mRNA bersaglio e sono ottimali quando ricalcano i prodotti naturali di Dicer, ovvero aventi dimensioni comprese fra 21 e 23 nucleotidi, contenenti estremità terminali 5'-fosfato e 3'-idrossi, e aventi un'estremità coesiva simmetrica di due nucleotidi (tipicamente TT). Le regioni di un mRNA bersaglio possono essere identificate selezionando una sequenza di DNA situata almeno 50 basi a valle del codone di inizio della traduzione [57]. La sequenza di cDNA tipicamente ricercata a questo scopo è un motivo di 30 nucleotidi costituito da AA(N19)TT con un contenuto di GC dal 30% al 50% [57]. Per confermare l'unicità della sequenza bersaglio nell'mRNA è necessario condurre una ricerca in banca dati con Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). L'uso di un siRNA "scrambled", che contiene la stessa composizione nucleotidica del siRNA ma non ha omologia di sequenza con il gene bersaglio o con altri geni del genoma, fornisce un importante controllo negativo. Ovviamente, nella pianificazione di un esperimento d'interferenza RNA è necessario valutare alcuni importanti fattori. Innanzi tutto le condizioni di trasfezione (es. la concentrazione di siRNA) devono essere ottimizzate a seconda del sistema di trasfezione usato e dipendono soprattutto dalla densità delle cellule e dall'efficienza dell'inattivazione rispetto agli effetti aspecifici. Poiché l'efficienza di trasfezione varia

considerevolmente, è necessario per ciascun tipo cellulare testare diversi reagenti e condizioni di trasfezione. Inoltre, va tenuto in considerazione il contenuto di siero del terreno, dal momento che alcuni sistemi richiedono una quantità minore di siero per l'ottenimento di una trasfezione ottimale. Idealmente, per un nuovo bersaglio vanno progettati e sottoposti a screening da tre a quattro potenziali siRNA, e per massimizzare l'efficienza della somministrazione dei siRNA è necessaria anche l'ottimizzazione dei parametri di trasfezione. Per definire il tempo ottimale necessario a silenziare efficientemente un gene si procede di solito alla valutazione dell'andamento temporale dell'esperimento. Parametri come l'abbondanza relativa e la velocità di turnover dell'mRNA bersaglio possono influire notevolmente sul tempo necessario per il silenziamento. Tipicamente, gli effetti possono essere osservati dopo 24-72 ore. Talvolta invece si verifica la diminuzione dell'mRNA senza evidenti riduzioni del livello di proteina; ciò potrebbe suggerire che si tratta di una proteina estremamente stabile o abbondante.

Al fine di indurre un silenziamento genico efficiente riducendo i potenziali effetti indesiderati, come le reazioni aspecifiche e la morte della cellula, è fondamentale l'ottimizzazione anche della concentrazione di siRNA utilizzato e per questo si rende necessaria una sua titolazione. Con questo approccio si tende generalmente ad assumere che il siRNA inibirà selettivamente il gene ad esso complementare. Tuttavia è stato osservato che il siRNA può avere conseguenze aspecifiche non solo a causa della sua sequenza, come già detto, ma anche in modo dipendente dalla concentrazione. Ad esempio, alcuni ricercatori hanno riportato che per il loro sistema di analisi la presenza di effetti aspecifici si verificava ad una concentrazione 100 nM ma non ad una concentrazione 20 nM [59]. In modo assai consueto con una concentrazione di siRNA 100 nM, spesso suggerita dai produttori di siRNA, sono stati osservati con regolarità effetti aspecifici [60] sottolineando quindi l'importanza di determinare la concentrazione più bassa raggiungibile in modo da evitarne la comparsa. La concentrazione più efficace di siRNA può essere influenzata dal gene da silenziare, dal tipo di cellula da trasfettare e dallo stesso siRNA e quindi diventa importante l'utilizzo di un controllo negativo per la progettazione dell'esperimento e l'interpretazione dei risultati. Il controllo negativo va eseguito mediante l'utilizzo di un siRNA "scrambled" così da garantire che gli effetti misurati sono effettivamente specifici.

Un altro parametro da tenere in considerazione è la densità di piastratura che deve essere determinata con la trasfezione di cellule piastrate a diversi livelli di confluenza. Con il termine confluenza s'intende la misura di affollamento delle celle in una piastra. Ad esempio, una confluenza del 100% significa che la piastra è completamente coperta dalle cellule e non c'è più spazio disponibile per la crescita di nuove cellule, mentre con il 50% circa la metà della piastra è coperta e c'è spazio per nuove cellule. Una confluenza ottimale dovrebbe essere compresa fra il

30% e il 70% e dipende dell'agente di transfezione e dal tipo cellulare usato. Se la densità cellulare è troppo alta o troppo bassa, l'efficienza di transfezione può essere ridotta. Per una maggiore riproducibilità degli esperimenti, le cellule dovrebbero essere trasfettate a densità corrispondenti per ciascun esperimento, seguendo una cronologia definita fra la tripsinizzazione e la piastratura. Questa densità dovrebbe essere usata per tutti gli esperimenti successivi. Un altro fattore da valutare per ottimizzare l'efficienza è il volume di agente di transfezione utilizzato.

Come già citato, nella progettazione degli esperimenti con i siRNA è importante valutare l'efficienza del silenziamento rispetto agli effetti aspecifici indesiderati. Ad esempio, nella progettazione dell'esperimento dovrebbe essere tenuta in considerazione la velocità di turnover della proteina bersaglio. Le proteine con un maggiore tempo di semivita richiedono un'incubazione più lunga per produrre un silenziamento efficace a livello della proteina. Di conseguenza, le proteine con un'emivita molto lunga, dell'ordine di settimane, non rappresentano dei buoni bersagli per questa tecnica. Un altro fattore importante è l'abbondanza della proteina. Il knockdown di una proteina ad alta abbondanza richiede, infatti, una dose maggiore di siRNA.

Mentre si è già discusso dei metodi di trasfezione nel paragrafo 3.2, resta ora da vedere i metodi di sintesi dei siRNA da usare nelle cellule di mammifero. I siRNA possono essere generati per sintesi chimica, trascrizione in vitro, amplificazione mediante PCR, o digestione di un lungo dsRNA con un enzima della famiglia della RNasi III. Tutte queste forme di siRNA possono essere quindi trasfettate nelle cellule con l'uso del metodo che fornisce un'efficienza ottimale per il siRNA. Diverse aziende biotecnologiche forniscono siRNA sintetizzati chimicamente di alta qualità, ed è disponibile un numero sempre crescente di siRNA prevalidati. Tuttavia, dal momento che potrebbe essere necessario eseguire lo screening di svariati siRNA prima di trovare un efficiente bersaglio di knockdown, la sintesi chimica è un'alternativa poco economica quando si progetta l'esperimento iniziale. In alternativa, i siRNA possono essere trascritti in vitro in modo tale che la sequenza contenga un sito di riconoscimento per la RNA polimerasi [61]. Questo metodo rappresenta una scelta più valida dal punto di vista economico, poiché i siRNA possono essere prodotti rapidamente e usati per lo screening di più sequenze bersaglio o per il silenziamento di più geni. Le limitazioni dei siRNA sono relative alla natura transitoria della soppressione e alla restrizione imposta dalla velocità di divisione cellulare. Bisogna ricordare, infatti, che i siRNA non sono né amplificati né propagati nelle cellule di mammifero. Un altro sistema di produzione dei siRNA da usare per la transfezione transiente prevede l'uso di lunghi RNA che vengono trascritti in vitro e quindi digeriti con un enzima della famiglia delle RNasi III producendo una popolazione di siRNA specifici per il trascritto bersaglio. Questa tecnica evita la fase di progettazione e valutazione di diverse sequenze di siRNA per l'individuazione della forma capace di silenziare il gene bersaglio. Tuttavia, questo

approccio lascia aperta la possibilità di silenziare in modo aspecifico i geni che hanno sequenze correlate. Infine, è possibile creare dei siRNA mediante PCR usando primer progettati in modo da contenere un promotore della RNAPol III, una sequenza a forcina per la generazione di siRNA e un sito di terminazione per la RNAPol III [62]. È importante considerare che la soppressione transitoria e mirata dell'espressione di un gene possa limitare i risultati dell'esperimento a causa della bassa efficienza di transfezione e dello spegnimento transitorio del gene. Tipicamente, in un esperimento di transfezione transitoria solo una frazione delle cellule esprime il siRNA e quindi subisce il silenziamento del prodotto genico desiderato. Di conseguenza, anche se questa tecnica è rapida e semplice, l'effetto è limitato nel tempo ed è ristretto alle cellule che possono essere trasfettate con facilità. A causa di questi limiti della transfezione transiente con i siRNA, sono stati progettati sistemi plasmidici che esprimono corti RNA a forcina (shRNA) e permettono di trasfettare le cellule in modo stabile [63, 64]. Affinché si possa avere una struttura a forcina, la sequenza dell'RNA trascritto deve avere due sequenze ripetute e invertite separate da un loop così che formi un'ansa tra le regioni appaiate. Il dsRNA così sintetizzato dà il via quindi a un'efficace silenziamento genico [65]. Anche se comporta un procedimento più lungo della transfezione transiente, la soppressione stabile e mirata dell'espressione genica permette di selezionare progenie cellulari con fenotipi persistenti e stabilizzati nel tempo [64]. Questa tecnica rende inoltre possibile lo spegnimento stabile di un gene in svariati tipi cellulari, e i plasmidi che esprimono gli shRNA sono facilmente introducibili nelle cellule con le metodiche di transfezione convenzionali.

Questi appena descritti sono i principali risultati della ricerca attuale per quanto riguarda metodologie per indurre il meccanismo dell'interferenza RNA e ovviamente i punti di partenza per lo sviluppo di nuove tecniche per effettuare screening in cellule di mammifero sempre più efficaci e selettive.

## ***6.2 siRNA in biotecnologia***

L'interferenza RNA è stata usata per applicazioni in biotecnologia, in particolar modo nello sviluppo di piante che producano bassi livelli di tossine naturali così che possano essere introdotte nell'alimentazione. Queste tecniche sfruttano il fatto che nelle piante il fenotipo dell'RNAi è stabile ed ereditabile. Per esempio, i semi di cotone sono ricchi delle proteine che devono essere assunte con la dieta, ma contengono un prodotto tossico, il gossipolo, rendendoli inutilizzabili per il consumo umano. RNAi è stata utilizzata per produrre stock di cotone i cui semi contengono ridotti livelli di delta-cadinene synthase, un enzima chiave nella produzione di gossipolo, senza influenzare

la produzione dell'enzima in altre parti della pianta dove il gossipolo è importante nella prevenzione di danni da parassiti delle piante [66]. Altri risultati ottenuti in campo vegetale sono la riduzione dei livelli di allergeni nelle piante di pomodoro [67] e la riduzione dei precursori di carcinogeni nelle piante di tabacco [68]. Anche se molti prodotti non hanno ancora passato la fase sperimentale, gli studi proseguono a tal riguardo.

Un altro esempio è studio recente [69] molto particolare che ha mostrato come si può utilizzare il principio dell'RNAi per la progettazione di un nuovo un anti-zanzare. Infatti, un gruppo di ricercatori cinesi, Kun Yan Zhu (professore di entomologia) e i membri del team Xin Zhang e Jianzhen Zhang, ha utilizzato nanoparticelle (riguardo la tecnica si parlerà in seguito) per somministrare RNA a doppio filamento alle larve di zanzara nel momento in cui si cibano. Il dsRNA è stato disegnato in modo da impedire lo sviluppo rendendo così l'insetto più sensibile ai pesticidi. In particolare, l'interferenza RNA è stata utilizzata per silenziare il gene responsabile della produzione della chitina, la principale componente dell'esoscheletro negli insetti, nei crostacei e negli aracnidi. L'efficacia non è ancora del 100% ma in ogni caso le zanzare risultano più deboli e i pesticidi riescono a penetrare l'esoscheletro più facilmente. Se il gene che sintetizza la chitina venisse del tutto silenziato, le zanzare morirebbero evitando quindi anche l'uso dei pesticidi. Poiché il dsRNA si diluisce velocemente, non può in teoria essere somministrato direttamente e per questo si ricorre all'utilizzo delle nanoparticelle. Il gruppo ha notato che facilitano l'ingestione, perché non si dissolvono e stabilizzano anche l'RNA nell'acqua. In futuro dunque potranno essere messe a punto esche a base di nanoparticelle per tenere sotto controllo lo sviluppo degli insetti. Il sistema tra l'altro è innocuo sia per l'ambiente sia per gli altri organismi: il silenziamento, infatti, può essere fatto su geni specifici della zanzara e le nanoparticelle sono formate da chitosano, un polimero della D-glucosammina biodegradabile. Altri insetti potrebbero essere controllati con questa tecnica: Zhu e i suoi collaboratori hanno sperimentato il loro sistema anche contro la piralide del mais, un importante parassita che produce consistenti danni economici all'agricoltura, e contro le cavallette. In questi casi però non sono state utilizzate le nanoparticelle perché non si tratta di organismi acquatici.

## 6.3 siRNA nella ricerca medica

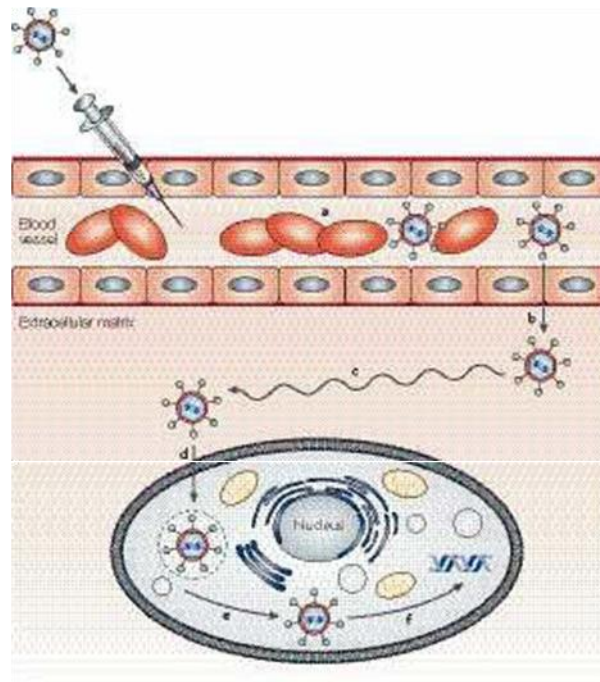
La scoperta del meccanismo dell'interferenza RNA oltre che introdurre nuove tecniche nell'ambito biochimico, ha aperto orizzonti incredibili per la cura di molte malattie. Infatti, il potenziale terapeutico degli RNAi è stato ormai messo in evidenza in numerosi esperimenti che ne mostrano l'efficacia nei confronti di diverse patologie fra cui la sclerosi laterale amiotrofica, la degenerazione maculare dell'anziano o il cancro. Molto interessante e promettente è lo studio che ha evidenziato l'efficacia di RNAi anche nei confronti dell'infezione del virus dell'HIV in cellule in coltura. Inoltre, sono in corso anche alcuni trials clinici che usano strategie già basate su RNAi per quanto riguarda, ad esempio, l'infezione da virus respiratorio sinciziale. Inoltre l'uso della RNAi nelle cellule umane apre nuove potenzialità alla terapia genica [70] grazie alla soppressione stabile delle proteine patogenetiche. Dal momento che l'interferenza dell'RNA non si verifica direttamente sul DNA, ma solo sulla sua copia (mRNA), potrebbero essere scavalcati tutti i problemi legati all'etica. In questo modo, nella terapia genica per curare malattie ereditarie anche gravi non si interverrebbe più sul codice genetico dell'individuo: l'intervento non comporterebbe la sostituzione in blocco del gene malato, ma la distruzione del suo intermedio di RNA, bloccando la produzione della proteina responsabile della disfunzione. Interrompendo il flusso dell'informazione "malata" si interverrebbe pertanto in modo etico e queste terapie farmacologiche sarebbero considerate alla stregua dei medicinali attualmente in commercio.

Attualmente si stanno sviluppando diverse terapie basate su RNAi tanto che recentemente sono stati riportati i successi di numerosi esperimenti pilota. Questi sviluppi recenti nelle applicazioni terapeutiche di RNAi sono senza dubbio imputabili al superamento di problematiche correlate con la veicolazione *in vivo* dei siRNA.

### 6.3.1 Problematiche riguardanti la veicolazione *in vivo*

La veicolazione cellulo-specifica di siRNA *in vivo* rappresenta il principale aspetto da prendere in considerazione nello sviluppo di un efficace agente terapeutico basato su RNAi e numerosi sono gli ostacoli che i siRNA possono incontrare nel tentativo di entrare in contatto diretto con la cellula. Innanzi tutto si deve tenere in considerazione che la distribuzione di siRNA dipende dall'accessibilità dell'organo bersaglio all'interno del corpo. Rilasci localizzati (*local delivery*), cioè applicazioni di terapie siRNA direttamente sull'organo bersaglio, offrono molti benefici, inclusa la potenziale alta biodisponibilità data dalla prossimità al tessuto target e la riduzione di effetti negativi tipicamente associati con una somministrazione sistemica. Al contrario, un rilascio

sistemico, iniezione intravenosa delle particelle di trasporto che poi viaggiano nel corpo fino all'organo o al tessuto bersaglio, richiede che le particelle abbiano l'abilità di evitare l'uptake e l'eliminazione da parte di tessuti non-target. Una somministrazione sistemica dei siRNA è spesso necessaria poiché molti tessuti non sono direttamente accessibili, ma possono essere raggiunti mediante particelle nel flusso sanguigno. Formulazioni di siRNA per applicazioni sistemiche affrontano però tutta una serie di ostacoli *in vivo* prima di raggiungere il citoplasma delle cellule target (Figura 15), che saranno di seguito brevemente descritti.



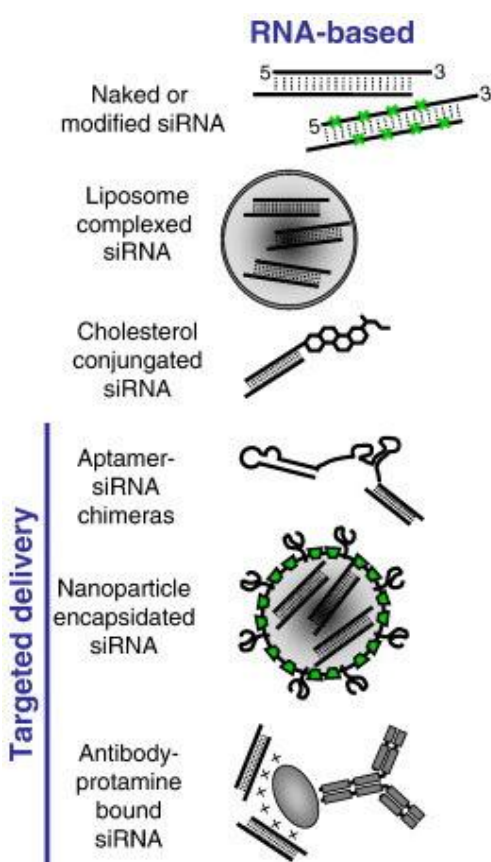
**Figura 15** Barriere fisiologiche alla distribuzione sistemica di nanoparticelle di siRNA. Un'iniezione di nanoparticelle deve:

- evitare la filtrazione, fagocitosi e degradazione nel flusso sanguigno (a);
- essere trasportato attraverso l'endotelio del vaso sanguigno (b);
- diffondere nella matrice extracellulare (c);
- essere internalizzato dentro la cellula (d);
- evitare l'endosoma (e);
- e rilasciare i siRNA (f) [71].

Dopo l'iniezione, i complessi di siRNA devono procedere nel sistema circolatorio del corpo evitando la filtrazione del rene, l'uptake dei fagociti, l'aggregazione con proteine del siero e degradazione enzimatica di nucleasi endogene [72]. La fagocitosi serve come barriera immunologica, non solo nel torrente sanguigno ma anche nella matrice extra-cellulare dei tessuti. Sfortunatamente, i fagociti sono molto efficienti nella rimozione di certi nano-complessi terapeutici e macromolecole dal corpo, per cui si deve tenerne di conto durante l'ottimizzazione del veicolo di trasporto del farmaco. Un altro ostacolo che le nostre particelle devono affrontare è il passaggio attraverso la parete del vaso sanguigno. In generale, molecole più grandi di 5 nm di diametro non riescono ad attraversare l'endotelio del capillare, e perciò rimarranno in circolo finché non sono

eliminate dal corpo. Ci sono comunque alcuni tessuti che permettono l'entrata di molecole più grandi, per esempio il fegato, la milza e alcuni tumori. Questi tessuti permettono il passaggio di molecole con un diametro fino a 200 nm e quindi anche i tipici nanocarrier [73]. Dopo che un complesso siRNA ha lasciato il flusso sanguigno, deve diffondere attraverso la matrice extracellulare che è un denso network di polisaccaridi e proteine fibrose che possono creare resistenza al trasporto di nanoparticelle e macromolecole. Ciò può rallentare o addirittura arrestare il processo di distribuzione del farmaco e creare un'ulteriore opportunità d'azione ai macrofagi. Una volta raggiunta la cellula target, le particelle devono uscire dall'endosoma e raggiungere il citoplasma. Se il nanocomplesso di siRNA è incapace di uscire dall'endosoma, va incontro ad un processo degradativo mediato dal lisosoma. Infine, il siRNA deve essere rilasciato dal carrier così che possa indurre il processo di silenziamento.

Finora abbiamo considerato il caso che il siRNA sia somministrato insieme ad un carrier, ma problematiche analoghe si hanno anche iniettando siRNA *naked* (letteralmente "nudo", cioè senza nessun altro supporto) (Figura 16). In questo caso c'è anche da considerare che i siRNA duplex, essendo polimeri carichi negativamente, sono incapaci di penetrare facilmente le membrane



**Figura 16** Varie strategie di veicolazione in vivo di farmaci basati su siRNA sia veicolazione specifica che non specifica [75].

cellulari idrofobiche senza l'assistenza di carriers come i liposomi o nanoparticelle. Inoltre, enzimi quali le RNasi sieriche, intervengono degradando rapidamente siRNA non protetti e non modificati. Risultano essere quindi fondamentali le modifiche chimiche con funzione stabilizzante, cioè tutte quelle alterazioni che possono essere impiegate per aumentarne l'emivita e la funzionalità *in vivo*. Sono particolarmente utili modificazioni chimiche a livello della posizione 2' del ribosio, per esempio mediante metilazione o fluorurazione, in quanto portano ad un aumento della stabilità dei siRNA. Infatti, tali alterazioni strutturali sono in grado di generare resistenza nei confronti dell'attività delle RNasi a livello sierico ma la realizzazione di queste modifiche è comunque un processo delicato. Inoltre è stato mostrato che la metilazione in posizione 2' riduce l'induzione dell'interferone e conferisce resistenza all'attività endonucleasica [74]. Un valido metodo di veicolazione sistemica non selettiva di siRNA riguarda

l'iniezione intravenosa di siRNA chimicamente modificati o coniugati con il colesterolo o immagazzinati all'interno di particelle liposomiali protettive (Figura 16). Questa forma non selettiva di veicolazione risulta particolarmente adatta per alcuni tipi di tessuti come il fegato ed il digiuno, ma non lo è per la veicolazione/rilascio in altri specifici tipi cellulari. I gruppi di colesterolo legati chimicamente all'ossidrile in 3' del filamento di siRNA che verrà in seguito degradato, facilitano l'uptake cellulare del siRNA attraverso il processo di endocitosi mediata recettorialmente. È stato mostrato come questo approccio sia impiegato con successo per il rilascio di siRNA all'interno del fegato o del digiuno in seguito a somministrazione nei topi [76]. Lo studio si basava sull'uso di siRNA diretti contro la apolipoproteina B (ApoB) per modificare il metabolismo del colesterolo. È stata riscontrata una riduzione superiore al 50% nell'mRNA di ApoB a livello epatico ed una riduzione del 70% a livello intestinale; inoltre fu osservato un abbassamento dei livelli di colesterolo complessivo. Questi risultati hanno dunque dimostrato che i siRNA rilasciati possono essere veicolati ai tessuti mediante la coniugazione con specifiche molecole che promuovono l'uptake cellulare.

Però non tutti i tessuti sono in grado di internalizzare siRNA *naked* o modificato e per questo si ha il bisogno di incorporare l'acido nucleico in una carrier. Questi veicoli sono disegnati in modo da facilitare l'uptake nel tessuto bersaglio e, nel caso di distribuzione sistemica, limitare l'aspecificità nella consegna dell'RNA. Nella progettazione dei carrier si deve ovviamente porre particolare attenzione alle caratteristiche della superficie poiché è con questa che interagisce. La carica superficiale delle nanoparticelle può notevolmente influenzare, infatti, il modo con cui interagisce con la cellula bersaglio e altre molecole fisiologiche. Nell'ambiente semplificato *in vitro*, una carica positiva sul carrier può facilitare l'uptake mediante interazione con la superficie negativa della membrana cellulare [77]. Una carica positiva promuove anche la formazione di complessi e l'impaccamento con le molecole polianioniche di siRNA. La situazione diventa comunque più complicata *in vivo* per la presenza nel flusso sanguigno di proteine cariche negativamente che spesso legano i nanocomplessi positivi rendendoli inefficaci. Per mitigare questo fenomeno, può essere utile aggiungere polietilenglicole (PEG) o altri composti idrofilici sulla superficie [78]. Il PEG inoltre può controllare le dimensioni della particella e prevenirne l'aggregazione nel siero [78]. Un rivestimento delle nanoparticelle con molecole idrofile come il PEG può rivestire un ruolo importante nell'abilità dei carrier di evadere il sistema immunitario e i fagociti. PEG forma una barriera attorno alla particella conferendogli stabilità sterica e protezione dall'ambiente fisiologico. Un'altra cosa da considerare è la lunghezza della catena del PEG che deve essere ottimizzata per ogni sistema di trasporto utilizzato. Da quanto detto è evidente che sono fondamentali la

progettazione del carrier e la protezione dei siRNA. Vediamo ora alcuni esempi di carrier. Descritte le caratteristiche generali dei carrier, passiamo ora a considerare alcuni esempi.

Per ottenere il rilascio sistemico di siRNA sono stati impiegati siRNA chimicamente stabilizzati e incapsulati in doppi strati lipidici specializzati, noti come particelle stabili acido nucleico - lipide (SNALP). Il doppio strato delle SNALP è costituito da lipidi cationici e neutri, che sono rivestiti in superficie da uno strato di PEG. Questo metodo sembra essere particolarmente efficace per target espressi a livello epatico. Un aspetto chiave da tenere in considerazione ai fini di un impiego terapeutico per gli RNAi riguarda il dosaggio dei siRNA che deve essere somministrato per ottenere l'efficacia desiderata *in vivo*. Il rilascio sistemico con target selettivo dei siRNA verso recettori specifici localizzati sulla superficie cellulare risulta conveniente a bassi dosaggi, che oltretutto riducono i potenziali effetti off-target nei tessuti non bersaglio.

Da un punto di vista applicativo, un altro possibile approccio prevede un accoppiamento dei siRNA terapeutici con frammenti di anticorpi e aptameri oppure impacchettati in nanoparticelle rivestite con ligandi che hanno come bersaglio i recettori (Figura 15). Queste strategie di rilascio cellulo-specifiche facilitano l'incorporazione dei siRNA tramite l'endocitosi. È possibile, infatti, progettare ligandi strutturati di RNA noti come aptameri che possono legarsi con specifici recettori della superficie cellulare e coniugarli covalentemente a siRNA per il rilascio cellulo-specifico *in vivo* [79]. Le molecole di siRNA vengono rilasciate dall'aptamero durante il processo di ingresso all'interno della cellula. Le nanoparticelle rappresentano un ulteriore potente approccio per il rilascio sistemico selettivo di molecole che inducono RNAi. Questi veicoli sono stati studiati e progettati per trasportare grandi carichi protetti di siRNA alle cellule bersaglio, in maniera estremamente specifica. In particolare, l'indirizzamento al bersaglio è garantito da un rivestimento sulla superficie delle nanoparticelle costituito da ligandi cellulo-specifici. Per esempio, un team di ricercatori guidato da Kijames J. descrive come il polimero chitosano possa essere utilizzato come base per l'assemblaggio di nanoparticelle in cui intrappolare le molecole di siRNA [80]. Queste nanoparticelle, che sono stabilizzate da forti interazioni intermolecolari tra il chitosano carico positivamente e le molecole di RNA cariche negativamente, sono rapidamente captate dalle cellule tumorali utilizzate in coltura. Cosa più importante era però che i siRNA venivano efficacemente trasferiti nel citoplasma inducendo una drastica diminuzione della sintesi di una proteina associata al tumore ben del 90%. Sulla base di questi risultati promettenti, i ricercatori sono passati alla sperimentazione *in vivo* su topi progettati per produrre la green fluorescent protein (GFP) nelle cellule del polmone. Le nanoparticelle sono state somministrate nebulizzate attraverso il naso riscontrando con successo una riduzione della sintesi della GFP nel 43% di animali vivi.

Nell'utilizzo di siRNA nella cura di malattie croniche si deve tener conto che esse richiedono un trattamento a lungo termine con RNAi, il quale deve essere veicolato quindi da vettori di espressione virale. Lo sviluppo dei vettori virali è stato pertanto ipotizzato come strategia alternativa per alcune patologie. Come già accennato nel paragrafo 3.2, è possibile sintetizzare shRNA *in vivo* incorporandoli in vettori plasmidici. Sebbene ciò sia stato realizzato anche con cellule di mammifero, in cellule neuronali e cellule emopoietiche, sono state incontrate non poche difficoltà. Infatti, il rilascio *in vivo* di questi plasmidi e l'integrazione dei loro transgeni non sempre hanno fornito risultati positivi [81]. Permangono, infatti, le problematiche riguardanti la direzionalità dei vettori virali a specifici tipi cellulari e la minimizzazione della loro tossicità. L'impiego di vettori virali costituisce una metodica facile da utilizzare e che permette di trasfettare in modo efficiente, tanto che lo sviluppo di tali vettori, negli ultimi anni, ne ha permesso l'utilizzo.

### 6.3.2 Applicazioni terapeutiche

Viste le potenzialità dell'utilizzo dei siRNA in cure mediche, si stanno sviluppando diverse terapie basate su RNAi grazie al superamento di problematiche correlate con la veicolazione. Ad esempio, il rilascio sistemico di quantità terapeutiche dei siRNA diretti contro la ApoB negli scimpanzé, è stato recentemente realizzato attraverso l'uso di liposomi a doppio strato. Questa e altre importanti prove hanno dunque aperto la strada al possibile impiego di RNAi in terapia.

C'è però da tenere in considerazione nello sviluppo di una terapia che il meccanismo di amplificazione descritto nel paragrafo 3.3 non genera un silenziamento permanente nel tempo. Infatti, si osservano effetti terapeutici per 3-7 giorni in cellule in rapida divisione, mentre per molte settimane in cellule che non si dividono [82]. Ciò accade perché i siRNA sono diluiti sotto una certa soglia terapeutica o degradati dentro la cellula; quindi è necessario ripetere la somministrazione per realizzare un effetto persistente.

Data la natura del meccanismo di silenziamento RNAi, si può pensare di applicare tale metodo non solo nella cura di malattie virali, ma anche di malattie neurologiche, genetiche e il cancro. Nella seguente tabella sono riassunte le potenziali malattie in cui può essere applicata la RNAi.

MODE OF ADMINISTRATION	POTENTIAL ORGAN TARGET	POTENTIAL DISEASE TARGET
<b>Topical</b> Application externally to a particular part of the body	Eye	Macular degeneration
	Skin	Atopic dermatitis
	Vagina	Herpes simplex virus
	Rectum	Inflammatory bowel disease
<b>Local/direct</b> Application of siRNA therapy directly to the target tissue	Lung	SARS
	Brain	Huntington's disease
	Spinal cord	Chronic pain
	Isolated tumour	Glioblastoma multiforme
<b>Systemic</b> The intravenous injection of delivery particles that then travel throughout the body to the target organ or tissue	Liver	Hyper cholesterolaemia
	Heart	Myocardial infarction
	Kidney	Kidney disease
	Metastasized tumours	Ewing's sarcoma

Tabella 1 Potenziali target [71].

Nei seguenti paragrafi saranno illustrati i principali risultati ottenuti.

### 6.3.2.1 Malattie genetiche e neurodegenerative

Una potenziale applicazione terapeutica per RNAi è il trattamento di malattie genetiche e neurodegenerative. Un promettente passo in questa direzione è stato compiuto attraverso studi preliminari che dimostrano che polimorfismi trascritti in un allele mutato di un singolo nucleotide possono essere usati come targets selettivi per RNAi. In molte malattie di natura neurodegenerativa viene spesso riscontrata una condizione patologica che genera estensioni di poliglutammine (poliQ) in proteine codificate attraverso trascritti contenenti la sequenza CAG. Le sequenze ripetitive CAG non rappresentano buoni targets, poiché le ripetizioni di CAG sono comuni anche a molti trascritti normali, e pertanto non possono essere selettivamente bersagliate dai siRNA. In alternativa, i polimorfismi di un singolo nucleotide sono molto spesso trovati in trascritti di un allele mutato e rappresentano potenziali targets selettivi. La sfida consiste nel cercare una combinazione siRNA/SNP che sia altamente selettiva. Questo è stato realizzato attraverso un'analisi sistematica dei siRNA in cui il nucleotide polimorfo è complementare alla regione centrale del siRNA. In alcuni casi i siRNA hanno mostrato di essere in grado di dirigere la degradazione selettiva dei trascritti mutati, lasciando intatti i trascritti privi della mutazione nonostante sia presente solo una base non appaiata [75]. Il rilascio di RNAi nel cervello di topo è stato efficacemente usato per il trattamento dell'ataxia spino cerebellare di tipo 1 (SCA1), una malattia ereditaria a trasmissione

dominante che fa parte di un gruppo di patologie neurodegenerative, che comprende la corea di Huntington. SCA1 è causato dalla ripetizione delle triplette CAG nelle forme mutanti del gene SCA1 generando così un'estensione di poliQ. L'accumulo di queste proteine con un tratto poliQ è tossico per le cellule neuronali rendendo questo polipeptide un target ideale per il silenziamento mediato da RNAi. In uno studio, topi transgenici sono stati trattati con shRNA specifici per la proteina poliQ mediante iniezione cerebrale [83]. Il trattamento ha portato alla protezione dalla perdita di neuroni e al miglioramento della funzionalità neurologica. I risultati ottenuti da questo silenziamento e la relativa inibizione della produzione della proteina neurotossica suggeriscono che tale tecnologia possa essere utile anche contro altre patologie neurodegenerative causate da proteine neurotossiche, come ad esempio il morbo di Alzheimer [81]. Sono stati condotti studi sull'applicabilità di RNAi anche su altre malattie neurodegenerative come la sclerosi laterale amiotrofica (ALS), in cui l'uso di RNAi agirebbe sostanzialmente sia sulle fasi iniziali che sulla percentuale di morte progressiva dei motoneuroni. Ding *et al.* [84] hanno riportato un'interessante applicazione di siRNA diretti verso lo SNP, nello studio di ALS causata da mutazioni del gene che codifica per l'enzima superossido dismutasi (SOD). La SOD è un enzima che svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'ambiente riducente cellulare disputando il superossido. È stato visto che le mutazioni responsabili dell'ALS causano modifiche strutturali nell'enzima dando il via ad un processo di aggregazione proteico [85]. Schwarz *et al.* [86] recentemente hanno testato sistematicamente i siRNA per le loro capacità di discriminare la sequenza wild type dagli alleli mutati per SOD. Le loro scoperte supportano la teoria che i polimorfismi di un singolo nucleotide possono essere sufficienti a rendere il siRNA specifico per il mutante, se le basi che non accoppiano occupano una posizione opportuna all'interno del dsRNA. È stato osservato ad esempio che i non-accoppiamenti purina-purina nelle posizioni 10 e 16 dell'estremità 5' del filamento guida, conferiscono un'interessante selettività. Molte mutazioni di SOD consistono, infatti, in cambiamenti di singoli nucleotidi. Questi ricercatori sono stati in grado di ottenere la degradazione selettiva del prodotto dell'allele mutante codificante per la SOD, suggerendo così una potenziale applicazione terapeutica per il trattamento della ALS. Altri studi [79] sulla sclerosi laterale amiotrofica, condotti su modelli murini, hanno evidenziato che il rilascio di RNAi contro la SOD da un vettore porta ad un silenziamento stabile a lungo termine; questo fenomeno è associato ad una maggiore sopravvivenza dei neuroni. Poiché la veicolazione dei siRNA e dei vettori virali che esprimono i siRNA alle regioni affette del cervello è ormai tecnicamente possibile, la prospettiva dell'uso clinico di RNAi per il trattamento di altre malattie neurodegenerative (come ad esempio il morbo di Parkinson o la corea di Huntington) può rappresentare un approccio realistico in tempi molto rapidi.

In conclusione, le strategie terapeutiche basate su RNAi per il trattamento di SCA1 e ALS mostrano efficacia nei metodi di rilascio virale *in vivo*, senza effetti tossici correlati con l'uso di tali vettori.

Per malattie neurodegenerative, la sfida principale è comunque rappresentata dal rilascio di RNAi a livello di cellule specifiche nel sistema nervoso; è stato rilevato che i veicoli per il rilascio di siRNA non sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. L'iniezione diretta a livello cerebrale presenta numerosi limiti legati all'invasività ed alla possibilità di continue applicazioni di siRNA, sebbene la veicolazione virale dei shRNA eviterebbe la richiesta di dosi multiple di siRNA.

### 6.3.2.2 Malattie virali

La prima dimostrazione dell'efficacia dell'uso di RNAi *in vivo* ha coinvolto, nel topo, la veicolazione idrodinamica combinata del replicone dell'epatite B e di un'unità di espressione codificante un shRNA diretto contro il virus dell'epatite B (HBV). Questi studi [87], diretti da Kay M. della Stanford University, mostrano che i geni del virus sono molto attivi, ma una volta inserito il vettore codificante per shRNA si riscontrava un abbattimento notevolmente (99%) dell'antigene del *core* di HBV negli epatociti, fornendo così importanti prove di principio per successive applicazioni antivirali di RNAi nel fegato. In un altro studio [88], il rilascio di siRNA *in vivo* usando SNALP è stato impiegato per ridurre la replicazione virale nel topo affetto da HBV. In questo studio, notevoli modificazioni chimiche del siRNA hanno prevenuto la risposta dell'interferone e stabilizzato il siRNA a livello sierico, e l'effetto terapeutico di una singola dose di siRNA si è mantenuto per più di una settimana.

L'epatite C (HCV) è un virus che infetta circa il 3% della popolazione mondiale e rappresenta oggi la maggiore causa di malattia cronica epatica, che può portare allo sviluppo di cirrosi epatica e carcinoma epatocellulare; per questo motivo è la principale causa di trapianti di fegato negli Stati Uniti. Il genoma di HCV è una molecola di RNA con un singolo frammento codificante una poliproteina deputata alla produzione di almeno 10 proteine. Le terapie attuali sono però poco soddisfacenti per alcuni ceppi di HCV e per questo sono nati studi per valutare l'efficacia dell'inibizione mediata da siRNA [89, 90]. È stato dimostrato che i siRNA, che hanno come obiettivo mRNA codificati per le proteine non strutturali NS3 e NS5b, inibiscono la funzione del replicone HCV in colture cellulari. McCaffrey *et al.* [91] hanno impiegato iniezioni idrodinamiche nella vena della coda per dimostrare che il siRNA anti-HCV sia sintetico che quello espresso dal promotore della polimerasi III, sosteneva un'efficiente degradazione delle sequenze di HCV negli epatociti murini *in vivo*. Il metodo di iniezione intravenosa idrodinamica utilizzato nei topi, non è

però facile da applicare al trattamento dell'epatite umana per la selettività. Per risolvere questo problema è stato pensato di utilizzare cateteri o procedure idrodinamiche localizzate.

Gli RNA virali e gli intermedi di replicazione sono dunque ormai noti bersagli potenziali delle terapie basate su RNAi. Oltre alle epatiti, uno dei primi agenti infettanti che è stato trattato con RNAi è il virus dell'HIV. Infatti, data la conoscenza del ciclo vitale e della sua espressione, la maggior parte dei trascritti virali in cellule infettate dal virus sono stati efficacemente trattati con siRNA sia sintetici sia espressi direttamente. Per esempio, è stato dimostrato che la soppressione da siRNA diretta verso alcune regioni del genoma di HIV-1 ha ridotto la replicazione virale dalle 30 alle 50 volte in linee cellulari umane e nei linfociti primari [92]. Altri tipi di approcci utilizzati contro HIV prevedono la scelta come target di cofattori cellulari, richiesti o per far accedere il virus dell'HIV nella cellula o per la sua replicazione. Con questa metodologia si evita il problema della variabilità genetica nell'HIV che può far diminuire drasticamente l'efficienza dell'RNAi. Recettori e co-recettori sono particolarmente scelti tra i cofattori cellulari come bersagli particolarmente promettenti per l'RNAi perché così si inibisce la replicazione del virus. Per esempio [93], il recettore CC5 delle chemochine, co-recettore dell'HIV, è scelto come possibile target per una terapia basata sugli RNAi, in quanto individui omozigoti per una delezione di 32 coppie di basi in questo gene, sono resistenti all'infezione da HIV e non soffrono degli effetti dannosi sulla funzione immunitaria. Il rilascio di siRNA o di shRNA diretti contro geni codificanti del HIV in cellule infette rappresenta un problema da superare. Le cellule bersaglio del virus sono principalmente linfociti T, monociti e macrofagi. Dal momento che i siRNA sintetici non persistono per lungo tempo nelle cellule, il loro rilascio dovrebbe essere indotto per anni al fine di poter ottenere buoni risultati nel trattamento dell'infezione. Il rilascio dei siRNA verso linfociti T rappresenta il maggior ostacolo. L'altro approccio consiste, infatti, nell'utilizzo di vettori virali per il rilascio di geni shRNA codificanti per anti-HIV; con i vettori virali, la veicolazione sistemica non è attualmente possibile, dal momento che l'immunogenicità dei vettori stessi precluderebbe l'uso di iniezioni multiple. Pertanto, l'isolamento delle cellule T dai pazienti seguito da trasfezione, espansione delle cellule trasfettate e dalla re-infusione costituiscono al momento la via preferenziale.

Il rilascio intranasale di siRNA è risultato un metodo altamente efficace per inibire l'infezione da virus respiratorio sinciziale (RSV) nei topi e l'efficacia di questo metodo di rilascio è evidenziata dai trials clinici in corso nell'uomo. In uno studio iniziale [94], i siRNA rilasciati per via intranasale, usando nanoparticelle del polimero nanochitosano, sono risultati efficaci nell'indurre l'RNAi senza provocare alcuna risposta dell'interferone. Attualmente, i progressi nel trattamento di RSV usando siRNA aerosolizzato continuano in trials clinici in fase II [95]. Un altro studio [96] di rilascio intranasale di siRNA che aveva come bersaglio sia il virus parainfluenzale sia quello

dell'RSV ha dimostrato che esiste una competizione tra siRNA diretto verso i due targets virali differenti. Il meccanismo esatto da cui deriva tale competizione non è ancora del tutto chiaro; è evidente che deriva da un fenomeno di saturazione, ma non è chiaro se a carico dei complessi effettori RISC o di un altro componente coinvolto nelle fasi iniziali della via del RNAi.

Studi [97] sull'infezione vaginale causata virus herpes simplex 2 (HSV-2) nei topi hanno mostrato che l'infezione può essere bloccata usando un siRNA microbica. L'applicazione vaginale di lipidi incapsulati contenenti siRNA non modificati il cui bersaglio è rappresentato dai geni del HSV-2, è stata testata nei topi e l'effetto terapeutico del siRNA somministrato prima e dopo l'esposizione al virus è stato stimato per un periodo di 15 giorni. Sei giorni dopo l'infezione, il 70% dei topi trattati con un tipo di siRNA prima dell'esposizione al virus non mostravano segni di infezione da HSV-2. Tuttavia, dopo l'esposizione al virus, una combinazione di due siRNA con distinti targets virali si è resa necessaria per proteggere dall'infezione da HSV-2. Tali risultati indicano che i siRNA incapsulati con lipidi possono essere impiegati come un efficace microbica a livello della superficie mucosa, con una tossicità *in vivo* non evidente. In conclusione, questi studi, messi insieme con quelli di rilascio intranasale, indicano che le membrane mucose possano rappresentare siti efficaci per il rilascio di siRNA, dal momento che presentano notevoli vantaggi sia in termini di accessibilità sia in termini di rapporto costo/efficacia.

### **6.3.2.3 Malattie oculari: la degenerazione maculare dell'anziano**

Un altro ambito in cui è stato applicato il principio dell'interferenza RNA è la cura di malattie oculari, ed in particolar modo nella cura della degenerazione maculare dell'anziano.

Vi sono vari vantaggi nell'avere l'occhio come organo bersaglio e che rendono quindi più facile lo sviluppo della terapia. Infatti, l'occhio è un organo "chiuso" di piccolo volume e la circolazione sanguigna retinale può essere facilmente visualizzata ad esempio con un'angiografia fluorescente. Inoltre la quantità di vettore virale necessario per il rilascio di siRNA all'interno dell'occhio è piccola. Per questo motivo, il rischio di effetti off-target è basso. Come svantaggio ha però il fatto che le iniezioni intra-oculari di siRNA devono essere ripetute.

La prima malattia presa in esame è la degenerazione maculare dell'anziano. È una malattia cronica e progressiva della macula che rappresenta oggi la principale causa di cecità e di grave riduzione della visione centrale nella popolazione sopra i 50 anni d'età, nei paesi sviluppati. Si tratta di una patologia degenerativa che interessa principalmente la coriocapillare, la membrana di Bruch, l'epitelio pigmentato retinico ed i fotorecettori, le cui cause sono solo parzialmente note; probabilmente sono coinvolti sia fattori genetici che ambientali. Un'ipotesi ben documentata è che, a causa dell'invecchiamento fisiologico, l'epitelio pigmentato retinico perda efficacia nel suo

compito di nutrire i fotorecettori e perciò porti all'accumulo di materiale di scarto. Proprio in risposta a tale accumulo sembra essere associata una reazione infiammatoria che causa il rilascio di sostanze tossiche in grado di danneggiare la retina. In campo farmaceutico, risulta interessante il rilascio e l'accumulo nello spazio extracellulare di una specifica proteina, che è responsabile di una crescita neovascolare anomala, tipica della patologia: il VEGF (vascular endothelial growth factor). Questo fattore di crescita causa infatti la formazione di nuovi vasi sanguigni sotto la retina che sono però fragili e senza il supporto di cellule muscolari lisce possono perdere sangue e fluidi provocando una cicatrice nel mezzo della retina. La ricerca, infatti, è stata indirizzata a individuare farmaci in grado di bloccare tale proteina. In due trials clinici attualmente in corso relativi a RNAi per il trattamento della degenerazione maculare (condotti da *Acuity Pharmaceuticals* e *Sirna Therapeutics*), è stata effettuata l'iniezione intravitreale di siRNA che hanno come obiettivo il VEGF o il suo recettore (VEGFR1) per testarne la sicurezza ed efficacia nell'occhio. Al momento l'uso di tali siRNA non ha mostrato nei pazienti trattati, alcun effetto dannoso. Pertanto, con tale approccio, invece di antagonizzare il VEGF prodotto e rilasciato nello spazio extracellulare, viene direttamente inibita la produzione del VEGF a livello intracellulare. Ad esempio già nel 2006 si trovava in fase II il *bevasiranib*, un siRNA rivolto ad antagonizzare l'RNA messaggero del VEGF [98]. Con tale cura si riscontrava nella maggior parte dei pazienti miglioramenti nella vista da vicino e nelle dimensioni della lesione alla retina. Tali promettenti risultati incrementano le prospettive future di poter applicare questo approccio terapeutico anche per il trattamento di altre patologie a livello oculare [99].

#### **6.3.2.4 Cancro**

Gli oncogeni espressi a livelli elevati rappresentano bersagli attraenti per terapie basate su RNAi nei confronti del cancro, e in modelli murini sembra che inibiscano efficacemente la crescita tumorale *in vivo*. È interessante sottolineare che l'uso di RNAi nella terapia antitumorale potrebbe rivoluzionare il trattamento di questa patologia devastante. Indubbiamente la sfida per la cura del cancro non è diversa da quelle di fronte alle quali ci troviamo per altre patologie, e include la ricerca di ottimi target, veicolazioni e minima tossicità. Uno studio [100] ha coinvolto il rilascio liposomiale di siRNA il cui obiettivo era rappresentato dal gene del recettore tirosin chinasi EphA2, che è normalmente overespresso nelle cellule del tumore ovarico. Il risultato è stato positivo: dopo il rilascio bisettimanale di siRNA per 4 settimane, è stata osservata una riduzione fino al 50% delle dimensioni del tumore. Quando la terapia con RNAi è stata combinata con un agente chemioterapico, il *paclitaxel*, è stata osservata una riduzione della massa tumorale addirittura

fino al 90%, indicando potenziamento ed aumento dell'efficacia nella combinazione tra RNAi e le forme convenzionali di terapia delle neoplasie.

Un altro esempio riguarda il sarcoma di Ewing nelle cui cellule metastatiche sono stati ottenuti dei buoni risultati utilizzando nanoparticelle di ciclodestrine che rilasciano in maniera sistemica siRNA che ha per obiettivo il gene fuso Ews-Fli1. Di maggiore significato, è stata l'osservazione che l'elevata frequenza di ricaduta associata con i trattamenti chemioterapici convenzionali per queste cellule tumorali, non si verificava nei topi cui erano state iniettate nanoparticelle di siRNA, indicando il potenziale beneficio terapeutico a lungo termine di questi approcci altamente selettivi di RNAi sistemici nel trattamento del cancro.

## 7. CONCLUSIONI

La possibilità teorica di silenziare qualsiasi gene attraverso RNAi indotti da siRNA sta suscitando un grande interesse nella comunità scientifica, così come nell'industria farmaceutica e biotecnologica. La tecnologia della RNAi ha rivoluzionato, infatti, il campo del silenziamento genico in una varietà di organismi differenti. Questo fenomeno naturale rappresenta uno strumento relativamente nuovo ed estremamente potente per l'analisi della funzione dei geni che permette di analizzare specificamente il prodotto genico di interesse grazie al suo silenziamento.

La tecnologia è rapidamente divenuta uno strumento inestimabile per la biologia sperimentale, e ha già permesso di decifrare la funzione molecolare di un grande numero di geni; ma non solo, l'RNAi ha permesso l'individuazione di nuovi agenti terapeutici basati su piccoli dsRNA. Dal momento che i processi patologici dipendono solitamente dall'espressione sregolata di diversi geni, ci si attende che la somministrazione di siRNA sia in grado di arrestare tale espressione, attraverso l'RNAi; ciò potrebbe comportare un miglioramento considerevole delle terapie attualmente utilizzate.

Terapie basate su RNAi per AMD e RSV hanno già raggiunto il livello dei trials clinici (fase I) e in pochi anni inizieranno trials per l'infezione da HIV, da HBV, epatite C e per la corea di Huntington. Questo indica, in effetti, che i siRNA sono ben tollerati e mostrano una buona efficacia. Il rapido sviluppo dalla scoperta iniziale alle applicazioni in medicina, è senza precedenti ed è significativo dell'enorme potenziale terapeutico posseduto da RNAi.

Nonostante lo sviluppo di nuove tecnologie, sono stati incontrati alcuni ostacoli alle applicazioni terapeutiche. Alcune di queste problematiche per l'uso di RNAi, includono le prove dell'induzione dell'interferone e degli effetti off-target mediati dai siRNA. Inoltre, è stato mostrato [79] che elevati

livelli di espressione di shRNA basati sul promotore possono essere tossici e addirittura fatali per i topi; per ovviare a tale inconveniente sono state sviluppate modificazioni strutturali nell'ossatura del siRNA ed è stata effettuata una appropriata scelta del promotore per gli shRNA.

Sebbene il rilascio sistemico sia stato il primo ostacolo al rapido sviluppo di farmaci basati su RNAi, sono stati sviluppati numerosi metodi di rilascio che si sono dimostrati efficaci. Inoltre, mediante l'utilizzo di ligandi, come aptameri o nanoparticelle, è stato possibile incrementare la specificità del rilascio. Tuttavia vi sono ancora grandi preoccupazioni e possibili impedimenti a un'ampia applicazione di RNAi per il trattamento di patologie umane. Ciò riguarda, ad esempio, le malattie croniche come l'epatite C o l'infezione da HIV poiché richiedendo trattamenti duraturi con RNAi. Non è, infatti, ancora ben chiaro quale sia l'effetto sul metabolismo cellulare di un prolungato o ripetitivo utilizzo di RNAi. In termini di applicazioni a lungo termine dei siRNA è possibile che la tossicità non si manifesti per mesi o addirittura per anni.

Pertanto, studi futuri dovranno consentire di ottenere un rilascio efficace e di migliorare la comprensione degli effetti indesiderati per terapie basate sull'uso di RNAi. Dato il notevole interesse dell'RNAi da un punto di vista terapeutico, i prossimi studi saranno volti ad ampliare il range di applicazione per il trattamento basato sull'RNAi.

È affascinante pensare che il destino di tante persone malate potrebbe essere presto cambiato da un'avventura scientifica iniziata con un fiore.

## 8. BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

- [1] Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. “Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *Pneumococcal* types”. *J. Exp. Med.*, **1944**, 79, 137-158.
- [2] Daneholt, Bertil. “Advanced Information: RNA interference”. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006*.
- [3] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. “Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans”. *Plant Cell*, **1990**, 2, 279-289.
- [4] Mol JNM, van der Krol AR. “Antisense nucleic acids and proteins: fundamentals and applications”. *M. Dekker*, **1991**, pp. 4, 136.
- [5] Romano N, Macino G. “Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences”. *Mol Microbiol*, **1992**, 6 (22), 3343-53.
- [6] Van Blokland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM. “Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover”. *Plant J*, **1994**, 6, 861-77.
- [7] Covey S, Al-Kaff N, Lángara A, Turner D. “Plants combat infection by gene silencing”. *Nature*, **1997**, 385, 781-2.
- [8] Ratcliff F, Harrison B, Baulcombe D. “A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants”. *Science*, **1997**, 276, 1558-60.
- [9] Dougherty WG, Parks TD. “Transgenes and suppression: telling us something new?” *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1995**, 7, 399-405.
- [10] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. “Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*”. *Nature*, **1998**, 391, 806-11.
- [11] [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/adv.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.html)
- [12] Montgomery MK, Xu S, Fire A. “RNA as target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*”. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **1998**, 95, 15502-15507.

- [13] Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. “Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro”. *Genes Devel.*, **1999**, *13*, 3191-3197.
- [14] Hamilton AJ, Baulcombe DC. “A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants”. *Science*, **1999**, *286*, 950-952.
- [15] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. “RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals”. *Cell*, **2000**, *101*, 25-33.
- [16] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. “Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference”. *Nature*, **2001**, *409*, 363-366.
- [17] Qiu S, Adema C, Lane T. “A computational study of off-target effects of RNA interference”. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33* (6), 1834-47.
- [18] Ma J, Yuan Y, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel D. “Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein”. *Nature*, **2005**, *434* (7033), 666-70.
- [19] Sen G, Blau H. “Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies”. *Nat Cell Biol*, **2005**, *7* (6), 633-6.
- [20] Fortunato A, Fraser A. “Uncover genetic interactions in *Caenorhabditis elegans* by RNA interference”. *Biosci Rep* **2005**, *25* (5-6), 299-307.
- [21] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*”. *Cell* **1993**, *75*, 843-854.
- [22] Lim LP, Glasner ME, Yekta S, et al. “Vertebrate microRNA genes”. *Science* **2003**, *299*, 1540.
- [23] Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, et al. “The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Norhabditis*” *Genes Dev* **2003**, *17*, 991-1008.
- [24] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. “New microRNAs from mouse and human”. *RNA* **2003**, *9*, 175-179.
- [25] Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, et al. “Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex”. *Nature* **2004**, *432*, 231-235.

- [26] Gregory R, Chendrimada T, Shiekhattar R. “MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex”. *Methods Mol Biol* **2006**, 342, 33-47.
- [27] Matzke MA, Birchler JA, “RNAi-mediated pathways in the nucleus”. *Nat Rev Genet* **2005**, 6, 24-35.
- [28] Goodwin BL, Eichler DC. “L’interferenza dell’RNA e l’inattivazione mirata dell’espressione genica”. *JCLA* **2005**, 28, 80-85.
- [29] Cogoni C, Macino G. “Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA- dependent RNA polymerase”. *Nature* **1999**, 399, 166-169.
- [30] [www.nature.com/focus/rnai/animations/animation/animation.htm](http://www.nature.com/focus/rnai/animations/animation/animation.htm).
- [31] Ratcliff F, Harrison B, Baulcombe, D. “A similarity between viral defence and gene silencing in plants”. *Science* **1997**, 276, 1558-1560.
- [32] Hong-Wei Li, Shou-Wei Ding. “Antiviral silencing in animals”. *FEBS Lett.* **2005**, 579, 5965-5973.
- [33] Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A, Zhu J, Staskawicz B, Jin H. “A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity”. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, 103 (47), 18002–7.
- [34] Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH. “Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase D”. *Cell* **1999**, 99, 133-141.
- [35] Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC. “The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*”. *Cell* **1999**, 99, 123-132.
- [36] Palatnik J, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington J, Weigel D. “Control of leaf morphogenesis by microRNAs”. *Nature* **2003**, 425 (6955), 257-63.
- [37] Ambros V. “The functions of animal microRNAs”. *Nature* **2004**, 431, 350-355.
- [38] Zhang B, Pan X, Cobb G, Anderson T. “microRNAs as oncogenes and tumor suppressors”. *Dev Biol* **2007**, 302 (1), 1-12.

- [39] Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke M, Matzke A. “Transcriptional gene silencing and promoter methylation triggered by double stranded RNA”. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5194-5201.
- [40] Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D et al. “Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related”. *Curr. Biol* **2001**, *11*, 436-440.
- [41] Volpe TA et al. “Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi” *Science* **2002**, *297* (5588), 1818-9.
- [42] Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal S, Moazed D. “RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex”. *Science* **2004**, *303* (5658), 672-6.
- [43] Reinhart BJ, Bartel DP. “Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats”. *Science* **2002**, *297*, 1831.
- [44] Volpe TA, Kidner C, Hall IM, et al. “Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi”. *matic Science* **2002**, *297*, 1833-1837.
- [45] Volpe T, Schramke V, Hamilton G, White S, Teng G, Martienssen R, Allshire R. “RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast”. *Chromosome Res* **2003**, *11* (2), 137-46.
- [46] Jones L, Ratcliff F, Baulcombe DC. “RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance”. *Current Biology* **2001**, *11* (10), 747-757.
- [47] DaRocha W, Otsu K, Teixeira S, Donelson J. “Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*”. *Mol Biochem Parasitol* **2004**, *133* (2), 175-86.
- [48] Robinson K, Beverley S. “Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*”. *Mol Biochem Parasitol* **2003**, *128* (2), 217-28.
- [49] Nakayashiki H, Kadotani N, Mayama S. “Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi”. *J Mol Evol* **2006**, *63* (1), 127-35.

- [50] Morita T, Mochizuki Y, Aiba H. “Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction”. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103* (13), 4858-63.
- [51] Makarova K, Grishin N, Shabalina S, Wolf Y, Koonin E. “A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action”. *Biol Direct* **2006**, *1*, 7.
- [52] Cerutti H, Casas-Mollano J. “On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man”. *Curr Genet* **2006**, *50* (2), 81-99.
- [53] Anantharaman V, Koonin E, Aravind L. “Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism”. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30* (7), 1427-64.
- [54] Buchon N, Vaury C. “RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements”. *Heredity* **2006**, *96* (2), 195-202.
- [55] Obbard D, Jiggins F, Halligan D, Little T. “Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes”. *Curr Biol* **2006**, *16* (6), 580-5.
- [56] Reynolds A, Anderson E, Vermeulen A, Fedorov Y, Robinson K, Leake D, Karpilow J, Marshall W, Khvorova A. “Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent”. *RNA* **2006**, *12* (6), 988-93.
- [57] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. “Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs”. *Methods* **2002**, *26*, 199-213.
- [58] Stein P, Zeng F, Pan H, Schultz R. “Absence of non-specific effects of RNA interference triggered by long double-stranded RNA in mouse oocytes”. *Dev Biol* **2005**, *286* (2), 464-71.
- [59] Semizarov D, Frost L, Sarthy A, et al. “Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures”. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, *100*, 6347-6352.
- [60] Persengiev SP, Zhu X, Green MR. “Nonspecific, concentration dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)”. *RNA* **2004**, *10*, 12-18.

- [61] Leirdal M, Sioud M. “Gene silencing in mammalian cells by pre-preformed small RNA duplexes”. *formed Biochem Biophys Res Commun* **2002**, 295, 744-748.
- [62] Castanotto D, Li H, Rossi JJ. “Functional siRNA expression from transfected PCR products”. *RNA* **2002**, 8, 1454-1460.
- [63] Yu JY, DeRuijter SL, Turner DL. “RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian sion cells”. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, 99, 6047-6052.
- [64] Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. “Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells”. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, 99, 1443-1448.
- [65] Arendt CW, Tang G, Zilberstein A. “Vector systems for the dedelivery of small interfering RNAs: managing the RISC”. *livery Chem Bio Chem* **2003**, 4, 1129-1136.
- [66] Sunilkumar G, Campbell L, Puckhaber L, Stipanovic R, Rathore K. “Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol”. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, 103 (48), 18054-9.
- [67] Le L, Lorenz Y, Scheurer S, Fötisch K, Enrique E, Bartra J, Biemelt S, Vieths S, Sonnewald U. “Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression”. *Plant Biotechnol J* **2006**, 4 (2), 231-42.
- [68] Gavilano L, Coleman N, Burnley L, Bowman M, Kalengamaliro N, Hayes A, Bush L, Siminszky B. “Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* for reduced nornicotine content”. *J Agric Food Chem* **2006**, 54 (24), 9071-8.
- [69] Zhang et al. “Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*): Nanoparticle-mediated RNAi in mosquito larvae”. *Insect Molecular Biology*, **2010**.
- [70] Tuschl T, Borkhardt A. “Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy”. *Mol Interv* **2002**, 2, 158-167.
- [71] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. “Knocking down barriers: advances in siRNA delivery”. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, 8, 129-138.

- [72] Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. “Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles”. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 505-515.
- [73] Scherphof GL in *Targeted Drug Delivery* (ed. Juliano, R. L.) 285-313 (Springer, Berlin, 1991).
- [74] Vornlocher, HP. *et al.* “Nuclease-resistant doublestranded RNA for RNA interference”. WO2005115481 (**2005**).
- [75] Aagaard L, Rossi JJ. “RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges”. *Science Direct-Advanced Drug Delivery reviews* **2007**, *59*, 75-86.
- [76] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. “Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs”. *Nature* **2004**, *432*, 173-178.
- [77] Torchilin VP *et al.* “Cell transfection *in vitro* and *in vivo* with nontoxic TAT peptide–liposome–DNA complexes”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1972-1977.
- [78] Auguste DT *et al.* “Triggered release of siRNA from poly(ethylene glycol)-protected, pH-dependent liposomes”. *J. Control. Release* **2008**, *130*, 266-274.
- [79] Kim DH, Rossi JJ. “Strategies for silencing human disease using RNA interference”. *Nature Reviews- Nature Publishing Group.* **2007**, *8*, 173-184.
- [80] Howard KA, Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MØ, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F, Kjems J. “RNA interference *in vitro* and *in vivo* using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system”. *Mol Ther.* **2006**, *14(4)*, 476-84.
- [81] Lekha Dinesh Kumar, Clarke AR. “Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): from *in vitro* to *in vivo* applications”. *Science Direct - Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 87-100.
- [82] Bartlett DW, Davis ME. “Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging”. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 322–333.
- [83] Xia H, Mao Q, Eliason SL, et al. “RNAi suppresses polyglutamine induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar mine-ataxia”. *Nat Med* **2004**, *10*, 816-820.
- [84] Ding H, Schwarz DS, Keene A, Affar B, Fenton L, Xia X, Shi Y, Zamore PD, Xu Z. “Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis”. *Aging Cell.* **2003**, *2*, 209-217.

- [85] Cleveland, Rothstein, *Nature Rev Neurosci* **2001**, 2, 806-19.
- [86] Schwarz DS, Ding H, Kennington L, Moore JT, Schelter J, Burchard J, Linsley PS, Aronin N, Xu Z, Zamore PD. “Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide”. *PLoS Genet.* **2006**, 2.
- [87] McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. “Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference”. *Nat.Biotechnol.* **2003**, 21, 639-644.
- [88] Morissey DV et al. “Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs”. *Nature Biotechnol.* **2005**, 23, 1002-1007.
- [89] Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. “RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 2783-2788.
- [90] Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. “Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 2014-2018.
- [91] McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. “RNA interference in adult mice”. *Nature.* **2002**, 418, 38-39.
- [92] Jacque JM, Triques K, Stevenson M. “Modulation of HIV-1 replication by RNA interference”. *Nature.* **2002**, 418, 435-438.
- [93] Crowe S. “Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication, by Martínez et al.”. *AIDS* **2003**, 17 Suppl 4, S103-5.
- [94] Zhang W. et al. “Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS 1 gene”. *Nature Med.***2005**, 11, 56-62.
- [95] DeVincenzo J. *et al.* Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)”. *Antiviral Res.* **2008**, 77, 225–231.
- [96] Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. “Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA”. *Nature Med.* **2005**, 11, 50-55.

- [97] Palliser D, et al. "An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection". *Nature*. **2006**, 439, 89-94.
- [98] Acuity Pharmaceuticals. Acuity Pharmaceuticals reports positive initial phase II results for bevasiranib (Cand5) in wet AMD. June 1, **2006**.  
<http://www.acuitypharma.com/press/release13.pdf> (accessed Aug 9, 2006).
- [99] McFarland TJ, Zhang Y, Appukuttan B, Stout JT. "Gene therapy for proliferative ocular diseases". *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, 4, 1053-1058.
- [100] Landen CN et al. "Therapeutic EphA2 gene targeting *in vivo* using neutral liposomal small interfering RNA delivery". *Cancer Res.* **2005**, 65, 6910-6918.