

EPIGENETICA

Le **modifiche epigenetiche** sono delle modifiche che cambiano il fenotipo, senza alterare la sequenza dei nucleotidi.

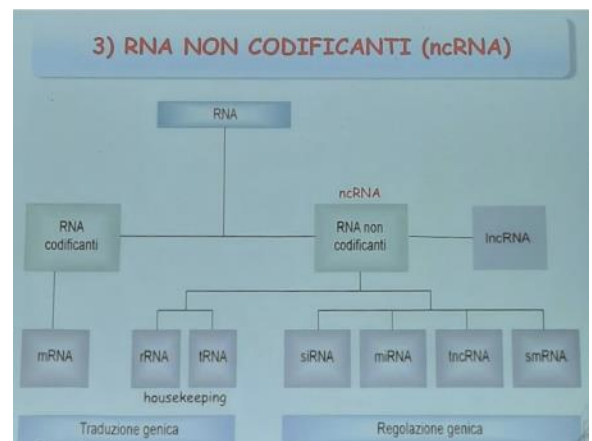
L'epigenetica si focalizza sui cambiamenti ereditabili dell'espressione genica **NON** dipendenti da modificazioni genetiche ma indotte dall'ambiente. I principali meccanismi sono:

1. il rimodellamento della cromatina, quindi la **modificazione degli istoni**;
2. **la metilazione del DNA**;
3. ed il ruolo degli **RNA non codificanti (ncRNA)**.

3. RNA NON CODIFICANTI (ncRNA)

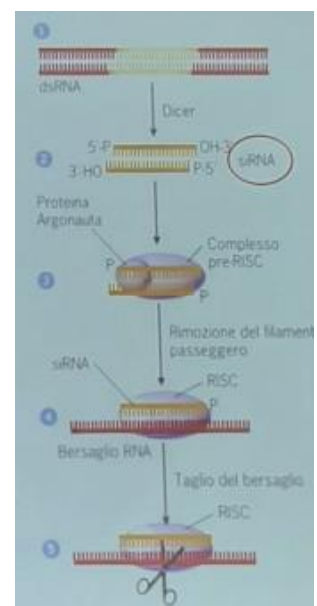
Gli RNA non codificanti sono degli RNA che sono in grado di modificare in modo epigenetico l'espressione dei geni. Tipi di RNA non codificanti:

- **siRNA**: piccoli RNA sintetizzati chimicamente o di origine virale. Hanno la funzione di degradare l'RNA messaggero bersaglio attraverso un meccanismo definito RNA interference. Agiscono solo per complementarità perfetta: ogni siRNA può avere un unico RNA messaggero bersaglio.
- **miRNA**: prodotti endogeni e regolano negativamente l'espressione genica.
- **small RNA**: i quali sono una classe eterogenea, localizzati sia nel nucleo che nel citoplasma, ed ancora la loro funzione non è nota.



Noi ci soffermeremo sugli **siRNA** e **miRNA**: hanno analogie dal punto di vista della biosintesi, ed hanno una struttura simile in quanto sono molto piccoli costituiti da 18-20 nucleotidi. Entrambi **inibiscono a livello post-trascrizionale gli RNA messaggeri** che vengono riconosciuti grazie alla complementarità.

I **siRNA** agiscono principalmente determinando la **degradazione del mRNA bersaglio** attraverso un meccanismo definito **RNA interfering (RNAi)**. Si producono a partire da lunghe molecole di RNA prodotte da elementi genetici normalmente silenti o estranei alla cellula, quali trasposomi, virus o transgeni. RNAi perciò rappresenta un **sistema di difesa** contro l'invasione di elementi genetici estranei e di conservazione della stabilità del genoma. Quindi all'inizio si pensava che questo meccanismo fosse di difesa, un meccanismo di silenziamento genico necessario per proteggere il genoma dall'invasione di virus. Poi successivamente si è visto che non solo è un meccanismo di difesa ma anche un **meccanismo di regolazione genica**. Ricapitolando: una volta formatosi il siRNA si lega al complesso RISC e che permette l'interazione con l'RNA messaggero e lo degrada.



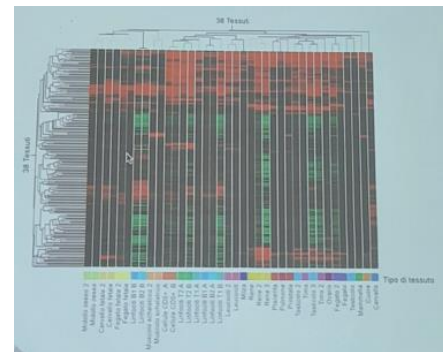
I miRNA:

- piccoli RNA non codificanti a singolo filamento, di circa 20-22 nucleotidi che regolano a livello post-trascrizionale l'espressione di numerosi mRNA con cui presentano omologia di sequenza.
- Sono stati identificati in tutti gli organismi pluricellulari, dove svolgono numerose **funzioni fisiologiche**.
- Nell'uomo sono stati identificati **800 miRNA**, la cui espressione è tessuto-specifica.
- L'espressione dei miRNA in tumori umani risulta aberrante rispetto ai rispettivi tessuti sani, suggerendo che alcuni miRNA svolgano una funzione oncogena ed altri oncosoppressiva.

Il ruolo è quello di **regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale**. La funzione di molti miRNA ancora non è nota, ma per alcuni è stata provata la partecipazione a numerosi processi fisiologici e patologici:

- hanno un ruolo in **proliferazione, apoptosi e differenziazione cellulare**
- possono essere deregolati in malattie umane
- possono essere **coinvolti nella tumorigenesi**

Nel 2003 è stato creato un **miRNA database**: registro contenente tutti i miRNA noti. Alcuni miRNA sono espressi preferenzialmente in alcuni tessuti (riferendoci all'immagine): nelle ascisse vi sono i vari tessuti invece nelle ordinate vi sono i vari miRNA. In rosso sono over espressi, invece in verde abbiamo una sottoespressione rispetto agli altri tessuti.

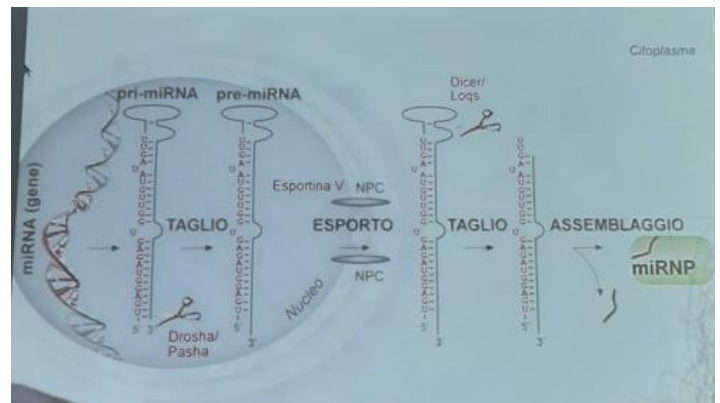


BIOGENESI DEI miRNA

I miRNA si originano nel nucleo ad opera di un RNA polimerasi di tipo 3 sotto forma di un trascritto primario, che viene definito **pri-miRNA**. Questo trascritto ha una lunghezza che varia da 100 a 1000 paia di basi. A questo punto i pri-miRNA vengono tagliati da un complesso che prende il nome di **Drosha**.

Successivamente si viene a formare una molecola dalla lunghezza di 70-80 nucleotidi definita pre-miRNA, il quale presenta una struttura a forcina. A questo punto i pre-miRNA vengono esportati

attraverso i pori nucleari grazie alla proteina **esportina V**, quest'ultima riconosce i miRNA e li porta fuori dal nucleo. Nel citoplasma i miRNA incontrano un altro complesso chiamato **Dicer** che produce un taglio formando un RNA doppio filamento compreso fra 19-24 nucleotidi, che costituisce il miRNA maturo.



A questo punto, avevamo detto che il microRNA è a singolo filamento, invece qui è a doppio. Che succede quindi? In alcuni casi, uno dei due filamenti viene degradato e l'altro si accumula come **miRNA**, quindi in genere quello che viene degradato è il meno rappresentato. Viene scelto uno dei due filamenti, ovvero il più stabile e l'altro prende il nome di miRNA con l'asterisco (**miRNA***).

Questo miRNA o viene degradato o sei è visto in alcuni casi che entrambi i filamenti possono essere attivi e riconoscere dei target e a volte vengono chiamati miRNA5p e miRNA3p (quindi non miRNA e miRNA*).

Quindi il filamento che viene riconosciuto come il più stabile, viene riconosciuto dal complesso **RISC** (RNA-Induced Silencing Complex). Il microRNA quindi, entra in questo complesso RISC, questo riconosce il gene target (cioè la sequenza bersaglio che solitamente si trova nella regione 3'UTR del gene) e a questo punto può indurre la repressione della traduzione o la degradazione dell'mRNA, questo dipende dal grado di complementarietà della sequenza bersaglio.

Quindi i microRNA mediano il riconoscimento degli mRNA che chiamiamo target al fine di determinare il blocco della traduzione oppure la degradazione. Questo è definito il "grado di complementarietà di sequenza" tra la sequenza del miRNA e la sequenza dell'mRNA.

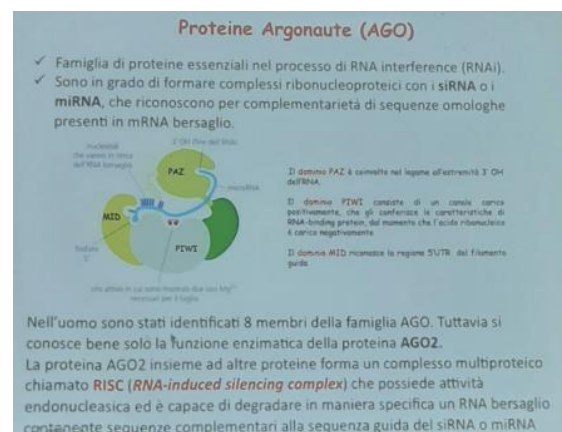
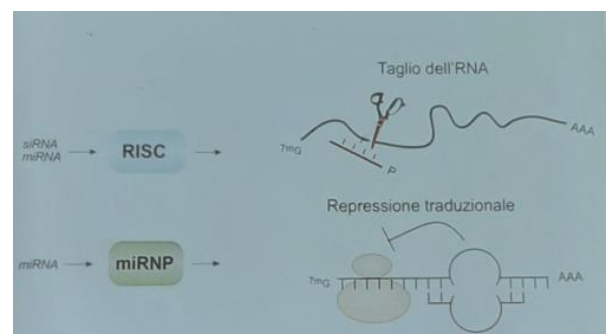
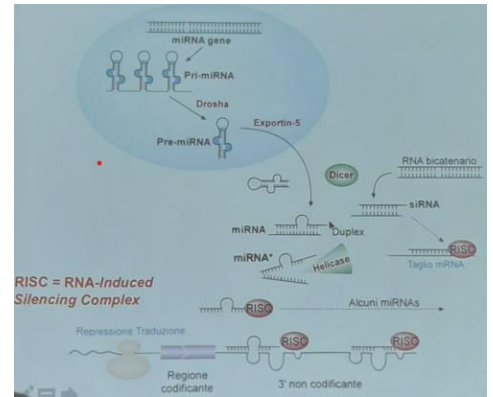
Precisamente: se i microRNA si appaiano in maniera imperfetta, cioè alcuni nucleotidi non vengono riconosciuti con il 3'UTR del target, allora si ha un blocco della traduzione e quindi viene inibita la produzione della proteina.

Se la complementarietà è perfetta, avremo la degradazione dell'mRNA (siRNA determinerà sempre la degradazione dell'mRNA).

Quindi sia siRNA che miRNA vanno nel complesso RISC e possono tagliare l'RNA, in più i miRNA possono reprimere la traduzione.

Quindi se la complementarietà è perfetta avremo il taglio e quindi la degradazione dell'mRNA, se la complementarietà è imperfetta avremo il blocco della traduzione.

All'interno del complesso RISC ci sono tante proteine e alcune fanno parte della famiglia delle **Proteine Argonaute** (AGO). Sono stati identificati otto membri tra cui AGO2 che, insieme ad altre proteine forma il complesso RISC che possiede attività endonucleasica ed è capace di degradare in maniera specifica un RNA bersaglio.



TARGET

Quali sono i target? Si scoprono microRNA ogni giorno ed è evidente che sono coinvolti in tanti processi ma è importante capire quali sono i target e quindi il meccanismo alla base di questi microRNA.

La più importante caratterizzazione della funzione dei miRNA è l'identificazione dei mRNA bersaglio.

Poiché la complementarietà tra miRNA e mRNA target non è perfetta, molto probabilmente ciascun miRNA può regolare un ampio numero di geni. Sono stati sviluppati molti algoritmi per predire i geni bersaglio.

Abbiamo tantissimi database che ci dicono quali sono i target in base all'omologia di sequenze, quindi se sono conservati, qual è la percentuale di appaiamento. I più famosi sono:

- MiRTarBase;
- miRanda
- TARGETSCAN-VERT;
- Diana-microT

Ovviamente, una volta conosciuto un miRNA si possono fare della analisi bioinformatiche per capire quali sono questi target ma poi ogni bersaglio deve essere validato in laboratorio. Si va a vedere quindi se il microRNA va ad agire sul target.

Nel caso di inattivazione di un miRNA si avrà la sovraespressione dell'mRNA bersaglio mentre, l'attivazione di un miRNA porterà alla down-regolazione dell'mRNA target.

È evidente che questi microRNA sono coinvolti in diverse funzioni, quindi ci si è chiesto se potessero avere dei risvolti nelle malattie.

Essi sono coinvolti in processi importanti come: apoptosi, ciclo cellulare, angiogenesi, invasione, metastasi; quindi la deregolazione dell'espressione dei miRNA è stata dimostrata in cellule tumorali.

La prima evidenza di associazione tra microRNA e cancro è venuta dallo studio della leucemia linfatica cronica ed è stato visto che circa il 67% di questo tipo di leucemia presenta una delezione della regione cromosomica che codifica per due miRNA (miR15 e miR16). È stato visto che questa leucemia è associata a una ridotta espressione di questi microRNA.

Malattia	microRNA
Leucemia linfatica cronica	Delezioni e ridotta espressione di miR15 e miR16 (~67%)
Carcinoma colon-rettale	Ridotta espressione di mir-143 e mir-145
Carcinoma polmonare	Ridotta espressione di let-7, associata a cattiva prognosi
Linfoma di Burkitt	Elevata espressione di miR155/BIC

Nel carcinoma colon-rettale si ha una ridotta espressione di mir-143 e mir-145 ma possiamo avere non solo una ridotta espressione, a volte si può avere una elevata espressione del microRNA che può portare a dei tumori. Quindi possiamo avere una up-regulation o una down regulation.

Perché si ha una alterata espressione? L'alterata espressione può essere dovuta ad alterazioni geniche (delezioni, amplificazioni) oppure in seguito ad alterazioni epigenetiche (metilazione che può porta alla sottoespressione dei microRNA oppure un aumento). Il 50% dei geni che codificano i microRNA si trovano in genere in zone fragili e quindi sono più soggetti a mutare e ad essere alterati e portare delle neoplasie. Ad esempio BCL2 è un oncogene che è regolato dal miR15 e quindi se nella leucemia abbiamo detto che abbiamo una sottoespressione del miR15, in questa situazione lo troveremo aumentato. Quindi nel 70% di questi tumori si è visto non solo la sottoespressione di miR15 ma anche una up-regulation (sovraespressoene) di BCL2 che è un oncogene potentissimo e quindi può essere la causa della leucemia. I microRNA possono agire da **oncogeni** o da **oncosoppressori** in base ai target su cui agiscono. I microRNA regolano sempre in maniera negativa l'espressione del gene, quindi un microRNA è oncogene quando regola un oncosoppressore. Quindi se abbiamo un'alterazione e quindi un up-regulation di microRNA che va a regolare un oncosoppressore questa va a determinare una down-regulation del gene oncosoppressore; quindi quel microRNA funzionerà da oncogene.

Viceversa se abbiamo una down-regulation del microRNA, avremo un'elevata espressione di quel gene perché non è più sottoposto a controllo negativo.

Quindi alto microRNA significa basso target, bassi livelli del microRNA significa altro target. Quindi se il target è oncogenico il miR sarà oncosoppressore e viceversa se il target è oncogenico si comporterà da oncosoppressore.

Quindi l'identificazione dei bersagli permetterà di scoprire le funzioni biologiche dei microRNA sia in condizioni normali che patologiche.

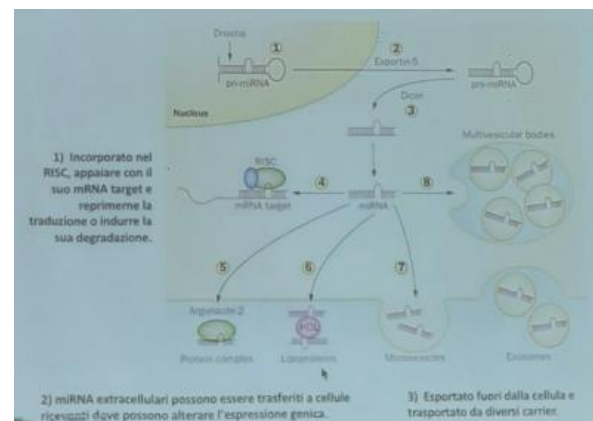
Ovviamente abbiamo strategie terapeutiche perché se sappiamo che un microRNA funziona da oncosoppressore andremo ad inserirlo (**miRNA replacement therapy**). Quindi andremo ad inserire il microRNA che prima non c'era, per andare a sopperire e compensare la mancanza di questo microRNA.

Viceversa se il microRNA funziona da oncogene e abbiamo una elevata espressione nella cellula tumorale, andremo a lavorare per cercare di inibire il microRNA con la **miRNA knockdown therapy**. Quindi si avrà a bloccare il microRNA.

Non esistono solo i microRNA cellulari ma anche miRNA circolanti. Questi miRNA possono essere trasportati al di fuori della cellula. I miRNA circolanti nei fluidi biologici, miRNA extracellulari, rappresentano una nuova forma di comunicazione intercellulare attraverso il trasferimento di **informazioni genetiche** da una cellula donatrice a una cellula accettrice.

Questi microRNA una volta maturi, vengono:

1. Incorporati nel RISC, appaiati con il suo mRNA target e reprimere la traduzione e indurre la sua degradazione;
2. Oppure i miRNA vengono trasferiti da cellule riceventi a cellule accettrici dove possono alterare l'espressione genica;
3. Oppure possono essere esportati fuori dalla cellula e trasportati da diversi carrier. Quindi vengono impacchettati e trasportati attraverso diversi meccanismi che sono associati a proteine o complessati a lipoproteine.



I miRNA quindi circolano nei fluidi biologici e quindi possono essere usati come marker per la diagnosi della malattia e per la terapia di alcune patologie. Rappresentano dei marcatori diagnostici tumorali non invasivi; è più facile rilevare un microRNA alterato all'interno del sangue che fare una biopsia ad esempio.

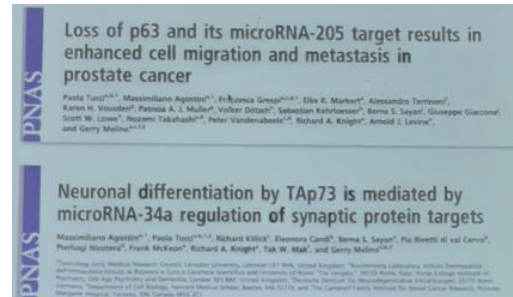
Ad esempio **nel breast cancer** il miR-195 è stato visto come un possibile marcatore di diagnosi di questa patologia, nella prostata il miR-141, nelle urine il miR-126 e miR-182. Quindi posso rilevarli sia come indice di prognosi perché mi dicono se il microRNA è più di un tessuto metastatico oppure no, oppure gli stessi sono anche importanti nell'andamento della malattia perché ci dicono se una terapia sta procedendo bene o no.

Hanno un ruolo in numerosi processi fisiologici, tra cui proliferazione, apoptosi e differenziamento cellulare. Possono essere deregolati in malattie umane, e quindi coinvolti nella tumorigenesi e non solo (ad esempio anche in malattie cardiache e neurodegenerative).

Lo studio dei miR ha così aperto nuove prospettive nella comprensione dello sviluppo delle cellule cancerose, permettendo di comprendere meglio la patogenesi tumorale, di migliorare le prospettive diagnostiche e di aprire nuove possibilità terapeutiche.

Esempi di studi sui miRNA e i loro target

Nel **primo studio** abbiamo la perdita di p63. Abbiamo visto che p63 nei tessuti di cancro della prostata era down-regolato, mentre nei tessuti normali era presente. In questi tumori, dove p53 è mutato, questo va a bloccare la funzione di p63. Ecco perché nei tumori della prostata p63 non era presente. La funzione di p63 nel tessuto prostata era quella di andare ad attivare un microRNA (miR205). A sua volta il miR-205 ha come target una proteina implicata nella transizione epitelio-mesenchimale (quindi nelle metastasi). Quindi, mancando p63, si aveva metastasi e progressione tumorale. Allora è stato inserito p63 e si è visto che attiva il miR-205, questo va a bloccare la proteina (zeb1) e si aveva la riduzione della metastasi tumorale (tutto questo è stato visto nel topo). È stato fatto anche un **secondo studio** riguardante il differenziamento neuronale con p73. È stato visto che il target di p73 è il miR-34; questo a sua volta va ad inibire dei geni che sono coinvolti nel differenziamento neuronale. Quindi la differenziazione neuronale è mediata da p73 e dal miR-34 che ha delle rilevanze anche in alcune malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer.



I microRNA sono coinvolti in molti processi fisiologici e anche in quelli di **aging e senescenza cellulare**. È stato svolto un esperimento nel quale era coinvolta anche la prof. Paola Tucci (nostra prof di biologia molecolare) in collaborazione con la direttrice scientifica della Chanel. È stato fatto questo lavoro per vedere l'espressione dei microRNA coinvolti nell'invecchiamento cellulare. È stato visto un loop tra p63 (implicato nei processi epiteliali) e i microRNA nella senescenza dei cheratinociti. Ne è venuta fuori **"LE LIFT"** la crema Chanel.



Se si vanno a leggere i principi attivi c'è scritto: "nel cuore della formula un principio attivo esclusivo naturale e ultrapotente, ottenuto dopo 12 anni di ricerca nella sua forma più pura e concentrata".

Una volta identificati i microRNA responsabili dell'invecchiamento delle cellule della pelle, sono andati a vedere quali molecole potessero attivare questi microRNA.

La molecola individuata, agisce sulla produzione dei microRNA responsabili dell'invecchiamento cutaneo, regolandone la quantità.

Questo per dire come è bella la ricerca biologica che ha dei risvolti e delle applicazioni importanti.

CONCLUDENDO: facendo una ricerca su PubMed si trovano oltre 28.000 articoli sui miRNA, essi sono una rivoluzione nella comprensione della biologia molecolare. Ovviamente c'è ancora molto da lavorare e soprattutto da **studiare**.