

RUOLO DI PICCOLI RNA NELL'ESPRESSIONE GENICA

Irene Bozzoni

Per diversi decenni, dalla sua scoperta, l'RNA è stato considerato quasi esclusivamente l'effettore molecolare deputato a trasferire l'informazione genetica dal DNA all'apparato traduzionale. Tuttavia recentemente si è scoperto che l'RNA può svolgere altre funzioni oltre quella codogena: l'RNA ha attività catalitiche tra cui quella di catalizzare la formazione e scissione di legami fosfodiesterici in assenza di proteine. Sono seguite piccole grandi novità (es. antisense, ribozima, decoy) e soprattutto il silenziamento genico ("RNA interference", RNAi) svolto dall'RNA a doppio filamento. Il silenziamento genico è attivo in funghi, piante, animali (e cellule umane), e ciò suggerisce una sua origine molto antica, prima ancora della divergenza tra questi regni. Inizialmente si riteneva che l'RNAi rappresentasse un sistema di difesa della cellula dalla penetrazione di acidi nucleici esogeni; ma in realtà svolge un ruolo fisiologico nella biosintesi di molti RNA cellulari e in numerosi processi di regolazione dell'espressione genica. Una tappa comune in tutti i sistemi in cui è stata studiata l'RNAi è la produzione di RNA della grandezza di 21-23 nucleotidi. Questi RNA mediano un gran numero di diverse funzioni che vanno dal controllo della stabilità dell'RNA alla modulazione della traduzione fino al silenziamento trascrizionale. Più recentemente le proprietà dell'RNAi sono state adattate allo scopo di ottenere l'inattivazione funzionale di geni specifici in maniera mirata. L'RNAi è diventata quindi uno strumento molto efficace sia per studi di genomica funzionale che per possibili applicazioni terapeutiche. La scoperta dei micro RNA è stata una rivoluzione nella biologia molecolare con implicazioni fisiologiche e patologiche non ancora del tutto completamente comprese e sviluppate.

Decoy

Molecole di RNA, spesso di dimensioni molto piccole, in grado di legare specifiche proteine ad alta affinità. Svolgono la funzione di competere per il legame di queste proteine ai loro substrati naturali.

Transgene

Gene inserito dall'esterno in una cellula ricevente.

RNAi in piante e funghi

Nelle piante l'RNAi fu descritta con termini diversi come "post-transcriptional gene silencing" (PTGS), "co-soppressione" e "virus-induced gene silencing" (VIGS), mentre nei funghi fu definita "quelling". Questi fenomeni furono considerati meccanismi di protezione contro la penetrazione di DNA esogeno e contro le infezioni virali. Il primo fenomeno di silenziamento fu denominato co-soppressione a causa del fatto che un **transgene** introdotto in una pianta, al fine

di ottenere un aumento del prodotto del gene, determinò viceversa la soppressione dell'espressione sia del transgene che del corrispondente gene cellulare. Questo fu il caso osservato in piante di petunia in cui era stato inserito un gene per la pigmentazione dei petali (chalcone syntase - *cho*) allo scopo di aumentare l'intensità del colore del fiore; al contrario di quanto atteso, si ottennero dei fiori variegati in cui parte della colorazione era persa.

Un fenomeno simile fu osservato nel fungo *Neurospora crassa* con la trasformazione di un transgene necessario alla

Primer

Corta sequenza di RNA che appaiandosi ad uno stampo funge da innesco per l'attività di polimerizzazione di un'elica complementare da parte di una polimerasi.

RNasiIII

Endoribonucleasi specifica per l'RNA a doppio filamento che taglia su ambedue le eliche in posizioni sfalzate di due nucleotidi. Lascia estremità 3'-OH e 5'-P.

Antisenso

Proprietà legata alla capacità dell'RNA di riconoscere sequenze complementari su altri RNA inibendone specifiche funzioni. L'attività antisense è stata utilizzata per interferire con il processo di splicing e con la traduzione.

Esonucleasi

Enzimi che degradano molecole di RNA a partire dalle estremità 5'-P (esonucleasi 5'-3') o dalle estremità 3'-OH (esonucleasi 3'-5'). Gli mRNA possono essere degradati attraverso questa via solo se subiscono un taglio endonucleolitico in quanto le estremità di un mRNA intatto sono normalmente protette dal cap al 5' e dalla coda di poli-A al 3'.

biosintesi del carotene (*albino-1*). Invece di ottenere un fenotipo arancione più marcato del tipo selvatico, un'alta percentuale delle colonie risultò bianca. A questo fenomeno fu dato il nome di "quelling" e risultò, come nel caso sopra descritto, nel diminuito accumulo di mRNA trascritto dal transgene e dal corrispondente gene cellulare.

Il VIGS fu invece definito dalla capacità di transgeni del Potato Virus X di indurre resistenza virale in piante di tabacco trasdotte, indicando che il virus stesso può indurre nella pianta una risposta di difesa alla sua replicazione. La capacità del segnale protettivo di diffondere dal luogo d'inoculazione alle cellule circostanti rappresentava un grosso vantaggio per questo sistema di difesa e lo assimilava assai bene ad un primitivo sistema immunitario. Oltre a rappresentare un sistema antivirale, l'RNAi fu considerato anche un potente mezzo per limitare la dispersione di elementi trasponibili all'interno del genoma; infatti nei Nematodi la perdita di funzioni di geni richiesti per l'RNAi portava all'attivazione di elementi trasponibili nella linea germinale.

Tutta questa varietà di definizioni e osservazioni perse frammentarietà quando si scoprì che in tutti i casi descritti gli effettori della risposta di silenziamento erano piccoli RNA, di 21-23 nucleotidi di lunghezza (siRNA), con sequenza omologa all'RNA bersaglio, derivanti da precursori a doppio filamento (dsRNA) di diversa lunghezza e provenienza e digeriti in frammenti di queste dimensioni dall'enzima Dicer, una endoribonucleasi appartenente alla famiglia delle RNasiIII. Gli siRNA prodotti mediano il riconoscimento dell'RNA substrato mediante appaiamento di basi, e dirigono un taglio endonucleotidico su di esso tra i residui appaiati con i nucleotidi 10 e 11 dell'siRNA. Successivamente, le estremità 5'-P e 3'-OH prodotte dal taglio vengono attaccate da **esonucleasi** che operano la degradazione totale del substrato (Figura 1).

In piante, nematodi e funghi è stato dimostrato che il processo di silenziamento richiede un altro importante com-

ponente; si tratta delle proteine RdRP (RNA-dependent RNA Polymerase). Tali enzimi sono in grado di convertire RNA a singolo filamento in dsRNA sia in presenza che in assenza di un **primer**. L'azione di tale enzima è importante sia per l'inizio che per l'amplificazione del processo di silenziamento e permette la produzione di RNA a doppio filamento che innescano il ciclo dell'RNAi determinando la produzione di siRNA. L'attività polimerasica in assenza di primer è particolarmente importante per l'innesco del silenziamento successivo ad un'infezione virale o alla presenza di un trascritto di un transgene. Ancora non è stato chiarito come vengano distinti gli RNA cellulari da quelli virali o di transgeni. Si ipotizza che possano esistere delle modificazioni distintive che differenzino i trascritti cellulari da quelli "aberranti". L'attività di RdRP in presenza di primer è invece importante per il mantenimento e l'amplificazione del silenziamento. Una singola molecola di RNA aberrante può quindi dar luogo a molte molecole di RNA a doppio filamento che sono successivamente convertite in siRNA; a loro volta questi possono fungere da primer e innescare l'ulteriore produzione di dsRNA che si reinserisce nel pathway di Dicer (Figura 1).

RNAi in animali

Queste prerogative che sembravano esclusive delle piante e dei funghi furono confermate anche nelle cellule animali quando Fire nel 1998 dimostrò che l'iniezione di RNA a doppio filamento (dsRNA) in animali adulti del nematode *C.elegans* produceva il silenziamento di geni con sequenza omologa a quella del dsRNA somministrato. Tale silenziamento, denominato RNA interferenza (RNAi), risultava molto più efficace dell'iniezione di RNA **antisense** a singolo filamento, metodo classicamente usato fino ad allora per inattivare specifiche funzioni geniche. Poche molecole erano sufficienti per ottenere un grosso effetto interferente e quest'attività funzionava

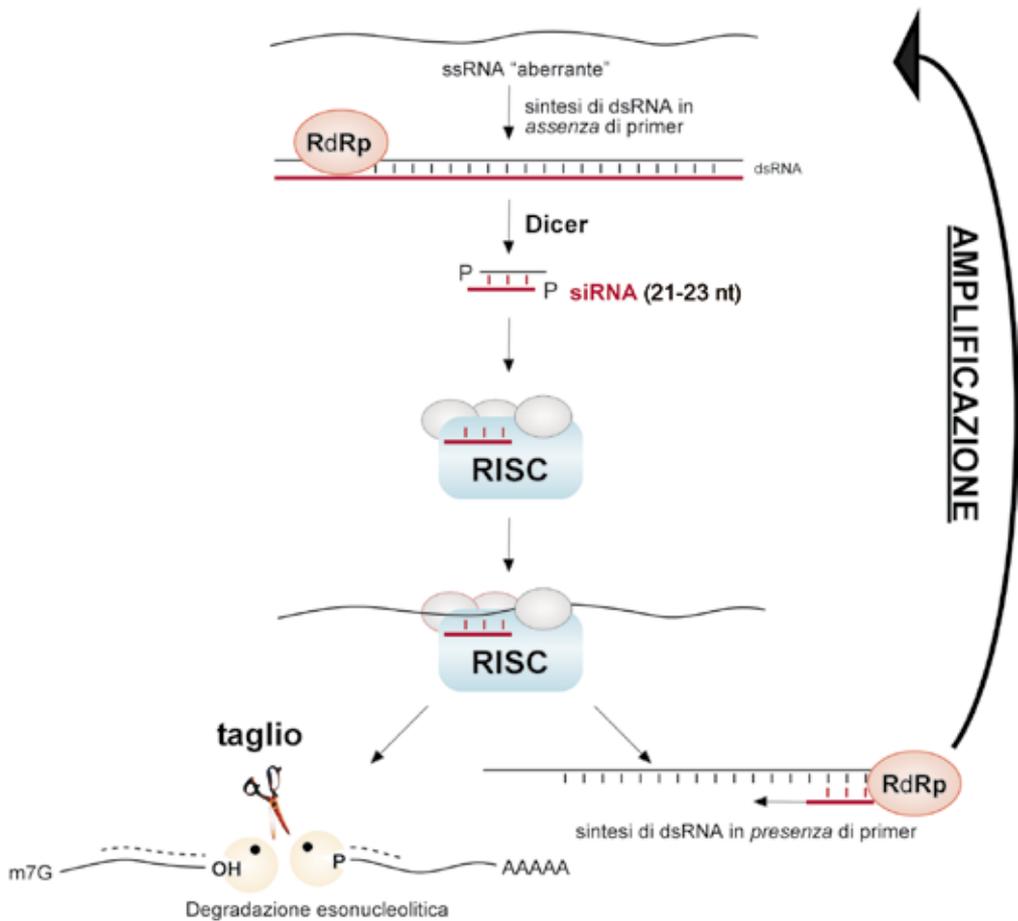


Figura 1. RNAi in Pianta, Funghi e Nematodi.

L'enzima Dicer converte dsRNA lunghi in dsRNA di 21-23 nucleotidi. Una sola elica (siRNA) viene incorporata nel complesso RISC. L'RNA substrato, riconosciuto per appaiamento di basi con l'siRNA, può andare incontro a taglio e degradazione o fungere da stampo per la RdRp. In questo caso viene prodotto un dsRNA lungo che rientra nel pathway di taglio di Dicer e determina l'amplificazione della risposta di silenziamento. I prodotti del taglio primario sull'mRNA hanno estremità 3'-OH e 5'-P. Tali estremità sono attaccate da esonucleasi che completano la degradazione del substrato. 7mG e AAAA indicano rispettivamente la struttura cap al 5' e la coda di poli-A al 3' dell'mRNA.

non solo nell'animale iniettato ma poteva essere trasmessa alla linea germinale. Un potente segnale di silenziamento poteva essere passato dallo sperma o dalle uova per diverse generazioni; ugualmente sorprendente era il fatto che l'effetto di silenziamento potesse passare da tessuto a tessuto nello stesso animale microiniettato.

Successivamente fu dimostrato che anche in cellule di *Drosophila* la som-

ministrazione di dsRNA determinava il silenziamento genico in maniera sequenza-specifica; viceversa, questa risposta non si aveva in cellule di mammifero in coltura comunemente usate. È da notare che in tutti questi esperimenti veniva usato dsRNA lungo anche diverse centinaia di basi. L'apparente assenza di RNAi nei mammiferi poteva essere spiegato dal fatto che era noto che RNA a dop-

pio filamento, di lunghezza superiore a 30 nucleotidi, e che mimano situazioni di infezioni da virus ad RNA, inducono nel citoplasma di cellule di mammifero la sintesi di interferone con profonde conseguenze che portano alla morte cellulare. La risposta all'interferone produce infatti l'attivazione della protein-chinasi PKR e della 2'-5'-oligoadenilato sintetasi, eventi questi che determinano rispettivamente la fosforilazione del fattore d'inizio della traduzione eIF2a, con conseguente blocco della traduzione, e l'attivazione della ribonucleasi L, con degradazione dell'mRNA. Nel 2001 Elbashir e colleghi⁷ riuscirono ad ottenere una risposta di RNAi, senza indurre la risposta dell'interferone, somministrando dsRNA corti solo 21-23 nucleotidi. Questi esperimenti aprirono la strada allo sfruttamento delle grandi potenzialità dell'RNAi in cellule di mammifero permettendo l'analisi della funzione di specifici geni e potendone modulare l'espressione.

miRNA

I meccanismi di silenziamento genico sopra descritti sembravano far pensare che questi si fossero evoluti come sistemi specifici di difesa cellulare verso DNA esogeno, virus a RNA o mobilitazione di trasposoni. Più recentemente è stato invece scoperto che quasi l'1% dei geni cellulari, sia in piante che in animali, codifica per sequenze in grado di formare corte regioni a doppio filamento che vengono maturate con il macchinario di biosintesi dell'RNAi, e in particolare dall'enzima Dicer (Figura 2). I trascritti di questi geni vengono maturati in RNA di 21-23 nucleotidi a singolo filamento; essi sono stati definiti microRNA (miRNA) e repeat associated short interfering RNAs (rasiRNA) e funzionano come "guide" per il riconoscimento di sequenze substrato. Il grado di complementarità tra il miRNA e il suo substrato (mRNA) è l'elemento che determina il destino dell'RNA substrato riconosciuto: mentre l'appaiamento perfetto, come nel caso della maggior

parte dei miRNA vegetali, avvia l'mRNA verso la degradazione, un appaiamento imperfetto nella parte centrale del duplex produce invece un blocco traduzionale (Figura 3). I rasiRNA, a differenza degli siRNA e dei miRNA, inducono invece silenziamento trascrizionale. Nel regno animale, tranne un'eccezione (miR-196), non sono stati identificati miRNA con perfetta complementarità di sequenza a mRNA, indicando che in questi organismi i miRNA agiscono principalmente come controllori della traduzione. In genere le sequenze riconosciute dai miRNA sono state trovate nel 3'UTR degli mRNA.

Nonostante sia stata effettuata una dettagliata caratterizzazione e classificazione sia in piante che animali, ancora poco si sa sul ruolo di ogni specifico miRNA. I membri fondatori della famiglia dei miRNA, *lin-4* and *let-7*, furono identificati in *C.elegans* dove essi controllano lo sviluppo temporale della larva. Da allora il numero di miRNA è aumentato fino a diverse centinaia e la loro esistenza è stata dimostrata in tutti gli eucarioti con l'unica eccezione del lievito *S.cerevisiae*. La conservazione evolutiva di molti miRNAs in organismi evolutivamente distanti suggerisce antiche ed importanti funzioni per questa classe di regolatori/modulatori dell'espressione genica.

Biosintesi di siRNA e miRNA

Da quanto detto appare chiaro che esiste nelle cellule eucariotiche un meccanismo molto conservato che permette la conversione di RNA a doppio filamento in corte molecole molto attive sia nel controllo di circuiti cellulari importanti per lo sviluppo e il differenziamento (miRNA) sia nella difesa da RNA a doppio filamento originante da situazioni aberranti o di pericolo quali **retrotrasposoni**, virus ad RNA e trascritti anomali (siRNA).

I miRNA sono trascritti nel nucleo come precursori (pri-miRNA) contenenti regioni a doppio filamento; l'enzi-

Retrotrasposoni

Trasposoni che si spostano tramite una forma a RNA; l'elemento a DNA viene trascritto in RNA, quindi inversamente trascritto in DNA, il quale viene poi inserito in un nuovo sito genomico.

ma Drosha, un'endonucleasi con domini simili alle RNasiIII e con domini di legame al dsRNA, forma un eterodimero con la proteina Pasha e converte il trascritto primario in uno stem-loop di circa 70-100 nucleotidi (pre-miRNA). Tale enzima, come tutte le RNasiIII, produce un'estremità 3'-OH ed una 5'-fosfato con due nucleotidi sporgenti. Il pre-miRNA è esportato al citoplasma attraverso uno specifico recettore nucleare, l'esportina V. Una volta nel citoplasma la maturazione finale del pre-miRNA converge con quella dei dsRNA lunghi: l'enzima Dicer, una ribonucleasi simile a Drosha e anch'essa appartenente alla famiglia delle nucleasi RNasiIII, lega le regioni a doppio filamento dell'RNA e taglia producendo estremità sfaldate. I prodotti finali sono dsRNA lunghi 21-23 nucleotidi (Figura 2). Tali dsRNA sono successivamente dissociati e i singoli filamenti si trovano assemblati in diversi complessi effettori definiti RISC, miRNP e RITS

a seconda della specifica funzione svolta. RISC è responsabile della degradazione dell'RNA target, miRNP determina la repressione traduzionale e RITS guida la condensazione cromatinica con conseguente silenziamento trascrizionale. A seconda del complesso di cui fanno parte, gli RNA prendono il nome rispettivamente di siRNA, miRNA e rasiRNA (Figura 3).

Nelle piante, a differenza degli animali, ambedue i tagli che portano alla produzione dei miRNA a doppio filamento avvengono nel nucleo ad opera di una ribonucleasi simile a Dicer, DCL. HASTY, l'omologo nelle piante dell'esportina V, è responsabile del trasporto dei miRNA dal nucleo al citoplasma.

Nei diversi organismi i componenti dell'apparato di RNAi sono spesso rappresentati da più varianti (Figura 4). Per esempio *Drosophila* possiede due Dicer: DCR-1 processa i precursori dei miRNA e lavora in forma di eterodimero con

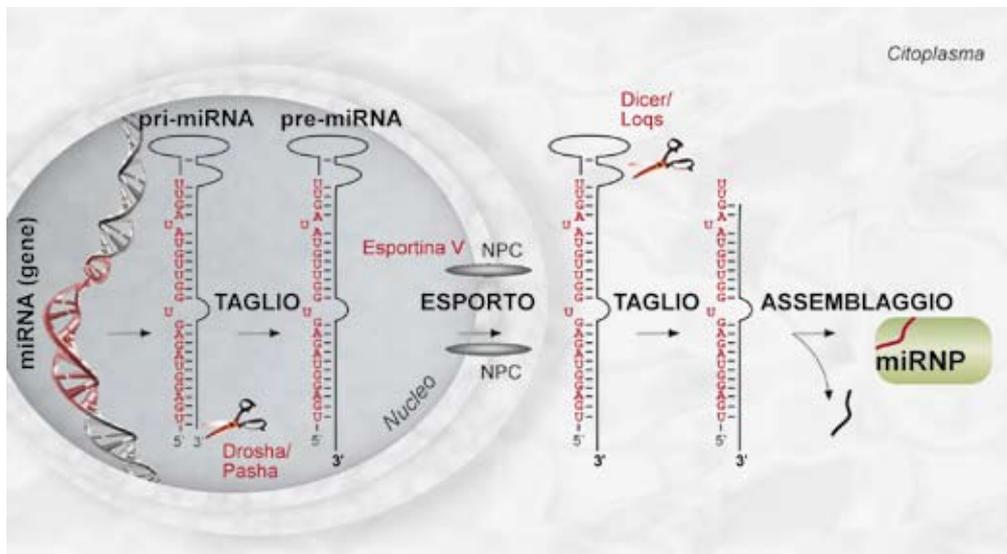


Figura 2. Biogenesi dei miRNA.

Nel nucleo i trascritti primari dei geni codificanti per miRNA (pri-miRNA) sono processati dall'enzima Drosha in complesso con la proteina Pasha. Quest'ultima ha domini di legame all'RNA a doppio filamento. Nel citoplasma la conversione dei pre-miRNA avviene ad opera della proteina Dicer in associazione con Loqs (*Drosophila*) o TRBP (uomo). Le proteine Dicer nei diversi organismi sono enzimi molto grandi (~200 kD) e contengono diversi domini con funzioni cruciali per l'attività della proteina: un dominio carbossi-terminale di legame all'RNA a doppio filamento (dsRBD), due domini catalitici di tipo RNasiIII ed anche domini PAZ e ATPase/RNA elicasi. Il trasferimento dei prodotti originati dalla catalisi di Dicer vengono passati al complesso RISC probabilmente grazie all'interazione tra il dominio RNasiIII di Dicer e il dominio PIWI di Argonaute, uno dei costituenti fondamentali di RISC.

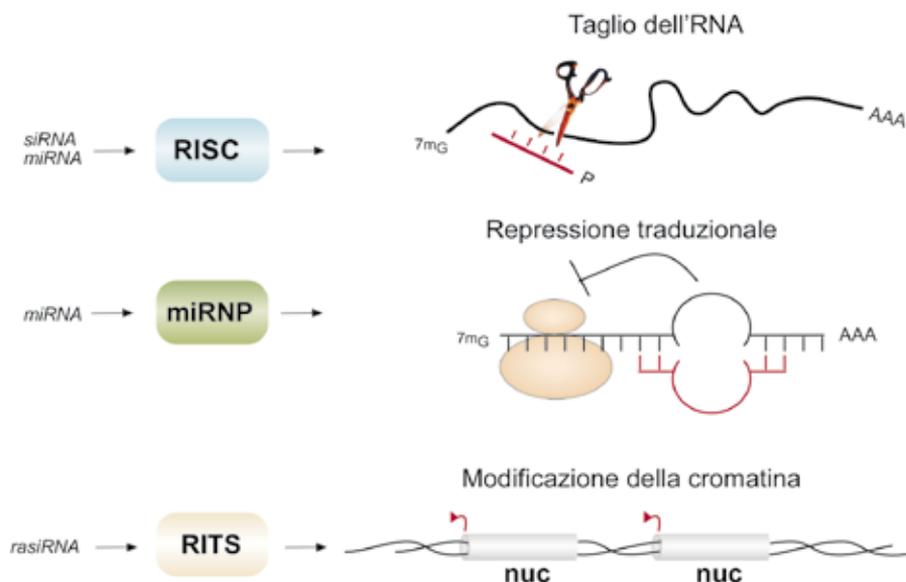


Figura 3. Funzioni dell'RNAi

A tutt'oggi è stato dimostrato che esistono tre meccanismi d'azione dell'RNA interference. Tutti coinvolgono la conversione di dsRNA in RNA a singolo filamento lunghi appena 21-23 nucleotidi, e definiti, a seconda del caso, siRNA, miRNA e rasiRNA. Il primo meccanismo è quello mediato nel citoplasma dagli siRNA che, riconoscendo il substrato mediante perfetto appaiamento di basi, ne dirigono la degradazione (nelle piante questo processo attiene anche alla maggior parte dei miRNA). Il secondo è mediato dai miRNA e porta a repressione traduzionale attraverso un appaiamento non perfetto tra il miRNA e il suo mRNA substrato. Il terzo meccanismo è mediato dai rasiRNA, avviene nel nucleo e, attraverso la metilazione del DNA o la modificazione degli istoni, porta al silenziamento trascrizionale.

HIV

Un retrovirus che appartiene più specificamente alla famiglia dei lentivirus. Determina una forma di grave immunodeficienza. Oltre ai geni *gag*, *pol* ed *env*, il genoma contiene due geni regolatori, *tat* e *rev* essenziali per il controllo dell'espressione genica, ed un numero variabile di geni accessori. Questi virus sono in grado di infettare anche cellule quiescenti.

la proteina Loquacious (Loqs), mentre DCR-2 è richiesta per la maturazione dei dsRNA lunghi e forma eterodimeri con la proteina R2D2. In *C.elegans*, così come in mammiferi, è stata viceversa identificata una sola Dicer. È stato ipotizzato che in questo caso esistano proteine adattatrici che permettono a Dicer di riconoscere diversi fonti di dsRNA. In cellule umane è stata identificata, come partner d'interazione di Dicer, la proteina TRBP [HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein]. Essa appartiene ad una famiglia di proteine con omologie di sequenza al fattore Loquacious in *Drosophila*.

In *Arabidopsis* sono state identificate diverse proteine di tipo Dicer con delle proprie specializzazioni: DCL1 processa i miRNA, DCL2 produce siRNA da

virus vegetali e DCL3 è coinvolta nella produzione di rasiRNA. Pertanto, i continui progressi nella caratterizzazione dei complessi in cui si trovano associati i componenti dell'RNAi in diverse specie animali e vegetali, permetterà presto di chiarire quali siano gli specifici "segnali" molecolari che determinano il riconoscimento di dsRNA di origine diversa.

I complessi che contengono gli siRNA e i miRNA (RISC e miRNP) sono molto grandi e, a seconda delle metodiche di purificazione, variano tra i 130 e 160kDa, nel caso di un RISC purificato ad alto sale da cellule umane, a 500kDa o 80S nel caso di RISC da lisati cellulari di *Drosophila*. La massa così elevata sembrerebbe essere dovuta all'associazione transiente con componenti iniziali del processamento come Dicer e proteine ad essa associate. Il componente più impor-

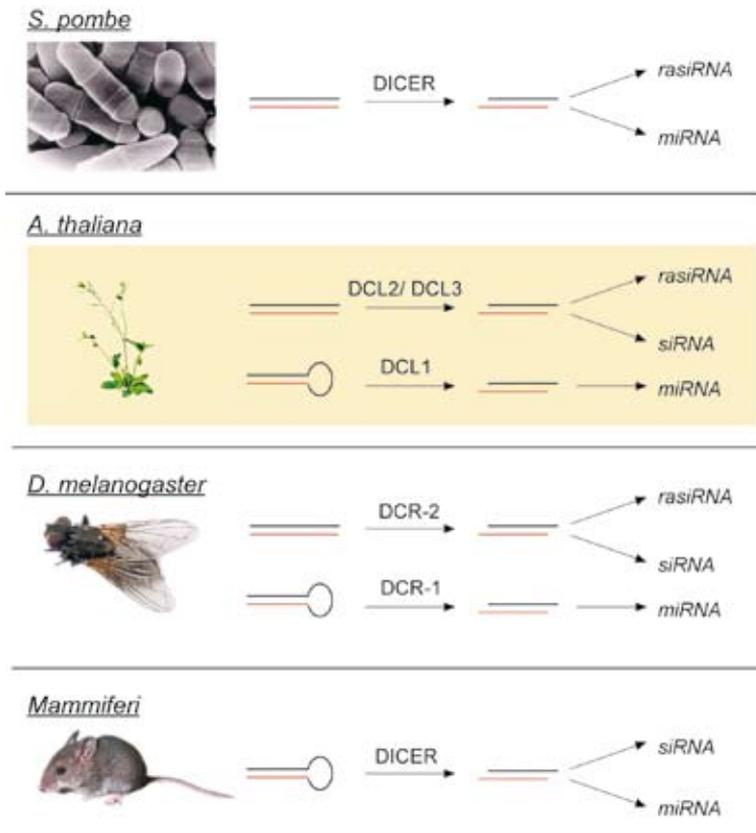


Figura 4. Pathway di RNAi attivi nei diversi organismi

I precursori dei dsRNA lunghi e dei miRNA sono processati, nei vari organismi, da diversi membri della famiglia Dicer producendo le tre classi di prodotti maturi: siRNA, miRNA e rasiRNA.

Box 1 | La scoperta dei primi miRNA in *C.elegans*

Le prime evidenze sull'esistenza di miRNA e sul loro ruolo nella regolazione traduzionale furono ottenute nel Nematode *Caenorhabditis elegans* con l'identificazione di RNA microscopici in grado di ridurre la sintesi proteica senza modificare i livelli di accumulo di specifici mRNA. Il primo gene codificante per uno di questi RNA, lin-4, fu identificato con esperimenti di "transformation rescue" di mutanti con alterazioni nel corretto sviluppo temporale dell'embrione. Il DNA in grado di sopprimere queste mutazioni non codificava per proteine bensì per trascritti che si accumulavano nella cellula come specie di 22 e 66 nucleotidi. Oggi identifichiamo in queste specie il miRNA maturo (22 nucleotidi) e il suo precursore citoplasmatico (pre-miRNA) prima del taglio di Dicer (66 nucleotidi). Questo RNA conteneva sequenze complementari ad elementi ripetuti nel 3'UTR dell'mRNA codificante per la proteina LIN-14, precedentemente dimostrata, tramite approccio genetico, essere controllata da lin-4. Dopo qualche anno fu identificato un altro miRNA, let-7, anch'esso importante nel controllo dello sviluppo temporale di *C.elegans* e anch'esso complementare a sequenze presenti nel 3'UTR dell'mRNA per LIN-14. L'analisi dei profili polisomiali da estratti cellulari indicavano che una certa

(continua)

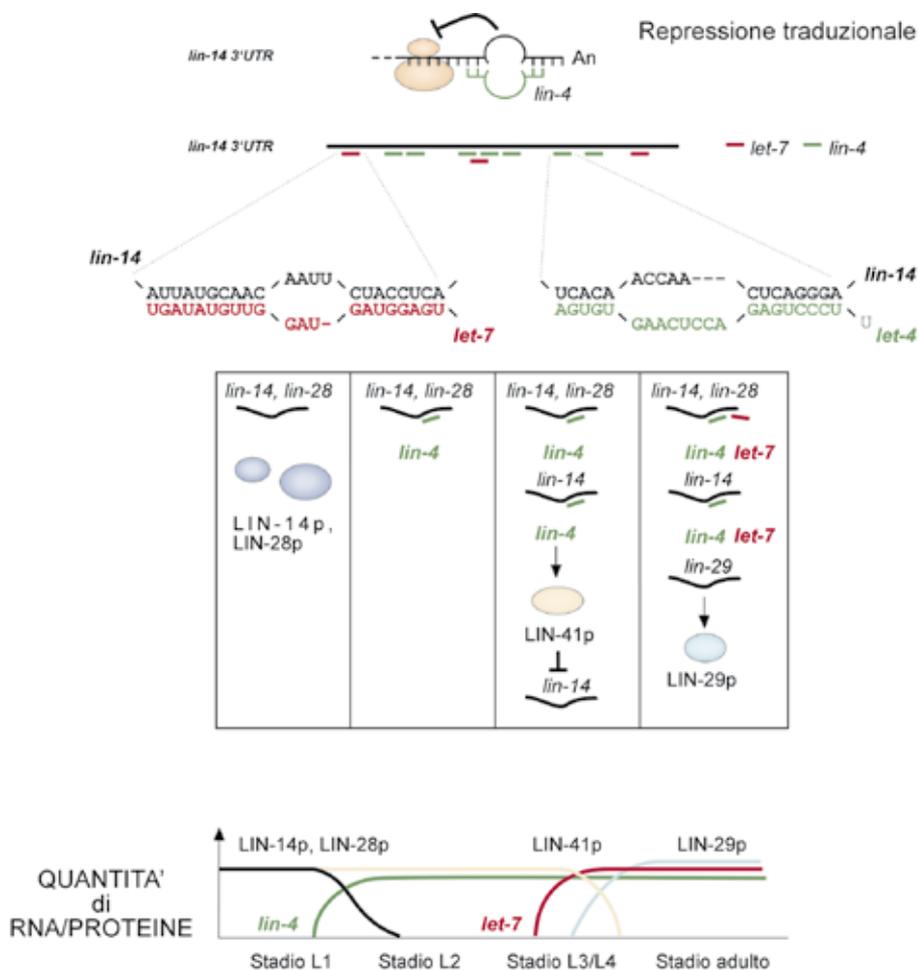
(continua Box 1)

frazione di miRNA era stabilmente associata ai ribosomi insieme con l'mRNA target. Questi esperimenti permisero di concludere che esisteva un'interazione fisica tra miRNA e mRNA target e che questa portava ad inibizione traduzionale. Successivamente, fu dimostrato che *lin-4* e *let-7* controllano negativamente anche l'mRNA per LIN-28 e per LIN-41; la repressione di LIN-41 permette la sintesi di LIN-29, essenziale per la progressione agli stadi larvali avanzati. Tutte queste interazioni stabiliscono un circuito regolativo molto fine operante a livello post-trascrizionale necessario per il passaggio dagli stadi larvali a quelli adulti (Figura 5).

Dati più recenti sugli stessi miRNA studiati in cellule umane indicano che le microribonucleoproteine (miRNP) contenenti il miRNA *let-7* inibiscono specificamente lo stadio di inizio della traduzione, suggerendo un meccanismo in cui la miRNP interferisce con il riconoscimento della struttura cap dell'mRNA da parte dei fattori d'inizio della traduzione (eIF4E). Sia gli mRNA repressi che i miRNA e le proteine Ago sono stati trovati associati in strutture citoplasmatiche definite "processing bodies", suggerendo che la localizzazione dell'mRNA in queste strutture sia conseguenza della repressione traduzionale.

Transformation rescue

Tecnica utilizzata per l'identificazione del gene responsabile di una determinata funzione. Organismi mutanti vengono trasformati con una collezione di costrutti corrispondenti a tutti i geni cellulari; quello che permette il ripristino del fenotipo selvatico contiene il gene cercato.



Modello di regolazione stadio-specifica dei geni eterocronici di *C. elegans* da parte degli RNA *lin-4* e *let-7*.

Nella parte alta sono indicati gli esempi degli appaiamenti non perfetti dei miRNA animali *let-7* e *lin-4* con il 3'UTR del messaggero bersaglio (*lin-14*). Al termine del primo stadio larvale (L1) all'aumentare di *lin-4* diminuiscono i livelli d'espressione delle proteine LIN-14 e LIN-28 e questo permette la progressione agli stadi successivi. Nelle fasi larvali più tardive, *let-7* in maniera simile a *lin-4*, reprime l'espressione di LIN-41 e ciò permette l'espressione della proteina LIN-29 e la progressione allo stadio adulto.

tante di RISC o di miRNP è rappresentato da un membro della famiglia di proteine Argonata (Ago). Il passaggio da Dicer a RISC sembra essere mediato dall'interazione di Dicer con Ago attraverso specifici domini d'interazione.

Una sola delle due eliche del dsRNA si trova stabilmente associata in RISC o in miRNP mentre l'altra elica (passenger) viene degradata. Analisi su numerosi substrati naturali e esperimenti su substrati artificiali hanno fatto concludere che la scelta dell'elica da incorporare in RISC dipenda dalla diversa stabilità termodinamica delle due estremità del dsRNA. In *Drosophila* è stato dimostrato che l'associazione dell'eterodimero Dicer-2/R2D2 al dsRNA determina quale elica sarà trasferita al complesso RISC. R2D2 lega infatti l'estremità con maggior stabilità termodinamica e in questa maniera orienta l'eterodimero sul doppio filamento; R2D2 lega il terminale 5'-fosfato sull'elica di siRNA che sarà esclusa da RISC. Pertanto R2D2 è sia un sensore dell'asimmetria termodinamica che un fattore di controllo per rilasciare uno specifico siRNA dal corrispondente precursore dsRNA. All'interno del complesso RISC il componente più cruciale sembra essere la proteina Argonata (Ago).

Come per Dicer, anche Ago è rappresentata da diversi membri nei diversi organismi: *S.pombe* ne possiede 1, *C.elegans* 20, *D.melanogaster* 5, *A.thaliana* 10 e uomo 8. Queste proteine non sembrano avere funzioni ridondanti bensì ruoli ben distinti. In specie in cui esistono più proteine Dicer la specificità del caricamento dei piccoli RNA nei complessi RISC, miRNP o RITS è probabilmente controllata da interazioni di specifici membri delle due famiglie. Per esempio in *Drosophila* Ago1 è richiesta per l'accumulo di miRNA mentre Ago2 per la degradazione di mRNA mediata da siRNA. Interessante notare anche che nell'uomo, mentre è stata rilevata attività di taglio con Ago2, non si è ottenuto lo stesso risultato con Ago1 o Ago3. All'interno di RISC il taglio del substrato non richiede ATP, mentre questo diventa indispensabile per la suc-

cessione di cicli multipli di associazione, taglio e dissociazione.

Analisi cristallografica e saggi biochimici su complessi purificati all'omogeneità indicano che Ago2 non solo sia il componente in grado di legare e posizionare l'siRNA e il corrispondente substrato ma anche il fattore che media il taglio endonucleolitico sull'RNA bersaglio. L'attività di taglio di Ago2 è importante anche per la risoluzione del dsRNA; infatti la proteina Ago2 riceve l'RNA a doppio filamento dal complesso di assemblaggio di RISC e taglia l'elica "passenger" determinando la liberazione dell'siRNA e la formazione del complesso RISC attivo. A differenza degli siRNA, il taglio dell'elica "passenger" non è importante per l'incorporazione dei miRNA nei complessi miRNP.

Come già detto, molti sono i fattori associati nei complessi RISC o miRNP. Nell'uomo i miRNA sono stati trovati associati oltre che con Ago2 con eIF2C2 (fattore d'inizio della traduzione) e con due **RNA elicasi** Gemin3 e Gemin4.

Funzione dei miRNA

Animali

Nonostante non sia stato ancora chiarito il meccanismo molecolare attraverso il quale i miRNA reprimono la traduzione, cominciano ora ad accumularsi diversi studi sul ruolo di specifici miRNA e sull'identificazione dei rispettivi target.

Nei mammiferi sono stati descritti ormai diversi circuiti cellulari in cui è coinvolta la funzione di un miRNA, nella maggior parte dei casi essi svolgono un ruolo rilevante nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare. Un esempio interessante è quello di miR-181, un RNA espresso nel tessuto ematopoietico e specificamente in **cellule B** del topo. È stato dimostrato che l'espressione ectopica di miR-181 in progenitori cellulari ematopoietici porta ad un aumento del differenziamento verso cellule B sia in sistemi in coltura che nell'animale. Questi risultati indicano il ruolo fondamentale

RNA elicasi

Proteine che catalizzano la denaturazione di due filamenti di RNA complementari. In genere per il funzionamento necessitano dell'idrolisi di ATP.

Cellule B

Cellule del sistema immunitario responsabili della sintesi di anticorpi

di un miRNA nel dirigere uno specifico differenziamento cellulare. Analogamente a miR-181, è stato recentemente identificato un altro miRNA (miR-223) che è responsabile nell'uomo di promuovere il differenziamento granulocitario a partire da precursori promielocitici. L'espressione di questo miRNA è modulata dal legame competitivo di due fattori trascrizionali, NFI-A e C/EBP α , al proprio promotore ed i suoi livelli di espressione sono cruciali per la regolazione del processo differenziativo. Mentre NFI-A mantiene miR-223 a bassi livelli, la sua sostituzione, dopo induzione al differenziamento, da parte di C/EBP α produce l'aumento della trascrizione del miRNA. È stato dimostrato che il legame di C/EBP α e la granulopoiesi sono favorite da un circuito a feedback negativo in cui miR-223 reprime la traduzione di NFI-A (Figura 6).

Un altro esempio interessante è rappresentato da miR-375 che è espresso specificamente nel pancreas endocrino

ed è responsabile di inibire, quando sovra-espresso, la secrezione di insulina indotta dal glucosio. In questo caso sono anche stati identificati presunti mRNA target aprendo la strada ad una caratterizzazione completa del circuito di eventi molecolari alla base della risposta al glucosio da parte del pancreas.

Nel caso del miR-143 è stato invece descritto un ruolo importante nel differenziamento adipocitario: i livelli di questo trascritto aumentano durante il differenziamento e viceversa, se vengono artificialmente diminuiti, si osserva inibizione del differenziamento.

Recentemente è stato proposto anche un ruolo dei miRNA nell'oncogenesi come nel caso di miR-15 e miR-16: l'assenza dei geni per questi due miRNA correla con la leucemia linfocitaria cronica (CLL), la forma più comune di leucemia degli adulti. Altri esperimenti hanno identificato altri due miRNA (143 e 145) che mostrano livelli fortemente ridotti in

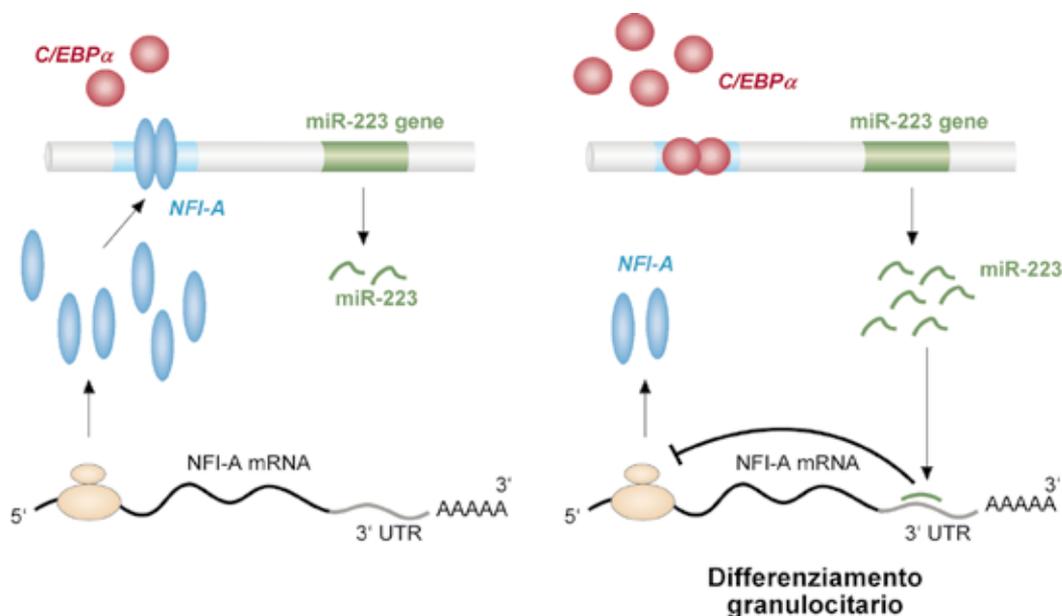


Figura 6. Circuito regolativo che coinvolge miR-223 nel differenziamento granulocitario umano.

In cellule promielocitiche non-differenziate (NB4), NFI-A lega il promotore del gene miR-223 mantenendo bassi livelli di espressione e conseguentemente bassi livelli di repressione traduzionale. Successivamente al trattamento con Acido Retinoico, che funge da stimolo differenziativo, aumentano i livelli di C/EBP α che sostituisce NFI-A sul promotore di miR-223. Ciò determina un aumento dei livelli di miR-223 e della repressione traduzionale di NFI-A con conseguente diminuzione dei livelli della corrispondente proteina. Questo feedback negativo permette la progressione e il mantenimento dello stadio differenziativo.

neoplasie colo-rettali. e, viceversa, livelli 100 volte più elevati nel caso di miR-155 nel linfoma di Burkitt. L'identificazione dell'alterata espressione di miRNA in molti tumori ha suggerito la possibilità di utilizzare informazioni sui livelli di espressione di queste molecole per la classificazione e diagnosi di diversi tipi di cancro.

Piante

Nelle piante esistono diverse differenze rispetto agli animali sia per quanto riguarda la biosintesi che il meccanismo d'azione. Mentre nei metazoi i miRNA sono processati da Droscha e Dicer in due tappe distinte che avvengono nel nucleo e nel citoplasma, nelle piante la loro maturazione è completata nel nucleo e da una sola Dicer. Un'altra importante differenza è che nelle piante i miRNA mostrano perfetto appaiamento con il substrato e invece di indurre repressione traduzionale del target con il quale appaiano, ne inducono taglio e successiva degradazione. Eccezione a questa regola è data da miR-172 che mostra solo parziale appaiamento col target e ne regola la traduzione. Inoltre, mentre negli animali le sequenze target per i miRNA sono presenti nel 3'UTR, nelle piante questi si trovano sia nella sequenza codificante che nel 5'UTR.

L'attività dei miRNA vegetali fu per prima dimostrata da mutanti della proteina Ago1 di Arabidopsis. Tali piante mostravano un peculiare aumento dell'accumulo di RNA messaggeri target di miRNA. Tra questi, interessante era il caso della stessa proteina Ago1, facente parte del complesso RISC, e il cui accumulo fu scoperto essere regolato dal miR-168. Fu dimostrato che piante transgeniche che esprimevano un mRNA di Ago1 mutante, con ridotta complementarietà per miR-168, accumulavano alti livelli di mRNA per Ago1 e mostravano fenotipi difettivi nello sviluppo simili a quelli dei mutanti di altri componenti del macchinario di RNAi. Inoltre, in questi mutanti *ago1*, aumentavano i livelli di

quegli specifici mRNA che erano target di miRNA, a indicare che un eccesso di Ago1 comprometteva la funzionalità del complesso RISC. I difetti nello sviluppo indotti dal messaggero resistente all'azione del miR-168 venivano eliminati grazie all'espressione di un miRNA reso complementare alla versione mutante dell'mRNA di Ago1.

RNAi e silenziamento cromatinico

Che l'RNAi avesse un ruolo anche nel silenziamento della trascrizione fu dimostrato per la prima volta nelle piante con l'osservazione che l'RNAi determinava la metilazione sequenza-specifica del DNA con successiva soppressione della trascrizione. Inoltre tali regioni potevano essere corte solo 30 nucleotidi facendo supporre il coinvolgimento di siRNA. Verosimilmente tali RNA fungono da guide nel riconoscimento di sequenze omologhe sul DNA e indirizzerebbero l'enzima metiltrasferasi a metilare tali regioni. Più recentemente è stato esteso il ruolo degli siRNA anche alla metilazione degli **istoni** e al silenziamento eterocromatinico.

La prima evidenza sperimentale che il silenziamento eterocromatinico coinvolgesse componenti dell'RNAi fu ottenuta nel lievito *S.pombe*. In ceppi particolari, in cui in diverse regioni dei **centromeri** erano stati inseriti geni marcatori **URA4**, si osservò che, mentre nelle cellule selvatiche questi geni erano silenziosi, nei mutanti per componenti del macchinario dell'RNAi essi si attivavano. Inoltre, si osservava che in tali mutanti si aveva l'accumulo nella cellula di 3 trascritti centromerici e conseguente perdita dello stato eterocromatinico. Un'altra interessante osservazione fu che nei mutanti per RNAi c'era una diminuzione di metilazione nella lisina 9 dell'istone H3 (H3K9) e un aumento di metilazione della lisina 4; ambedue queste modificazioni istoniche sono ben note correlare con una perdita dello stato eterocromatinico.

Istoni

Proteine basiche e altamente conservate che legano il DNA negli eucarioti; formano il nucleosoma, la subunità fondamentale della cromatina. Subiscono vari tipi di modificazione che correlano sia con l'attivazione che la repressione trascrizionale.

Centromero

Morfologicamente è la regione in cui il cromosoma presenta un restringimento; essa comprende il sito di attacco al fuso mitotico e meiotico.

URA 4

Gene del lievito *S. cerevisiae* codificante per un enzima fondamentale per la biosintesi dell'uracile. In cellule mutanti per questo gene è essenziale aggiungere uracile nel mezzo di coltura. Questo gene è stato molto usato nella genetica del lievito come marcatore di selezione.

Box 2 | *RNAi e virus*

Oltre a regolare l'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale, uno dei ruoli biologici dell'RNAi nelle piante è la difesa antivirale. Come conseguenza del fatto che l'RNAi previene l'accumulo virale, nel corso dell'evoluzione questo meccanismo di difesa ha selezionato a sua volta nei virus vegetali strategie difensive per evadere le difese immunitarie dell'ospite e protrarre l'infezione. La strategia principale consiste nella produzione di "soppressori" del silenziamento. Tali fattori sono proteine estremamente eterogenee tra loro e la mancanza di omologie strutturali e/o di sequenza deriva dalla convergenza funzionale di fattori evolutivamente scorrelati. Nel caso di p19, soppressore del virus del *tomato bushy stunt*, studi cristallografici indicano che forme omodimeriche della proteina si legano a siRNA a doppio filamento. Questa interazione inibisce l'attività di RNA elicasi necessarie per la produzione di siRNA a singolo filamento prerequisito indispensabile per la produzione di complessi RISC attivi.

L'infezione di cellule di *Drosophila* in cultura con l'elica + dell'RNA del nodavirus *flock house* (FHV), causa una risposta antivirale basata sull'RNAi, detta "RSAR" (silencing-based antiviral response), capace di provocare la rapida clearance del virus in assenza di soppressori virali. Lavori recenti mostrano come l'RSAR in *Drosophila* sia RISC-dipendente e associato con l'accumulo di siRNA di 22 nucleotidi. Queste evidenze indicano che, così come nelle piante superiori, anche negli invertebrati l'RNAi può funzionare nella protezione dalle infezioni virali. Anche in questo caso però il virus mette in atto una potente contromisura che attraverso la proteina B2 di FHV sopprime la risposta di RNAi della cellula.

Nelle cellule di mammifero, nonostante la maggior parte della risposta antivirale da dsRNA si espliciti nella risposta dell'interferone, esistono però molti casi in cui i virus attuano azioni contro l'apparato di RNAi della cellula o essi stessi utilizzano miRNA per la regolazione del loro ciclo vitale. In virtù dell'elevata conservazione del macchinario di RNAi, il sistema di silenziamento nodavirale sopra descritto, è oggi utilizzato per la ricerca di soppressori dell'RNAi in cellule di mammifero. Diversi esperimenti identificano come soppressori della RSAR una serie di antagonisti della risposta antivirale codificati da virus dei mammiferi suggerendo come tale attività sia evolutivamente conservata. Tra questi, sono note le attività di soppressione delle proteine NS1 ed E3L dei virus influenzale e vaccinico. Esse agiscono legando il dsRNA e inibendo la risposta di RNAi; il dominio legante il dsRNA di NS1 in particolare, è da solo necessario e sufficiente per la soppressione del RSAR. Interessante il caso del piccolo RNA VA1 di Adenovirus che, oltre ad inibire l'attivazione della Protein Kinasi R (PKR, vedi sopra) da parte di virus a dsRNA, svolge una potente azione di competitore sia contro l'esportina V che contro Dicer.

Infine, il virus Epstein-Barr (EBV) ed altri membri della famiglia degli *herpesvirus* utilizzano il silenziamento come metodo per la regolazione dei propri geni e di quelli dell'ospite. In particolare, EBV codifica per cinque diversi miRNA che vengono espressi dopo infezione di cellule B umane. Alcuni di questi miRNA riconoscono target cellulari quali: regolatori della proliferazione cellulare e dell'apoptosi, regolatori trascrizionali e dei pathway dei segnali di trasduzione. Altri riconoscono invece target virali, tra cui miR-BART2 che degrada l'mRNA codificante per la DNA polimerasi virale BALF5 in virtù della sua perfetta complementarità al suo 3'UTR.

Eterocromatina

Indica regioni del genoma che sono permanentemente in una condizione molto addensata; alcune di queste sequenze non vengono mai espresse (costitutiva), altre solo in alcune condizioni (facoltativa).

Metiltransferasi

Enzimi che mediano il trasferimento di gruppi metilici a specifici residui aminoacidici di proteine bersaglio.

Successivamente furono identificati due complessi importanti per il silenziamento eterocromatinico, RITS e RDRC.

RITS, - Esso contiene tre proteine, Chp1, Tas3 e Ago1 e piccoli RNA di 21-23 nt (rasiRNA) complementari alle ripetizioni centromeriche. Tale associazione è Dicer-dipendente in quanto i rasiRNA non si associano a RITS in cellule *dcr1*, mutanti per l'enzima Dicer. Analogamente a quanto dimostrato per le altre componenti del pathway dell'RNAi, tutte e tre le componenti di RITS sono richieste per l'assemblaggio dell'**eterocromatina** e per il silenziamento di **geni reporter** inseriti in domini eterocromatinici. Di particolare interesse è la proteina Chp1 che lega le ripetizioni centromeriche in corrispondenza dell'istone H3 metilato nella lisina 9 (K9).

RDRC (RNA-Dependent RNA Polymerase Complex) - Esso interagisce con

RITS ed è composto da tre fattori: Rdp1 (RNA polimerasi RNA-dipendente), Cid12 (un membro della famiglia delle poli-A polimerasi) e Hrrr1 (una RNA elicasi). RDRC interagisce fisicamente con RITS in maniera dipendente da Dicer (*Dcr1*) e dalla **metiltransferasi** istonica Clr4. La funzione di RDRC è quella di sintetizzare dsRNA a partire da ibridi RNA nascenti/rasiRNA per l'amplificazione del fenomeno di RNAi sul silenziamento delle regioni cromatiniche adiacenti. RDRC utilizza anche trascritti aberranti associati a transgeni ripetuti per sintetizzare dsRNA e iniziare la risposta RNAi classica.

Per il silenziamento cromatinico oltre a RITS e RDRC è richiesto un altro fattore, Clr4. Esso è una metiltransferasi istonica, che metila i residui di lisina in posizione 9 dell'istone H3 (H3K9), necessaria sia per l'associazione di RITS

con i trascritti centromerici nascenti che per l'associazione di RITS con RDRC.

Qui di seguito sono riassunte le varie tappe del processo di silenziamento eterocromatinico che sono anche schematizzate in figura 6.

1) Trascritti a doppio filamento provenienti da trascrizione simmetrica delle ripetizioni eterocromatiche vengono riconosciuti da Dicer che produce rasiRNA.

2) I trascritti nascenti delle regioni nucleatrici della eterocromatizzazione vengono riconosciuti dai rasiRNA contenuti in RITS

3) RITS e Clr4 vengono localizzati, attraverso l'interazione degli siRNA, in specifiche regioni del cromosoma.

3) I complessi RITS vengono stabilizzati dal riconoscimento di H3mK9 da parte della subunità Chp1 di RITS

4) RITS si associa con RDRC che produce RNA a doppio filamento.

5) L'ulteriore produzione di siRNA e la metilazione di H3K9 permettono la diffusione di RITS lungo le regioni adiacenti di cromosoma.

6) H3mK9 richiama Swi6 che espande lo stato eterocromatinico

7) RITS stabilisce un controllo trascrizionale e post-trascrizionale sulla regione che lega.

Al momento non esistono ancora dati definitivi per poter concludere se questo meccanismo esista anche in metazoi.

RNAi come strumento terapeutico

Fin dal primo esperimento in cui fu dimostrato il funzionamento dell'RNAi in cellule di mammifero, si pensò alle potenzialità di questa metodologia come strumento terapeutico nel trattamento di malattie genetiche ereditarie o acquisite: l'alta specificità di riconoscimento per il substrato e l'efficacia del silenziamento sono prerogative non comuni ad altre strategie di inibizione genica. Inoltre, l'RNAi si presenta particolarmente adatto in quei casi in cui è difficile immagi-

nare un trattamento con farmaci convenzionali come molecole semplici, proteine o anticorpi.

Una risposta di RNAi può essere indotta in cellule con la sola somministrazione di molecole sintetiche di RNA a doppio filamento. Questo approccio è stato utilizzato per l'inattivazione sistemica di mRNA per l'apolipoproteina B (apoB); siRNA, sintetici e chimicamente modificati, sono stati somministrati a topi mediante iniezione in vena. Come conseguenza di questo trattamento furono osservati livelli plasmatici più bassi di proteina ApoB e livelli globalmente ridotti di colesterolo.

La somministrazione di oligonucleotidi però, oltre a non garantire un'efficiente trasformazione cellulare, ha il grosso limite di dover essere continuamente ripetuta per ottenere un effetto a lungo termine.

La scoperta che anche i trascritti dei geni cellulari codificanti miRNA vanno incontro a maturazione con un meccanismo comune a quello dell'RNAi ha suggerito che l'RNAi potesse essere indotta in cellule di mammifero attraverso l'uso di geni sintetici esprimenti molecole simili a quelle fatte dalla cellula. Per questo motivo diversi laboratori hanno ideato vettori in grado di trascrivere degli RNA precursori che potessero essere efficacemente convertiti in siRNA. Tali vettori contengono in genere promotori riconosciuti dalle RNA polimerasi II o III che trascrivono dei corti RNA a forcina (short hairpin RNA – shRNA). Gli shRNA comprendono uno stem di 23 nucleotidi (contenente la sequenza richiesta per indurre il silenziamento genico) separato da un loop di perlomeno 10 nucleotidi. Molte delle sequenze usate nei loop di questi costrutti si ispirano a quelle descritte per i precursori dei miRNA. I trascritti primari prodotti da questo tipo di vettori vengono efficientemente convertiti in siRNA maturi (Figura 7). Queste cassette d'espressione possono essere introdotte in cellule in molte maniere diverse che vanno dalla semplice trasfezione di DNA all'uso di sistemi infettivi

Retrovirus

Virus a RNA a singolo filamento che si propagano tramite la conversione in DNA a doppio filamento e integrazione nel genoma dell'ospite. Nella forma più semplice contengono tre geni (gag, pol e env). Da questi virus sono stati derivati vettori in grado di trasdurre ad alta efficienza cellule in attiva replicazione. In questi vettori la grandezza del gene trasdotto è limitata. Integra nel genoma ospite garantendo espressione prolungata, ma a basso livello.

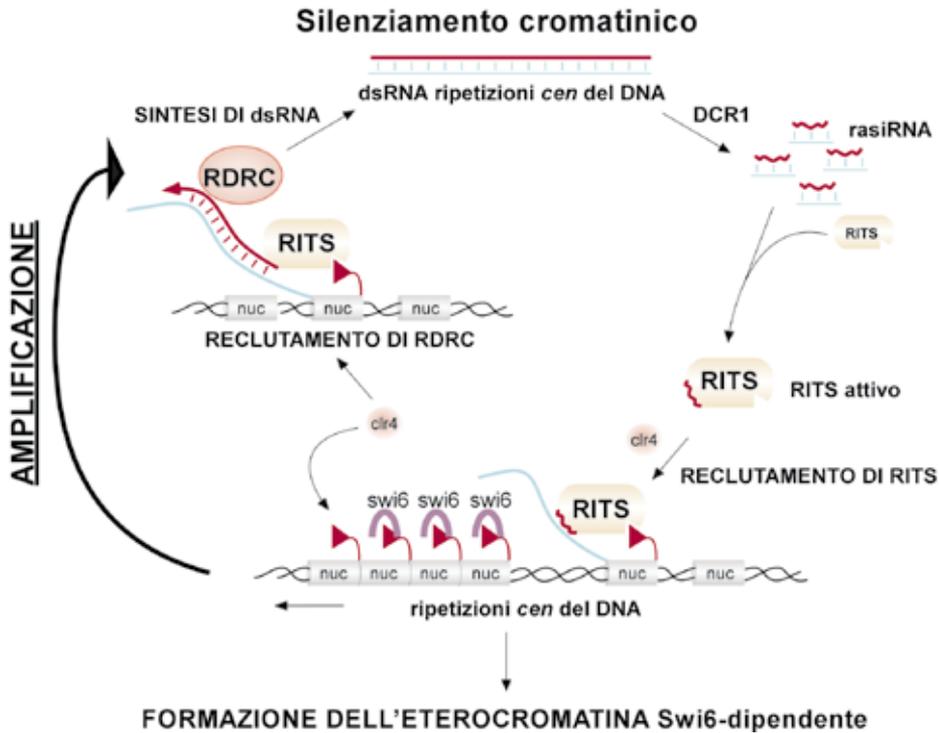


Figura 7. Modello per la produzione di eterocromatina mediata dall'RNAi nel lievito *S. pombe*.

I triangoli rossi rappresentano la lisina 9 metilata dell'istone H3.

Adenovirus

Famiglia di virus a DNA a doppio filamento. Il genoma codifica per circa 30 proteine. La trascrizione avviene in tre tappe: immediatamente precoce, precoce e tardiva. Questi virus sono stati modificati togliendo molti geni non essenziali alla replicazione virale e sostituendoli con geni d'interesse terapeutico. Sono vettori efficienti per cellule quiescenti; non si integrano nel genoma ospite.

HCV

Virus a RNA a singolo filamento che causa l'epatite di tipo C. Questo virus replica nel citoplasma e non ha un intermedio a DNA.

come i vettori retrovirali e lentivirali o quelli basati su Adenovirus (vedi capitolo Savino e Ciliberto). Grossa enfasi è stata data recentemente anche all'uso di promotori modificati che consentano un'espressione controllata degli shRNA, come per esempio promotori inducibili o tessuto-specifici.

Possibili bersagli per RNAi per diverse malattie variano dagli oncogeni, a fattori di crescita e anche a polimorfismi di singoli nucleotidi. Inoltre, l'RNAi si presenta assai adatta per la cura di malattie da virus ad RNA quali l'HIV o HCV. HIV è stato il primo agente infettivo verso cui è stata verificata l'efficacia dell'RNAi. Lo sviluppo e l'uso di combinazioni doppie e triple di farmaci per il trattamento delle infezioni da HIV ha portato ad un netto miglioramento nelle aspettative di vita dei malati di AIDS. Al di là dell'apparente successo stanno però emergendo proble-

mi connessi con l'insorgenza di varianti virali resistenti e con la tossicità di questi trattamenti combinati. Per questo motivo c'è ancora un forte interesse in nuovi approcci terapeutici antivirali. L'efficacia di siRNA sintetici o espressi come shRNA contro diversi mRNA di HIV, o di cofattori cellulari, è stata saggiata in sistemi cellulari in vitro e nella maggior parte dei casi si è ottenuta un'efficace repressione degli specifici target. Nonostante la grossa eccitazione dei primi esperimenti che mostravano la validità di principio di questo approccio, esistono ancora molti problemi da risolvere prima di poter poter pensare ad un effettivo impiego di questa strategia in vivo. Questi includono difficoltà circa: i) l'alto tasso mutazionale del virus; ii) la somministrazione delle molecole terapeutiche nell'esatto distretto cellulare; iii) la non ancora definita tossicità di questo trattamento in vivo. Ciononostante esistono a tutt'oggi molte

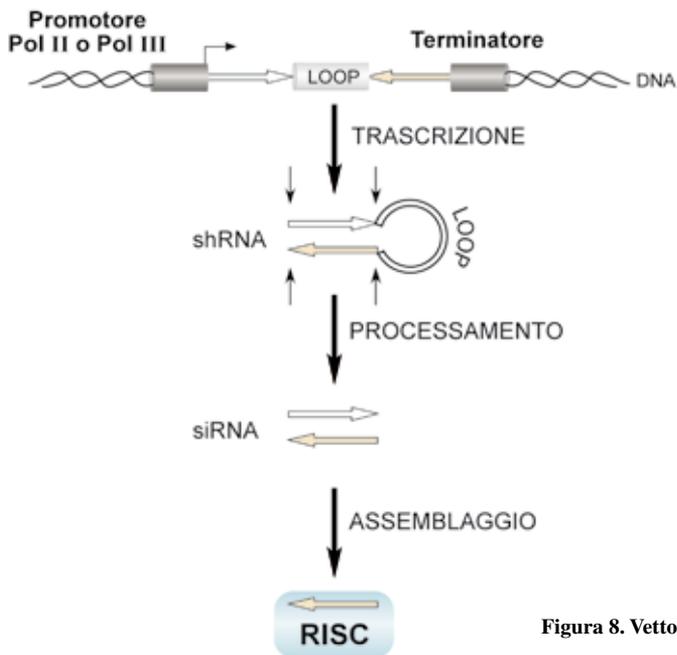


Figura 8. Vettori per l'espressione di siRNA *in vivo*.

richieste di test clinici per l'uso di siRNA sintetici o di vettori esponenti shRNA in numerose patologie.

Letture consigliate

Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*. 431: 356-3673.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K. and Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411: 494-498.

Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75: 843-854.

Fazi F., Rosa A., Fatica A., Gemetti V., De Marchis M.L., Nervi C. and Bozzoni I. (2005) A mini-circuitry comprising microRNA-223 and transcription factors NF1-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis. *Cell*, in press.

Filipowicz W. (2005) RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*. 122:17-20.

Motamedi MR, Verdel A, Colmenares SU, Gerber SA, Gygi SP and Moazed D. (2004) Two RNAi Complexes, RITS and RDRC, Physically Interact and Localize to Noncoding Centromeric RNAs. *Cell*, 119: 789-802.

Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grasser FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T. (2005) Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*. 2: 269-276.

Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI and Martienssen RA. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*. 297: 1833-1837.

Zamore PD, Haley B. (2005) Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*. 309:1519-24.

Zilberman D, Cao X and Jacobsen SE. (2003) ARGONAUTE4 control of locus specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*. 299: 716-719.