

Una scoperta rivoluzionaria arrivata più volte dal nulla

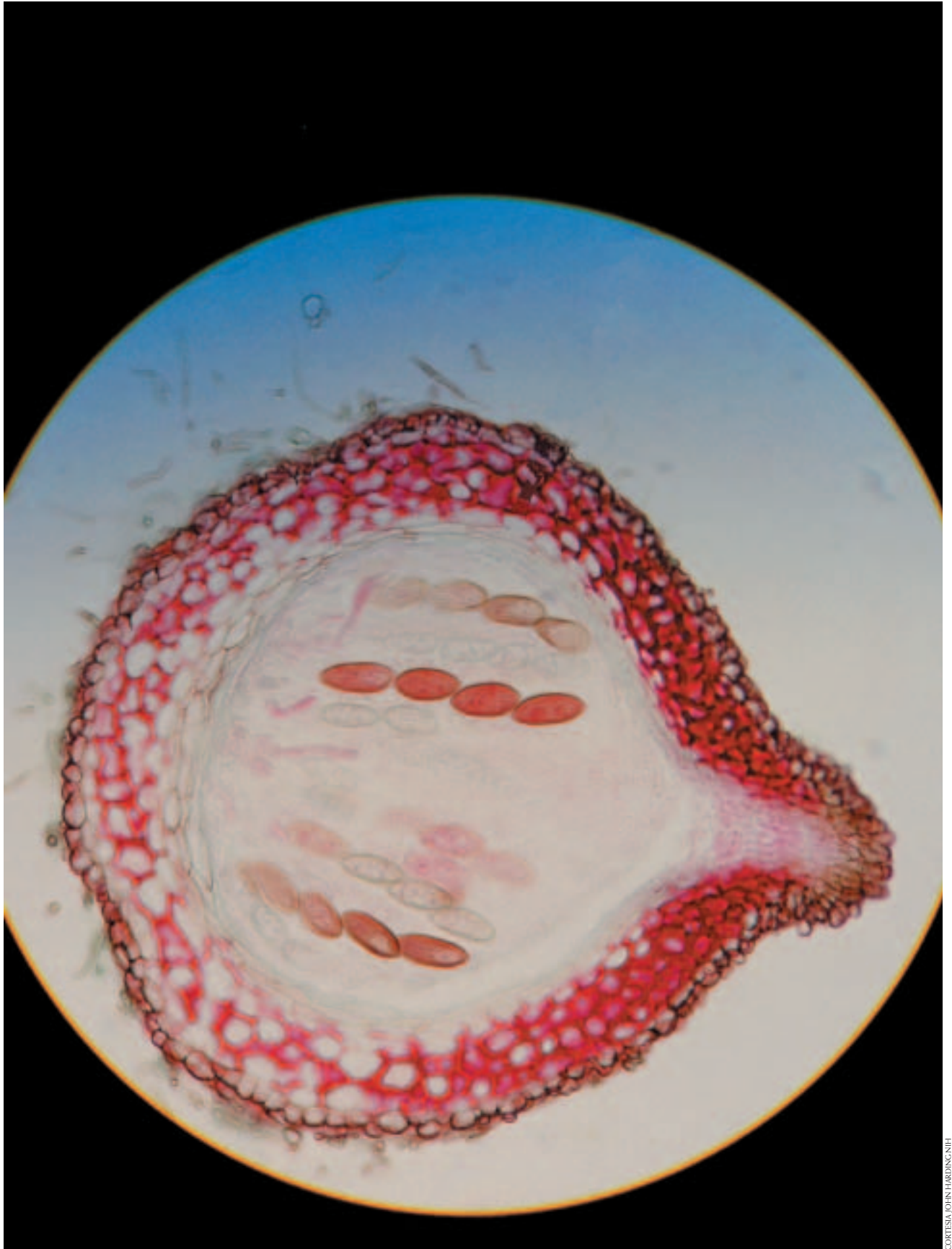
Strani risultati sperimentali ottenuti con petunie e muffe hanno svelato il fenomeno imprevisto del silenziamento e potrebbero aprire la strada a terapie innovative per l'uomo

GIUSEPPE MACINO

A LLE PERSONE CHE GLI CHIEDEVANO in che modo avesse scoperto la penicillina Fleming rispondeva che la penicillina "came from the blue", ovvero era venuta direttamente dal nulla. Infatti Fleming aveva osservato casualmente che una muffa contaminante una capsula di petri, in cui crescevano dei batteri, era circondata da un alone in cui i batteri non riuscivano a crescere. E fu così che la sua curiosità di capire cosa inibiva la crescita dei batteri lo portò alla scoperta della penicillina. Il silenziamento genico, che sta prepotentemente rivoluzionando le ricerche biomediche, è dovuto venire dal nulla diverse volte prima che la gran parte degli scienziati si rendesse conto della sua importanza. Questa è la storia di una scoperta che è stata fatta più volte in diversi laboratori, in diversi organismi e in periodi diversi.

Tutto è iniziato nel 1990 nel laboratorio di Richard Jorgensen, presso la DNA Plant Technology a Oakland in California, dove si stava sperimentando la possibilità di manipolare il colore delle petunie per scopi commerciali. I ricercatori pensavano che introducendo nel genoma della petunia copie extranumerarie del gene per la chalcone sintetasi avrebbero potuto esprimere quantità maggiori dell'enzima chiave per la sintesi del pigmento che colora i fiori, e quindi ottenere dei fiori con un colore più intenso. Posso immaginare la loro sorpresa, visto che l'ho vissuta direttamente qualche tempo dopo nel mio laboratorio, quando invece di piante con fiori più colorati ottennero delle piante con fiori bianchi o colorati irregolarmente. Ancora non lo sapevano, ma avevano realizzato il sogno di ogni genetista, ovvero di poter ottenere un fenotipo mutato o diverso di ogni gene in ogni organismo per studiarne la funzione.

Fortunatamente non si fermarono a questa osservazione, ma vollero capire la ragione dello strano comportamento delle piante geneticamente modificate. In breve tempo si resero conto che le copie extranumerarie del gene introdotto artificialmente non esprimevano affatto la funzione codificata. Ma la scoperta più importante avvenne quando misurarono l'espressione del gene omologo endogeno per la chalcone sintetasi della petunia. Neanche questo gene era più capace di esprimersi e questo spiegava perché non veniva più prodotto il pigmento nei fiori. Il gene da loro introdotto, infatti, aveva la proprietà di spegnere anche l'espressione del gene naturale endogeno. Chiamarono questo fenomeno co-soppressione, o soppressione coordinata di geni omologhi transgenici ed endogeni. Nello stesso periodo, nel nostro laboratorio del Di-



CORTESI, JOFFI, HIRBING, NH

Microfotografia di *Neurospora crassa*.

partimento di biotecnologie cellulari ed ematologia dell'Università di Roma La Sapienza, stavamo lavorando sulla sintesi del β carotene da parte di una muffa, la *Neurospora crassa*. Questa muffa sintetizza grandi quantità di β carotene quando è esposta alla luce ed è per questo che ha un bellissimo colore arancione rosso. Il nostro lavoro consisteva nel capire in quale modo avremmo potuto costringere la muffa a produrre quantità maggiori. La ragione di questo progetto nasceva dal fatto che il β carotene ha importanti applicazioni sia farmacologiche, come antitumorale, che industriali, come colorante dei cibi.

Colonie albine

Durante i nostri studi avevamo isolato il gene albino-3 di *Neurospora* che codifica per l'enzima geranilgeranil pirofosfato sintasi, necessario per la sintesi dei carotenoidi. Il nostro progetto prevedeva di introdurre copie extranumerarie di questo gene nella *Neurospora* stessa per incrementare la sintesi dell'enzima. Ricordo con emozione la mattina in cui Nicoletta Romano, la studentessa di dottorato che era incaricata del progetto, entrò nel mio studio e mi mostrò una capsula di petri in cui crescevano colonie di *Neurospora*. Nicoletta mi descrisse brevemente l'esperimento e mi comunicò la sua sorpresa nel vedere nella piastra molte colonie bianche, circa il 40%, invece che le attese colonie arancioni. Fui sorpreso quanto lei di quella osservazione ma, fortunatamente, non le chiesi di gettare via tutto con la motivazione che nell'esperimento era stato commesso chissà quale errore. Le feci invece un lungo elenco delle possibili cause di quello che stavamo osservando. Naturalmente tra queste non c'era il silenziamento genico, allora ignoto, ma solamente l'ipotesi remota che avesse scoperto qualcosa di nuovo e misterioso. Per la seconda volta, quasi in contemporanea agli esperimenti sulla petunia, il silenziamento genico era arrivato dal nulla, inatteso, questa volta in un organismo diverso da una pianta.

Ci vollero un anno di lavoro e molti esperimenti per escludere le cause ovvie che potevano spiegare quel primo risultato, che nel frattempo era stato da noi riprodotto molte volte anche con un altro gene, albino-1, che codifica per un diverso enzima della stessa via biosintetica del β carotene.

Nicoletta scoprì che le copie transgeniche sia di albino-3 che di albino-1 non si esprimevano e contemporaneamente la loro presenza impediva anche ai geni endogeni albini di produrre l'RNA messaggero corrispondente. Scoprì che il silenziamento genico era un meccanismo assolutamente specifico, in quanto soltanto i geni del tutto identici a quelli transgenici venivano silenziati. Notò anche che dopo molte generazioni la sintesi dei carotenoidi riprendeva e riuscì a dimostrare che questo era dovuto

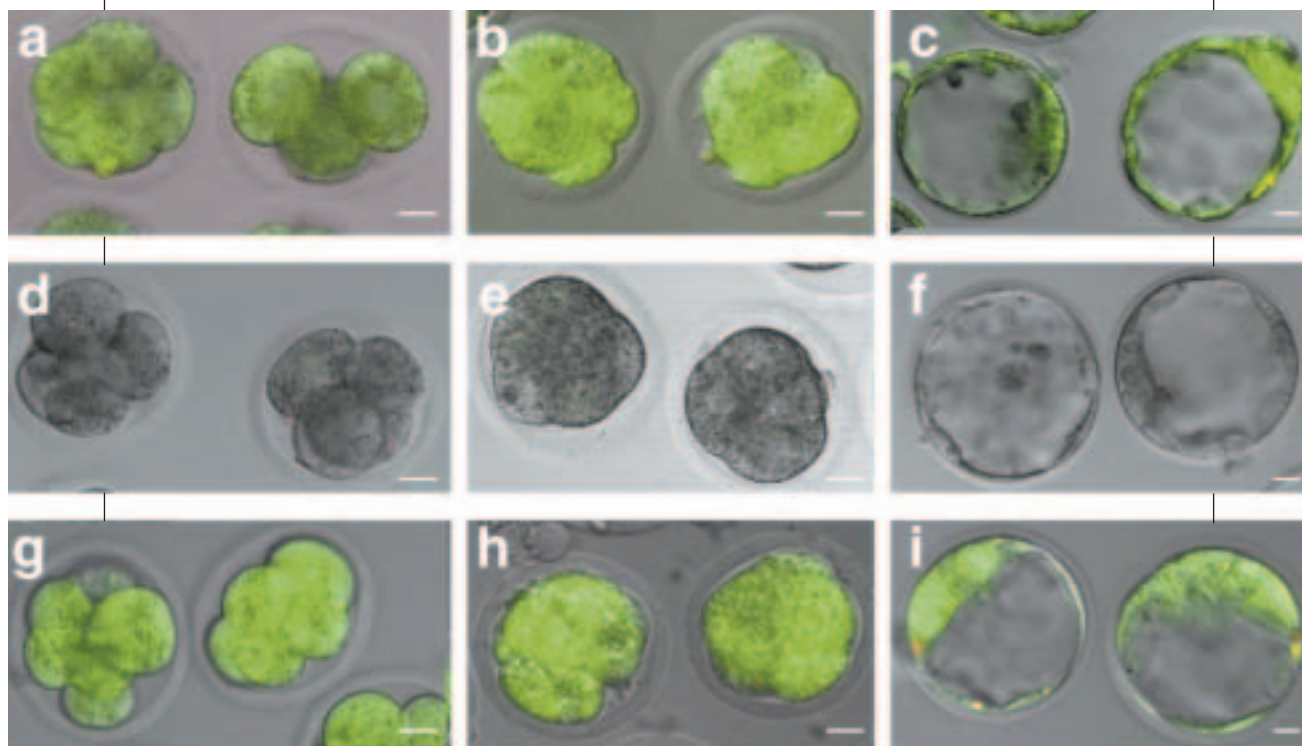
all'espulsione delle copie del transgene dal genoma della muffa. Il fenomeno da noi osservato era diverso da tutto quello che era noto fino a quel momento e quindi decidemmo di dargli un nome, per poterlo descrivere più efficacemente. Il nome venne suggerito da Claudio Scazzocchio, un genetista italiano che lavora a Orsey in Francia, durante una lunga conversazione telefonica in cui gli descrivevo i nostri risultati.

Lo chiamammo *quelling*, dal verbo inglese *to quell*, che significa reprimere, per distinguerlo dalla repressione genica e dalla soppressione genica che sono due meccanismi di regolazione genica diversi da quello che noi avevamo scoperto. Durante la stesura del lavoro ci accorgemmo che il gruppo di Jorgensen aveva già pubblicato qualcosa di analogo che si manifestava nelle petunie. Raccontai diverse volte in congressi internazionali i nostri risultati, che furono considerati poco più di una stranezza tipica di questa muffa. Non venne nemmeno accettata l'idea che potesse essere un fenomeno generalizzato per le tutte le muffe, e magari per qualche pianta particolare. Sembrava che non avvenisse negli animali e per questo era ritenuto poco importante.

Nel frattempo David Baulcombe, al John Innes Centre a Norwich, cercava di integrare geni vegetali nelle piante di tabacco utilizzando come vettore un virus del tabacco con il genoma a RNA. Invariabilmente otteneva risultati opposti all'atteso, perché le piante infettate invece di esprimere il transgene spegnevano anche il gene endogeno. Chiamò il fenomeno VIGS, da silenziamento genico indotto da virus.

Di nuovo il silenziamento era arrivato dal nulla, inatteso e incomprensibile. Intanto a Roma proseguivamo i nostri studi sul meccanismo e il progetto passò nelle mani di Carlo Cogoni, un giovane appena laureato nel nostro laboratorio. Carlo dimostrò subito una grande abilità nell'analisi dei dati. Ribaltò il nostro modo di vedere i risultati chiedendosi come mai così tante colonie contenenti il transgene mostravano il fenotipo albino malgrado fossero cellule eterocarionti, cioè con nuclei diversi in un comune citoplasma. La *Neurospora* infatti è un organismo filamentoso in cui i nuclei sono immersi nello stesso citoplasma senza barriere membranose.

Questa domanda portò alla scoperta che il *quelling* è un fenomeno dominante anche sui nuclei che non contengono il transgene ma sono presenti nello stesso citoplasma. Questa implicava che una molecola altamente specifica veniva prodotta dai nuclei trasformati e che agiva anche nei nuclei non trasformati. Una parte importante del meccanismo era stata scoperta, ora bisognava trovare quale molecola potesse avere un ruolo tanto particolare. Gli studi di Carlo misero in evidenza che nelle colonie che mostravano il fenotipo albino si accumulava una molecola di RNA



Prima dimostrazione che l'interferenza da RNA funziona nei mammiferi. L'esperimento è stato condotto su embrioni di topi transgenici per un gene che codifica una proteina fluorescente verde (MmGFP). Nella riga in alto si vedono gli embrioni che esprimono la proteina verde agli stadi di 4-6 cellule (a), di morula (b) e di blastocisti (c). Nella riga centrale, embrioni analoghi in cui è stato iniettato un RNA a doppia elica di sequenza corrispondente al gene MmGFP; il gene è silenziato e la proteina non viene prodotta. Nella riga in basso, per dimostrare la specificità del silenziamento, gli embrioni sono stati trattati con un RNA a doppia elica di sequenza diversa, che non altera l'espressione della proteina (liberamente modificata da Nature Cell Biol. 2000; vol. 2:70).

che derivava dal transgene. Aveva trovato il responsabile della trasmissione a distanza del segnale di silenziamento. A quel punto intuì che per capire un fenomeno così strano doveva dissezionare il meccanismo con strumenti genetici e questa fu la sua idea vincente. In breve approntò un esperimento di mutagenesi per isolare mutanti di *Neurospora* incapaci di silenziare i transgeni, e per far ciò costruì un ceppo che era silenziato stabilmente e che mostrava un fenotipo albino. Pensò che se la mutagenesi avesse distrutto il meccanismo di silenziamento, le colonie bianche sarebbero diventate di nuovo arancioni. Fu proprio così. Ottenne molti mutanti che erano tornati arancioni e riuscì a raggrupparli in tre gruppi di complementazione dimostrando che aveva isolato mutanti in tre geni diversi tra loro.

Pubblicammo questi risultati nel 1997 su *Pnas* e questo lavoro fu salutato da un grande interesse della comunità scientifica. Abbiamo dovuto però aspettare il 1998, quando un fenomeno simile venne scoperto negli animali, per focalizzare l'attenzione generale su una scoperta che avrebbe potuto avere applicazioni straordinarie.

Andrew Fire, presso la Carnegie Institution of Washington a Baltimora, stava utilizzando la tecnologia dell'RNA antisense – una sequenza complementare all'RNA messaggero del gene in studio – per alterare l'espressione di un gene coinvolto nello sviluppo nel verme *Caenorhabditis elegans*. Come controllo nei suoi esperimenti usava un RNA di senso, una sequenza complementare all'RNA antisense e quindi uguale a quella dell'RNA messaggero. Si accorse che, contrariamente alle attese, entrambi gli RNA inducevano alterazioni dell'espressione del gene studiato.

A quel punto ebbe l'idea di mescolare i due RNA, creando così un RNA a doppia elica, per vedere se otteneva lo stesso risultato. Con sua grande sorpresa l'effetto indotto dall'RNA a doppia elica era decine di volte più forte. Aveva scoperto l'interferenza da RNA a doppia elica o RNAi. Il lavoro fu pubblicato su *Nature* perché l'esperimento era condotto su un animale e quindi era considerato più importante. In breve questa scoperta venne accettata da tutti e rese il silenziamento genico molto popolare tra i ricercatori.

Ma un verme è ben diverso da un mammifero e quindi anche dall'uomo. La scoperta poteva essere

TERAPIE

Il silenzio del topo

È ancora troppo presto per sapere se l'interferenza da RNA si rivelerà davvero quella potente arma terapeutica che promette di essere o se seguirà il destino inglorioso delle altre terapie innovative basate sull'RNA cui si accenna in queste pagine. Se però si considera quanto sia recente l'interesse per il fenomeno, i progressi già fatti sembrano promettenti. A novembre, per esempio, è stato reso noto su *Nature* un risultato che pochi si aspettavano così presto: la Alnylam – una società tedesco-americana messa in piedi da alcuni pionieri del settore per sviluppare applicazioni terapeutiche – ha realizzato una formulazione di piccoli RNA (siRNA) che produce effetti terapeutici nei topi quando è somministrata con una semplice iniezione endovenosa.

Uno dei grandi assilli di chi cerca terapie basate sul silenziamento genico è la difficoltà di far penetrare nelle cellule i piccoli RNA, integri e in grandi quantità, somministrandoli per via sistemica, così da arrivare anche a quei tessuti che non sono raggiungibili con trattamenti locali. L'organismo infatti è ricco di enzimi che degradano gli RNA, e sebbene questi possano essere resi più resistenti modificandone la struttura chimica, se vengono modificati troppo perdono la capacità di silenziare i geni. I ricercatori della Alnylam, guidati da Jürgen Soutschek, hanno introdotto negli RNA piccole modifiche mirate, per irrobustirne la catena portante di zuccheri e fosfati rendendola più resistente agli enzimi, e hanno legato questi RNA a molecole di colesterolo, che ne facilita la captazione da parte delle cellule.

Per provare l'efficacia della tecnica, hanno preparato in questo modo piccoli RNA diretti contro il gene della apolipoproteina B – coinvolta, per ironia, proprio nella sintesi del colesterolo – e li hanno iniettati in vena nei topi. Gli RNA sono stati captati in numerosi tessuti e, quel che più conta, hanno funzionato: negli organi più importanti per la sintesi del colesterolo, il fegato e il digiuno, la quantità di RNA messaggero dell'apolipoproteina è calata fra il 50 e il 70% e di conseguenza i livelli di colesterolo nel sangue si sono abbassati, toccando valori simili a quelli dei topi in cui il gene dell'apolipoproteina viene eliminato. La conferma finale è venuta dall'esame degli RNA bersaglio, che erano tagliati proprio nel punto in cui agisce l'enzima (Risc) responsabile del silenziamento genico.

Un'altra prova del fuoco era quella della specificità. Anche se in teoria il silenziamento dovrebbe mettere fuori gioco solo il gene con sequenza identica ai piccoli RNA usati, in realtà fin dal 2003 sono stati segnalati anche effetti aspecifici verso geni di sequenza simile, e nel 2004 si è scoperto che può essere disturbata anche l'espressione di geni del tutto diversi, forse perché le alte dosi di RNA estranei intralciano il macchinario responsabile del normale silenziamento genico della cellula. Nei topi della Alnylam questo non è avvenuto, anche se alcuni esperti eccepiscono che i controlli sono stati condotti solo su pochi geni e per breve tempo. Nessuno nega che gli ostacoli siano ancora tanti. Un metodo di somministrazione simile, per esempio, non è pensabile per curare una malattia cronica nell'uomo, viste le alte quantità richieste e i relativi costi, e vanno chiariti l'efficacia e i rischi sul lungo periodo. La strada, comunque, è aperta.

considerata importante anche per la nostra specie? Alla fine dell'anno 2000, venne pubblicato su *Cell* un lavoro in cui per la prima volta veniva silenziato un gene in un embrione di topo alle primissime fasi dello sviluppo. Si dimostrava insomma che i mammiferi, e quindi anche l'uomo, posseggono il meccanismo di silenziamento genico indotto da RNA a doppia elica. Questo esperimento rappresenta una tappa storica e verrà ricordato come l'esperimento che ha aperto la strada ad applicazioni terapeutiche sull'uomo con la tecnologia dell'interferenza da RNA a doppia elica.

Cosa hanno in comune questi meccanismi di silenziamento genico apparentemente così diversi? La risposta è venuta in buona parte dal lavoro di Carlo Cogoni che riuscì a isolare i geni *qde* – quelling deficient – dalla *Neurospora* prima di tutti gli altri e a determinarne la possibile funzione. Partendo dai mutanti nei quali il quelling era bloccato Carlo isolò i geni alterati per mutazione e quelli corrispondenti nel ceppo selvatico. La sequenza nucleotidica del DNA rivelò che questi codificavano per funzioni già note in altri sistemi. Nel 1999 pubblicammo il primo lavoro sulla rivista *Science* in cui veniva descritto il gene *qde-3* che codifica per una DNA elicasi. Pochi mesi dopo un altro lavoro, questa volta su *Nature*, indicava la funzione del gene *qde-1* che risultava essere una RNA polimerasi RNA dipendente. L'anno successivo fu il turno del gene *qde-2* che venne pubblicato di nuovo su *Nature* e che aveva omologie con una proteina associata ai ribosomi di mammifero. Con la funzione di questi geni fu possibile proporre un modello di funzionamento che è ancora valido e accettato da tutti.

Dimensioni caratteristiche

A quasi un anno di distanza furono isolati geni con la stessa funzione nel verme *C.elegans* e nelle piante, confermando che i meccanismi di silenziamento genico erano molto simili, se non identici, anche se avevano nomi diversi nei vari sistemi. Un altro pezzo importante doveva ancora essere aggiunto al puzzle del meccanismo di silenziamento genico. Andrew Hamilton, al John Innes Center, scoprì che gli RNA transgenici che si accumulavano negli organismi silenziati avevano dimensioni ridottissime, circa 23-25 nucleotidi, e che erano presenti sia nella sequenza di senso che in quella di antisenso.

Questo dato confermava i risultati di Cogoni sull'accumulo di RNA transgenico, ma metteva in evidenza la caratteristica ridottissima dimensione di queste molecole che è diventata il tratto più importante per comprendere la funzione del silenziamento genico nelle cellule eucariotiche. Subito dopo Greg Hannon, nel laboratorio del Cold Spring Harbor, scoprì un enzima che era capace di tagliare RNA a doppia elica in frammenti da 21-23 coppie di

basi e lo chiamò Dicer. Ora il meccanismo era più chiaro. Gli RNA trascritti dal transgene venivano trasformati in RNA a doppia elica dalla RNA polimerasi RNA dipendente e successivamente tagliati in frammenti più piccoli dall'enzima Dicer. Questi frammenti divenivano parte di un complesso proteico che li utilizzava per rintracciare RNA cellulari con la stessa sequenza e degradarli specificamente. Questi risultati spiegavano anche l'interferenza da RNA a doppia elica in cui l'RNA a doppia elica viene fornito dall'esterno. Caterina Catalanotto, dottoranda nel nostro laboratorio, scoprì che i piccoli RNA erano associati alla proteina qde-2 e che venivano utilizzati per rintracciare e degradare specifici RNA solamente in presenza della proteina qde-2 a cui erano probabilmente legati.

A questo punto il meccanismo di silenziamento era stato compreso nei suoi tratti essenziali. La storia però non si conclude qui, anzi forse comincia a questo punto, perché queste scoperte venute dal nulla stanno avendo risvolti imprevedibili per la salute dell'uomo per almeno due ragioni. La prima è che sono stati isolati piccoli RNA naturali delle stesse dimensioni di quelli derivati dai transgeni, codificati da geni appositi in tutte le cellule animali – nell'uomo ce ne sono circa 300 – e che hanno una funzione di regolazione della sintesi di alcune proteine.

Queste proteine svolgono un ruolo fondamentale durante lo sviluppo dell'embrione, nella proliferazione cellulare, e quindi nel cancro, nel differenziamento, nel mantenimento dell'identità cellulare nelle cellule staminali, nello sviluppo del cervello e, si comincia ora a scoprire, in alcune patologie umane gravi, come il diabete e la leucemia linfoide cronica. Poter identificare quali proteine sono regolate dai 300 micro RNA – potrebbero essere anche più numerosi – permetterebbe di capire molte delle funzioni di queste proteine.

Questo processo di identificazione delle proteine regolate non è facile, poiché le modalità con cui i micro RNA riconoscono gli RNA messaggeri da regolare durante la traduzione non sono chiare e comunque sono abbastanza diverse tra un messaggero e l'altro. Sono stati sviluppati algoritmi che cercano di fare predizioni sui possibili bersagli dei micro RNA e che vengono continuamente perfezionati in risposta a nuovi dati sperimentali. Attualmente sono in grado di predire con una buona approssimazione quali RNA messaggeri possono essere riconosciuti e regolati. L'esempio più evidente è quello pubblicato in novembre sulla rivista *Nature*, dove la predizione dei possibili bersagli di uno specifico micro RNA nelle cellule del pancreas ha permesso di identificare quali sono le proteine coinvolte nella secrezione dell'insulina e in particolare la causa molecolare della patologia diabetica.

La seconda ragione per studiare il silenziamen-

to genico è che tutti, o quasi tutti, gli eucarioti posseggono questo meccanismo capace di riconoscere e distruggere acidi nucleici non cellulari come i virus e i transgeni. Quindi è un meccanismo di difesa, sorto ancor prima del sistema immunitario, che le cellule usano per una naturale difesa contro gli invasori. Gli invasori possono essere di vari tipi: ne sono esempio gli elementi mobili o trasposoni, che possono essere a loro volta a DNA o RNA, i virus a DNA o a RNA, le sequenze ripetute che possono invadere i genomi. Tutte queste sequenze non geniche possono rappresentare il 95% del genoma stesso, come accade nell'uomo. Negli ultimi due anni sono cominciati esperimenti per verificare se il silenziamento genico possa essere utilizzato per combattere micidiali infezioni virali come l'Aids e le epatiti.

I risultati sono molto promettenti poiché l'introduzione di piccoli RNA a doppia elica con la stessa sequenza del virus in cellule in coltura infettate porta alla scomparsa del virus stesso. Questo è risultato vero per tutti i virus testati come Hiv, epatite B e C, polio, influenza e così via. Sono attualmente in corso esperimenti su modelli animali per la cura di infezioni virali gravi e i primi risultati sembrano positivi. Naturalmente una delle prime idee di possibili applicazioni è stata quella di utilizzare il silenziamento per non far esprimere i geni coinvolti nelle patologie oncologiche. Moltissimi studi sono in corso e i risultati sono molto promettenti.

Alta specificità del meccanismo permette di degradare soltanto gli RNA messaggeri che inducono il cancro e di uccidere specificamente le cellule malate. La vera difficoltà nell'applicazione sull'uomo risiede nel fatto che in un animale è difficile far sì che le molecole interferenti, come gli RNA a doppia elica, possano raggiungere il tessuto malato, generalmente nascosto nei tessuti sani. Molte energie sono ora dedicate a risolvere questo problema che è stato identificato come il limite principale per le applicazioni alle patologie umane.

In conclusione questa storia può essere considerata paradigmatica della funzione essenziale della ricerca pura. Le istituzioni nazionali ed europee che finanziano la ricerca scientifica dovrebbero capire che, decidendo di sostenere solamente ricerche applicative sulla salute dell'uomo, perdono di vista il fatto che la ricerca libera e non vincolata a una produttività applicativa immediata può aprire possibilità inimmaginabili e insperate. Come la penicillina di Fleming e il silenziamento genico nelle piante e nelle muffe ci hanno insegnato, bisogna lasciar aperta la finestra per poter cogliere delle opportunità che ci vengono così raramente dal nulla.

Giuseppe Macino, Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università di Roma La Sapienza