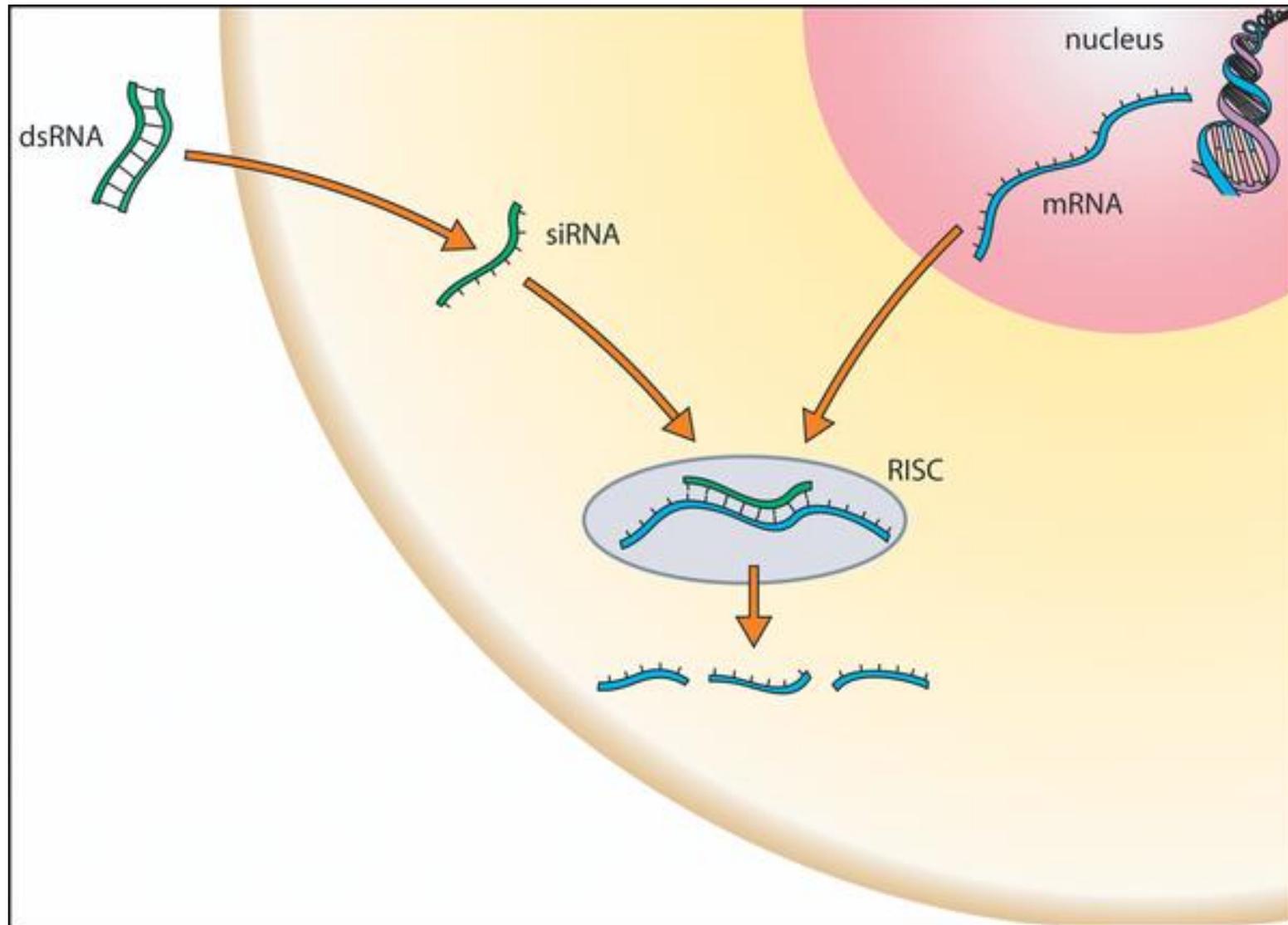


Silenziamento Genico

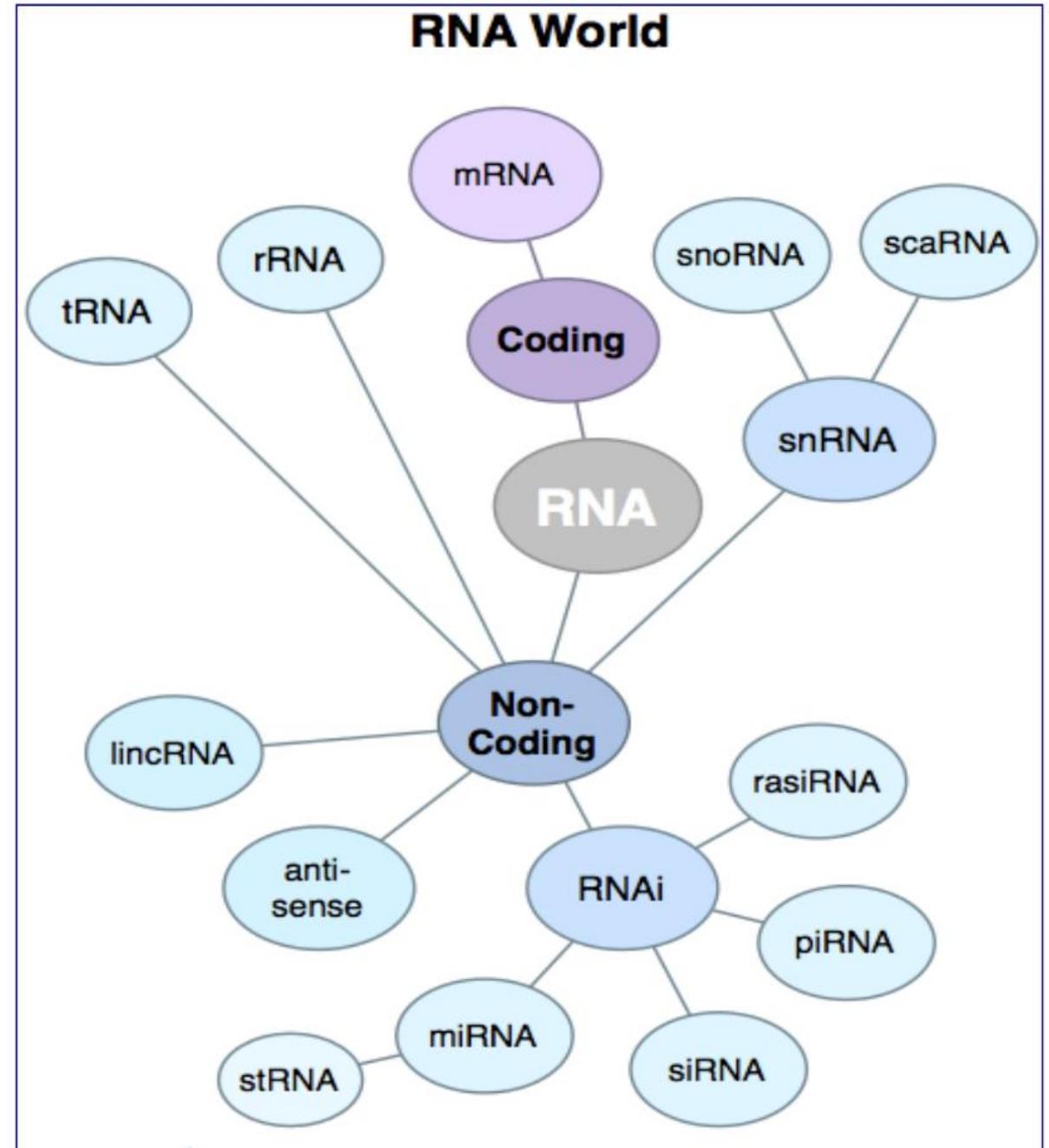


I tanti tipi di RNA

La ricerca scientifica ha permesso di scoprire numerose forme di RNA con funzioni differenti.

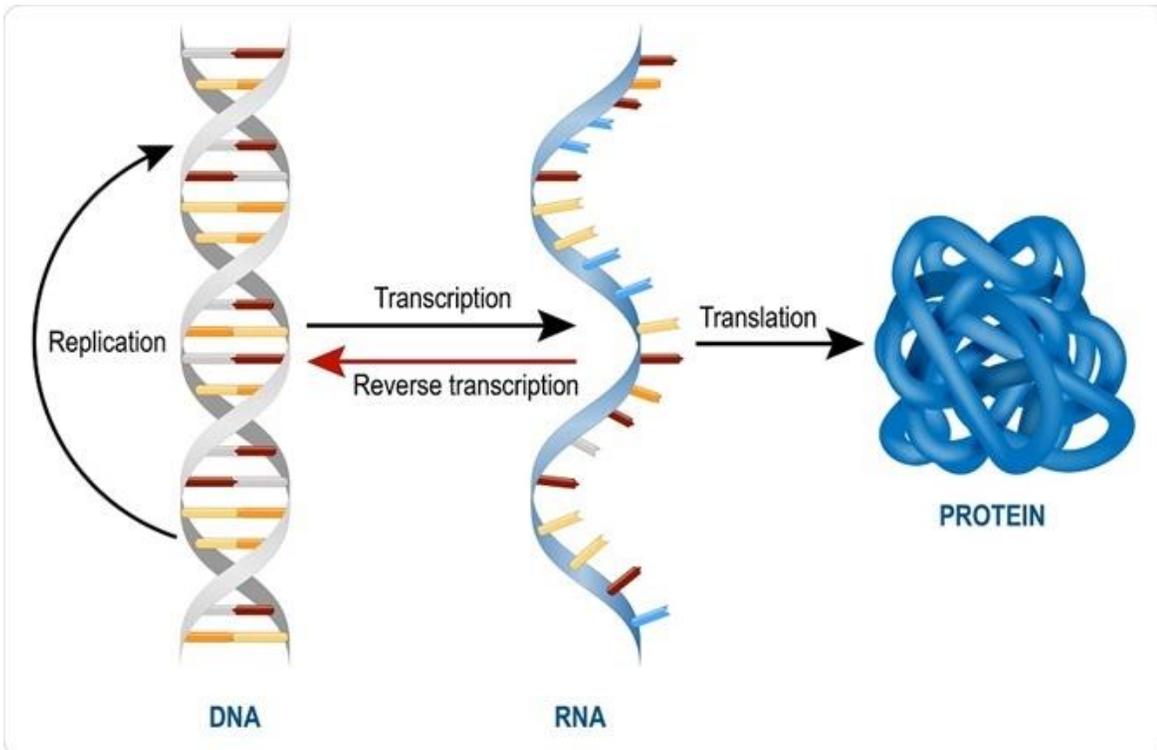
RNA diventa quindi una molecola polifunzionale che non interviene solo nella sintesi proteica.

Conoscere la struttura e la funzione dei differenti 'RNA', permette di sfruttarli nelle biotecnologie a diverso livello (es. silenziamento genico) oltre che migliorare la comprensione dei meccanismi di regolazione genica a livello delle cellule.



RNA: una molecola con più funzioni

I diversi tipi di RNA hanno svariate funzioni; la più nota è legata al processo della sintesi proteica. Spesso le biotecnologie hanno sfruttato promotori forti per over-esprimere alcuni geni e produrre tanti messaggeri allo scopo di ottenere più proteine. Questa tecnologia è stata alla base dei primi OGM volti a migliorare il contenuto di alcune proteine/enzimi nelle piante...e dei loro prodotti.



I ricercatori Andrew Fire e Craig Mello (Nobel 2006) scoprirono che NON sempre una over-espressione di RNA aumenta la sintesi di proteina! Può infatti accadere che si formino dei Double Strand RNA che portano all'effetto opposto ovvero al silenziamento genico.

Questo meccanismo viene sfruttato dalle biotecnologie vegetali per vari processi che necessitano il silenziamento di un gene e il meccanismo si chiama **RNA interference**.

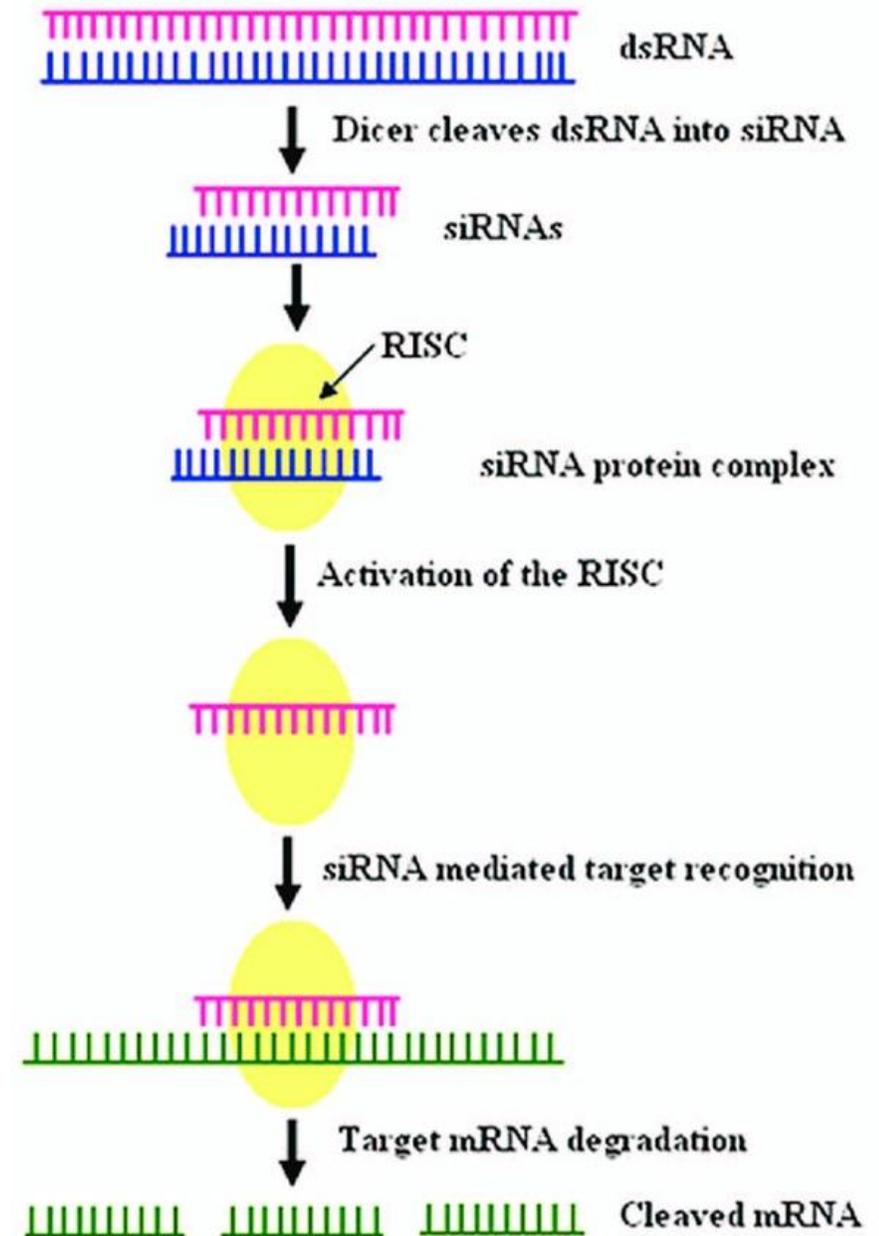
RNA Interference

Cos'è RNA interference ?

E' un meccanismo naturale di regolazione dell'espressione genica che avviene in tutti i tipi di cellule e che è mediato da molecole di RNA a doppio filamento capaci di 'interferire' e bloccare l'espressione genica. Più specificamente l'interferenza si può manifestare verso alcuni geni target bloccandone espressione e/o traduzione oppure verso specifiche aree del genoma 'inattivando la cromatina'.

Questi meccanismi hanno in comune tre fasi:

- 1) La formazione di un dsRNA;
- 2) Il processamento o frammentazione dei dsRNA in piccoli elementi di 20-25 bp (small RNA) che sono quelli attivi e funzionali nel silenziamento;
- 3) L'azione di un solo filamento di small RNA che legandosi ad un frammento di DNA (parzialmente o totalmente complementare) o di mRNA ne attiva la degradazione richiamando proteine ed enzimi dedicati a questo processo.

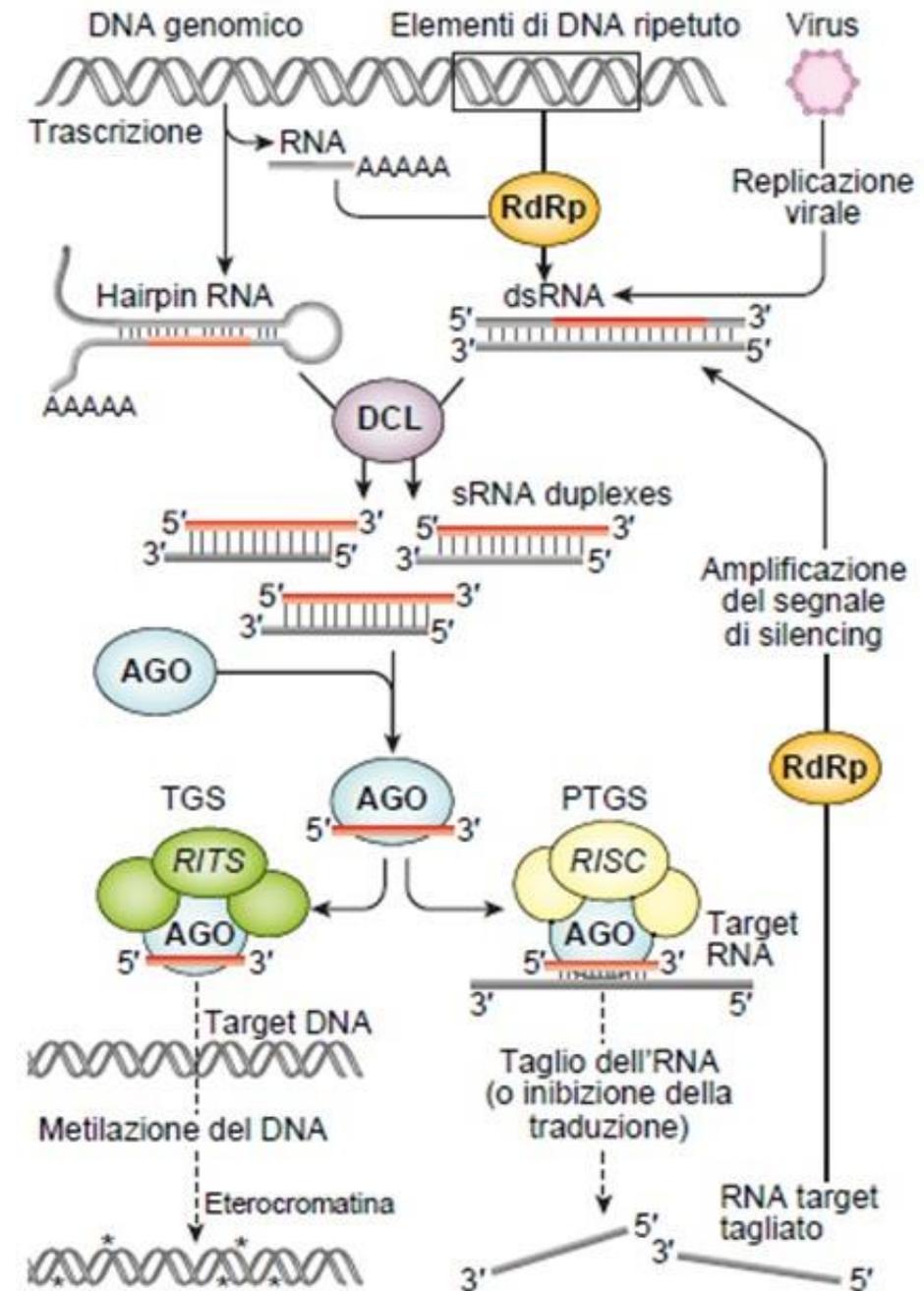


Classificazione

Sulla base del processo di sintesi dei dsRNA è possibile distinguere e classificare i piccoli RNA in 2 gruppi:

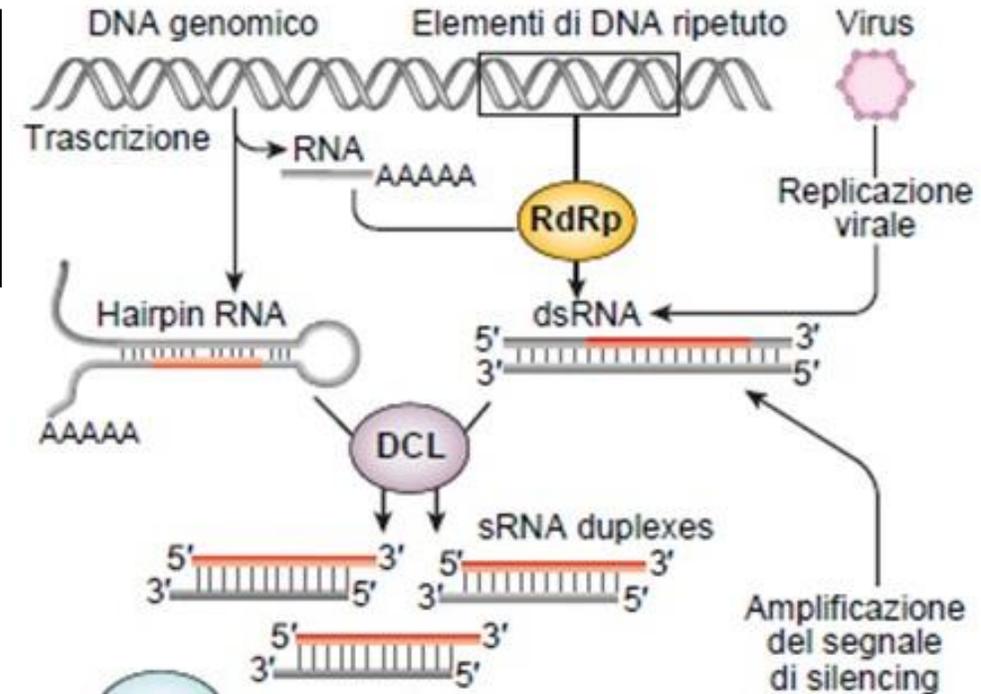
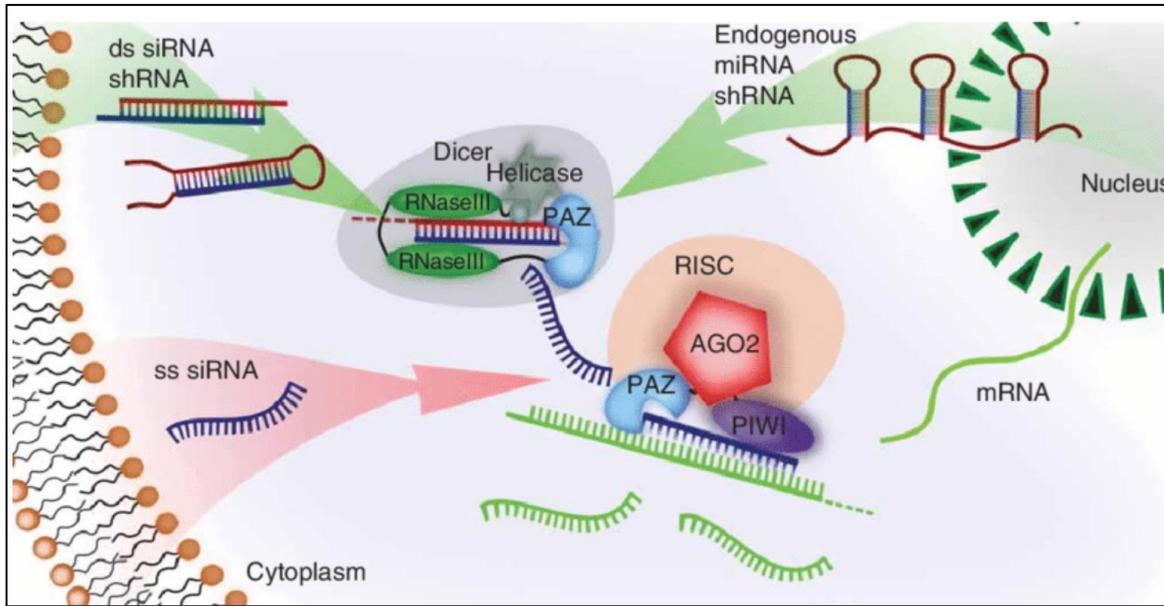
- 1) Gli **small interfering RNA (siRNA)** che vengono prodotti da precursori a doppia elica (es. ibridazione di due molecole complementari di RNA). Questo significa che vi devono essere due molecole di RNA diverse che sono complementari.
- 2) Gli **hairpin RNA** che derivano da una sola molecola di RNA a singolo filamento, che presentano delle regioni intermolecolari complementari che consentono di formare una forcina a doppio filamento.

In entrambe i casi queste due tipologie di molecole vengono processate secondo un'unica via che ha come centro l'enzima Dicer-like (DCL).



Cosa fa DICER ?

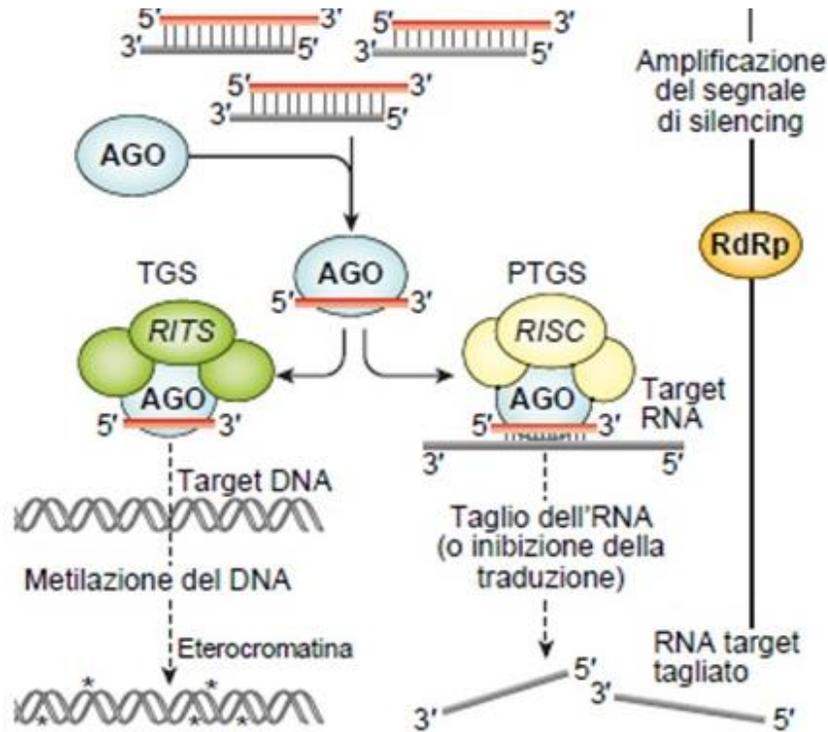
L'enzima DCL o Dicer- like è una endoribonucleasi capace di tagliare i dsRNA in piccoli RNA a doppia elica fosforilati al 5' e con 2 nucleotidi sporgenti all'estremità in 3'. Nei diversi organismi sono state identificate varie isoforme di DCL con funzioni un po' differenti.



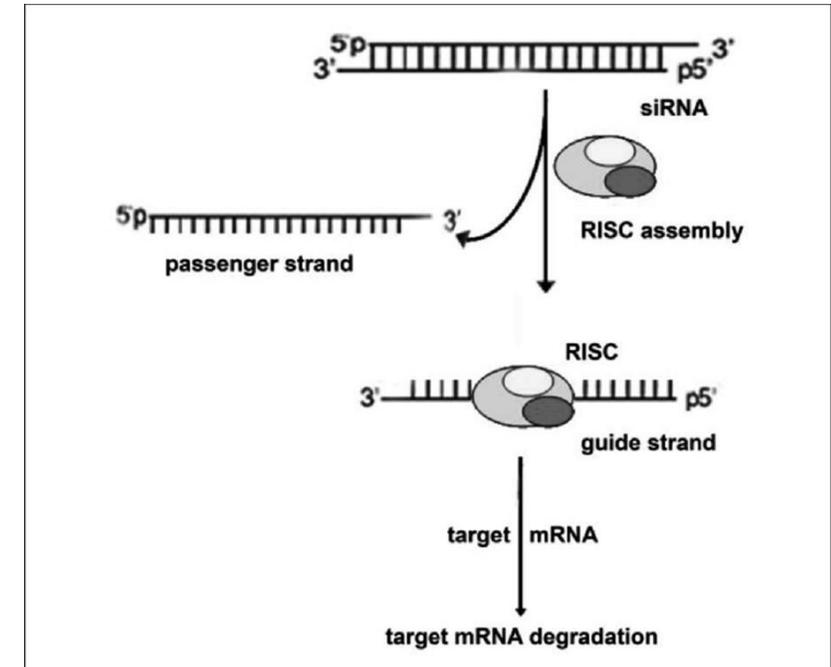
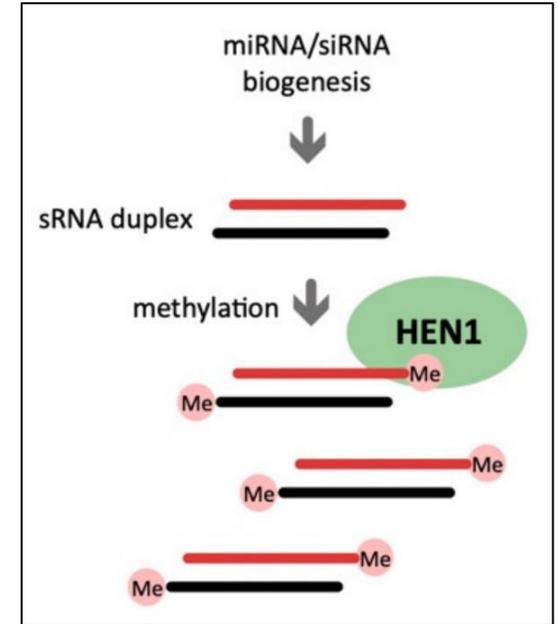
I Dicer degli Eucarioti hanno numerosi domini strutturali attivi come quelli Rnase III presenti al terminale carbossilico, il dominio PAZ responsabile del riconoscimento molecolare e il dominio RNA elicasi che si trova al terminale amminico della proteina. I due domini RNase III della molecola dimerizzano e formano il sito attivo dell'enzima; una volta che PAZ ha riconosciuto la sequenza si procede al taglio. Dicer produce frammenti a doppio filamento di lunghezza variabile fra i 19 e i 26 nucleotidi.

Stabilizzazione e processamento

Per evitare che queste forme di dsRNA vengano degradati dagli 'spazzini' cellulari, intervengono delle metiltransferasi chiamate HEN 1 che aggiungono un gruppo metile al nucleotide terminale in 3' di entrambe i filamenti. Questo li rende stabili!



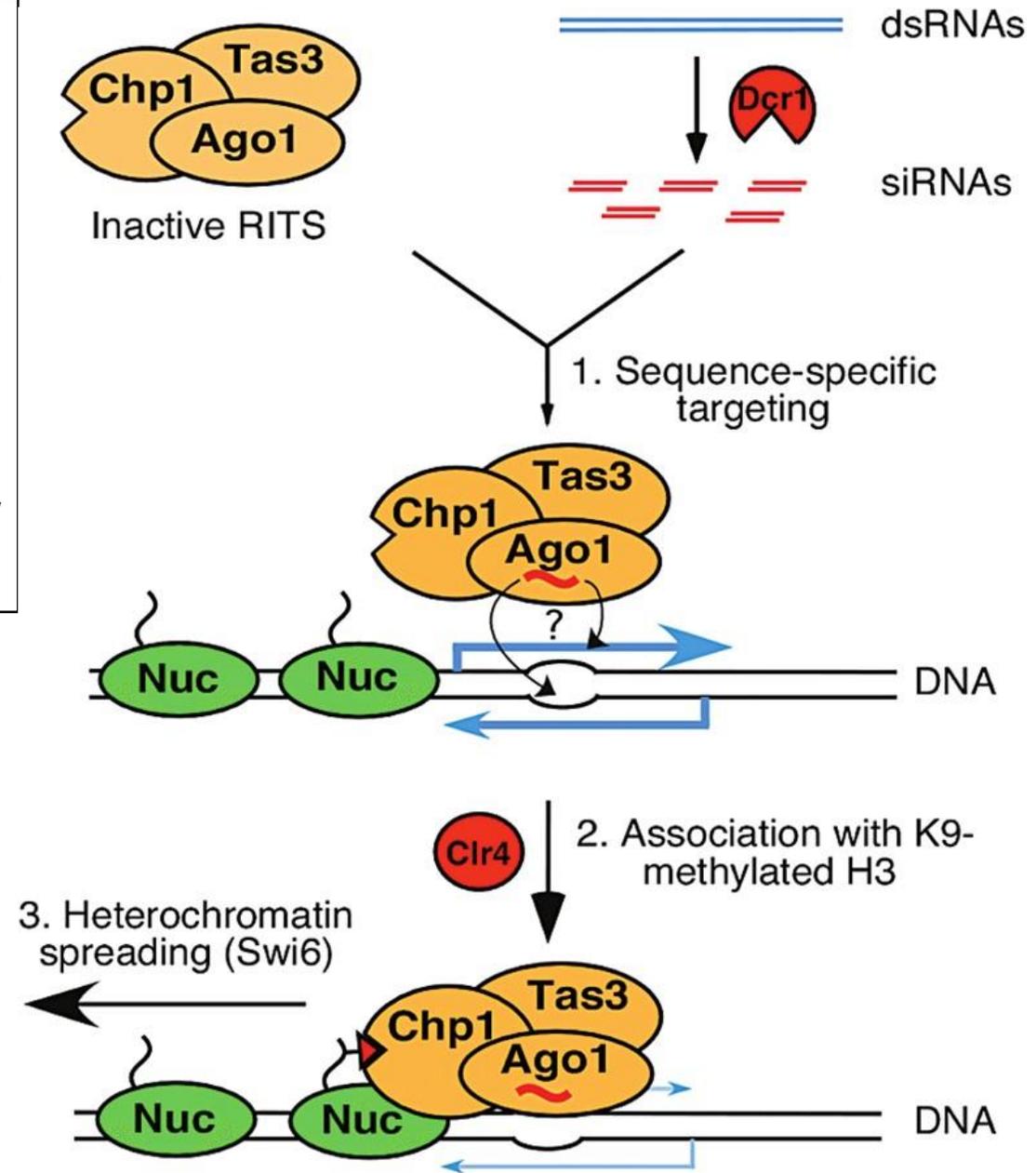
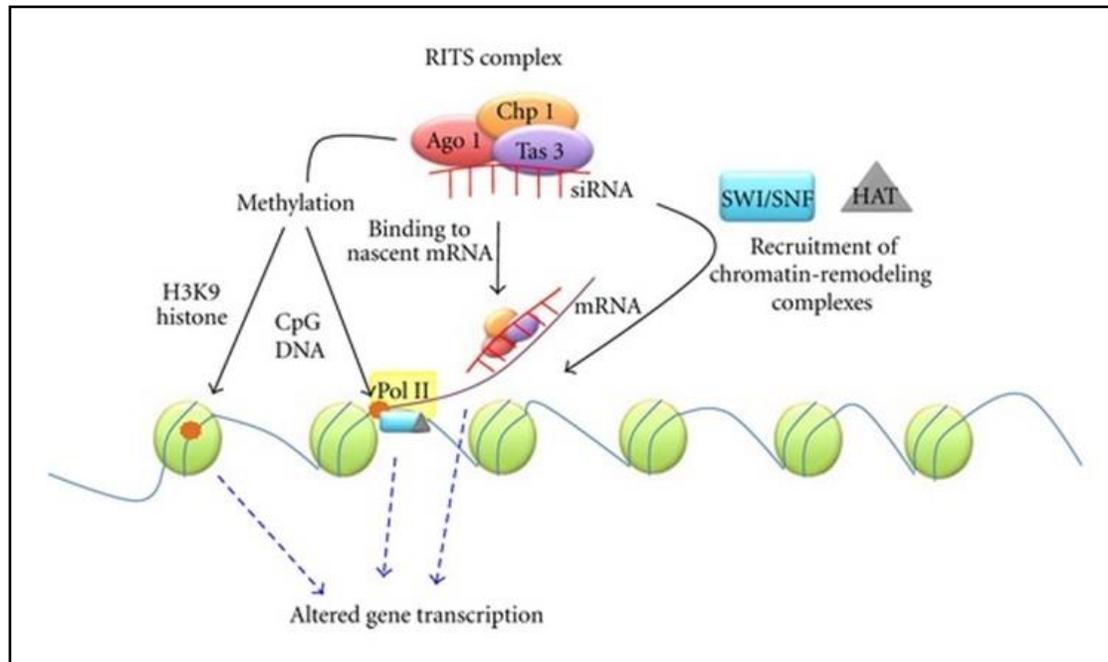
Inizia la fase di maturazione: uno dei due filamenti del dsRNA entra a far parte di un complesso proteico **RISC** (RNA-induced silencing complex) o del complesso **RITS** (RNA-induce transcriptional silencing) che agiscono come silenziatori genici in due momenti diversi.



Il **RISC** agisce direttamente a livello della trascrizione del gene target o impedendo la traduzione del messaggero. Il gene target viene ovviamente riconosciuto dall'sRNA che indirizza il complesso RISC al bersaglio.

Il complesso **RITS** (RNA-induce transcriptional silencing) ha invece un'azione sulla cromatina a livello strutturale. Si tratta infatti di un insieme di proteine con azioni specifiche capaci di intercettare e legare la regione bersaglio. Quelle più importanti sono Chp1, Tas3 e Ago1 che insieme ai piccoli RNA (21-23 nt) riconoscono regioni specifiche del genoma e promuovono la formazione di cromatina silenziata anche sfruttando sistemi di metilazione del genoma.

E' noto che tutte e tre le componenti di RITS sono richieste per l'assemblaggio dell'eterocromatina e per il silenziamento di geni.

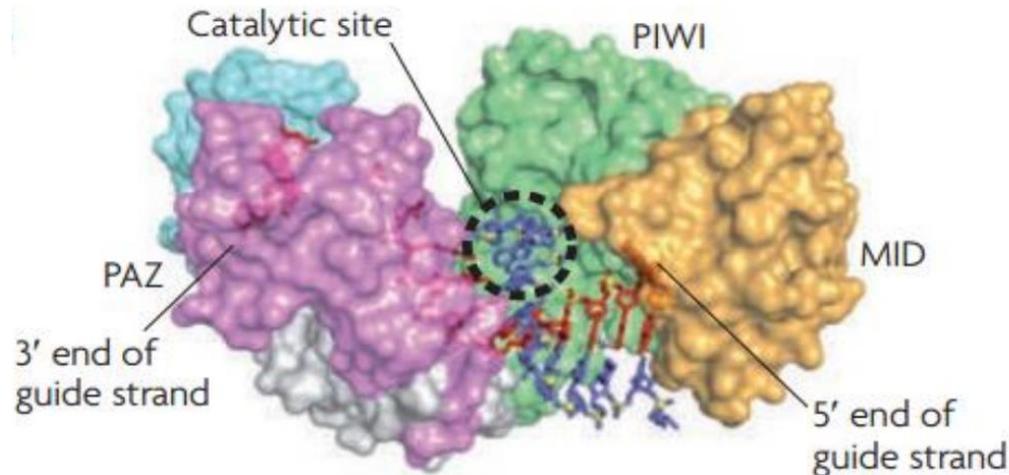


AGO- Argonauta

I complessi RISC e RITS contengono sempre un membro della famiglia delle proteine AGO. Come le proteine DICER anche le AGO sono numerose. In *A. thaliana* ve ne sono almeno 10 ed hanno una certa specificità funzionale in alcuni casi ancora oggetto di studio!

Le proteine AGO sono lunghe ca. 1000 aa e presentano tre domini caratteristici: il dominio PAZ, il MID e il Piwi.

- PAZ, lungo ca. 150 amminoacidi, si trova quasi al centro della molecola e lega il 3'-OH del piccolo RNA.
- MID ha il ruolo di promuovere il legame tra sRNA e la proteina
- Piwi comprende ca. 300 amminoacidi al terminale carbossilico e riconosce il terminale 5'-P del piccolo RNA.



Piwi è anche il dominio responsabile dell'attività endonucleasica diretta verso i trascritti bersaglio.

IMP: non tutte le AGO hanno capacità di taglio...sembra che alcune siano in grado di legare ulteriori proteine che potrebbero essere responsabili dei tagli!

Alcuni punti sono ancora da chiarire.

RISC e RITS con specifici AGO sono alla base di tutti i processi di silenziamento genico RNA-mediato. Nelle cellule vegetali ci sono poi varianti di DICER e AGO che operano su RNA differenti.

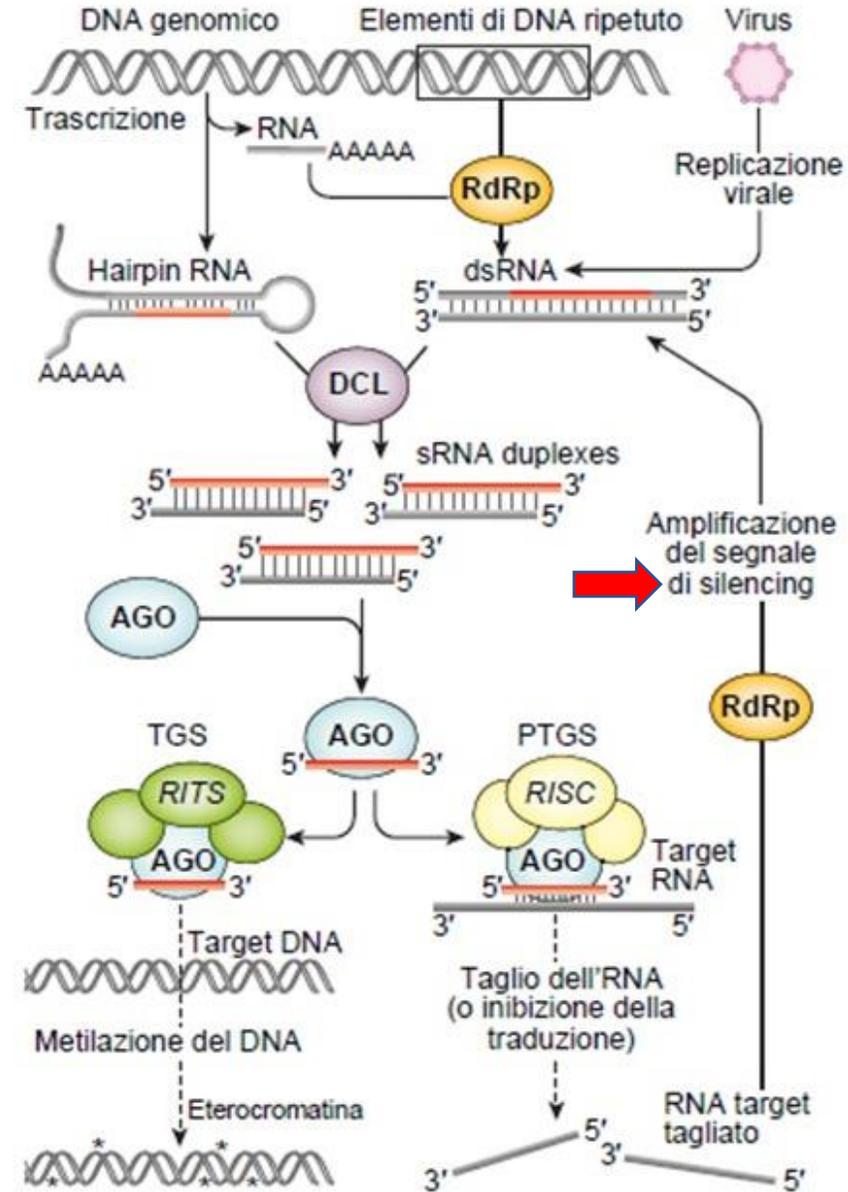
RdRp: una peculiarità delle piante

RdRp: RNA dependent RNA polimerase: Si tratta di un sistema assente negli animali che gioca un ruolo amplificatore avendo un effetto a cascata o di **transitività**.

RdRp agisce in 2 modi:

- 1) Produce del RNA antisenso partendo dagli mRNA tagliati da AGO. In questo modo producono dei nuovi dsRNA (un filamento mRNA e uno quello sintetizzato da RdRp) che possono entrare nel circuito DCL e amplificare l'effetto silenziamento.
- 2) Possono produrre direttamente dei dsRNA utilizzando sempre un mRNA come template.

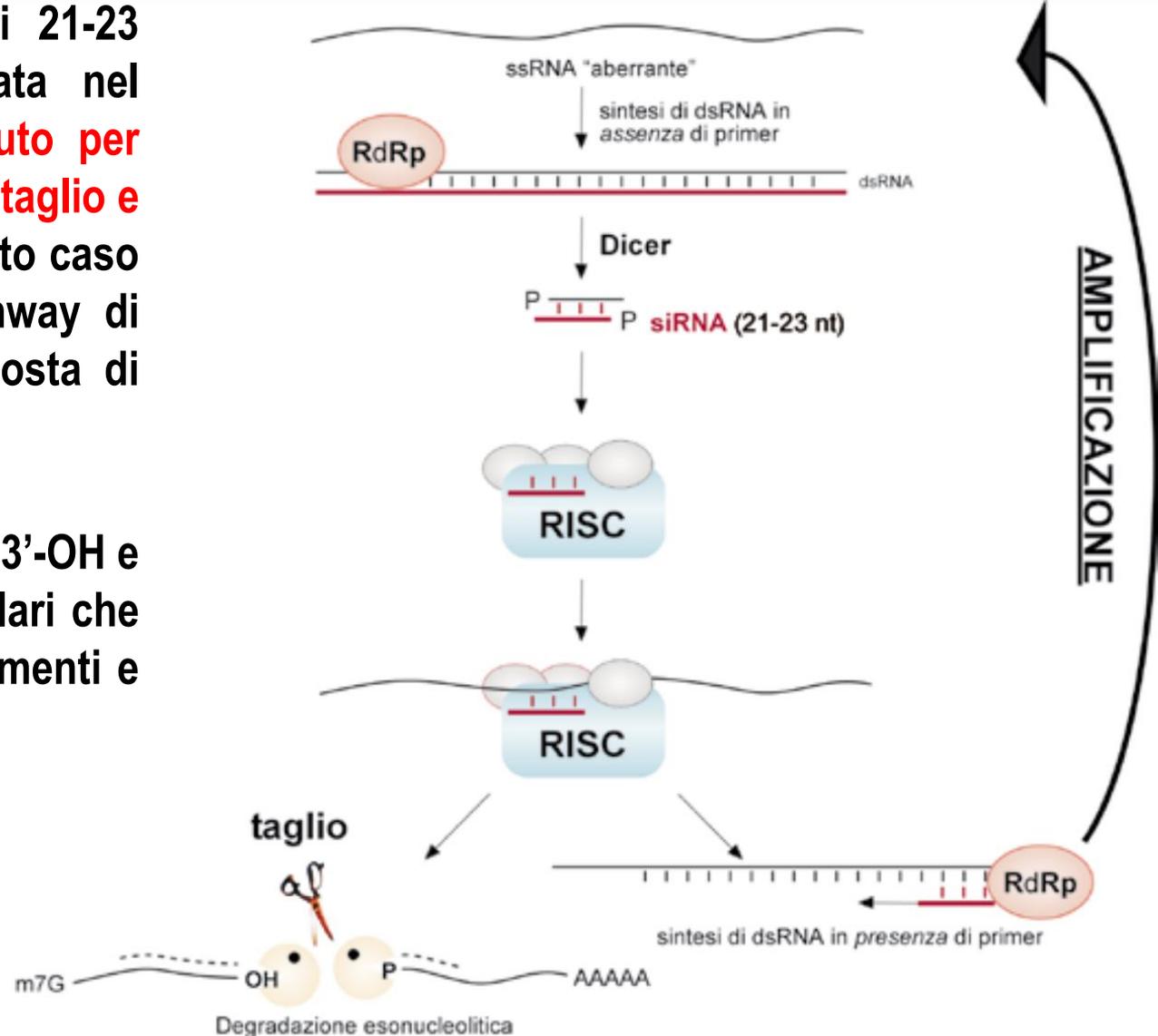
Significato biologico della transitività: Si ipotizza che l'effetto moltiplicatore nasca come meccanismo di difesa verso i virus, soprattutto quelli a RNA. RdRp agirebbe potenziando la degradazione di questi RNA virali e proteggendo quindi la cellula. Alcune RdRp (es. RpRs 6) possono anche passare nel sistema vascolare della pianta e raggiungere i veri tessuti e organi, fornendo una sorta di 'immunità' diffusa verso il virus.



Visione di insieme

L'enzima Dicer converte dsRNA lunghi in dsRNA di 21-23 nucleotidi. Una sola elica (siRNA) viene incorporata nel complesso RISC o RITS. **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 cellulari che completano la degradazione del substrato in tanti frammenti e inattivano definitivamente il messaggero.

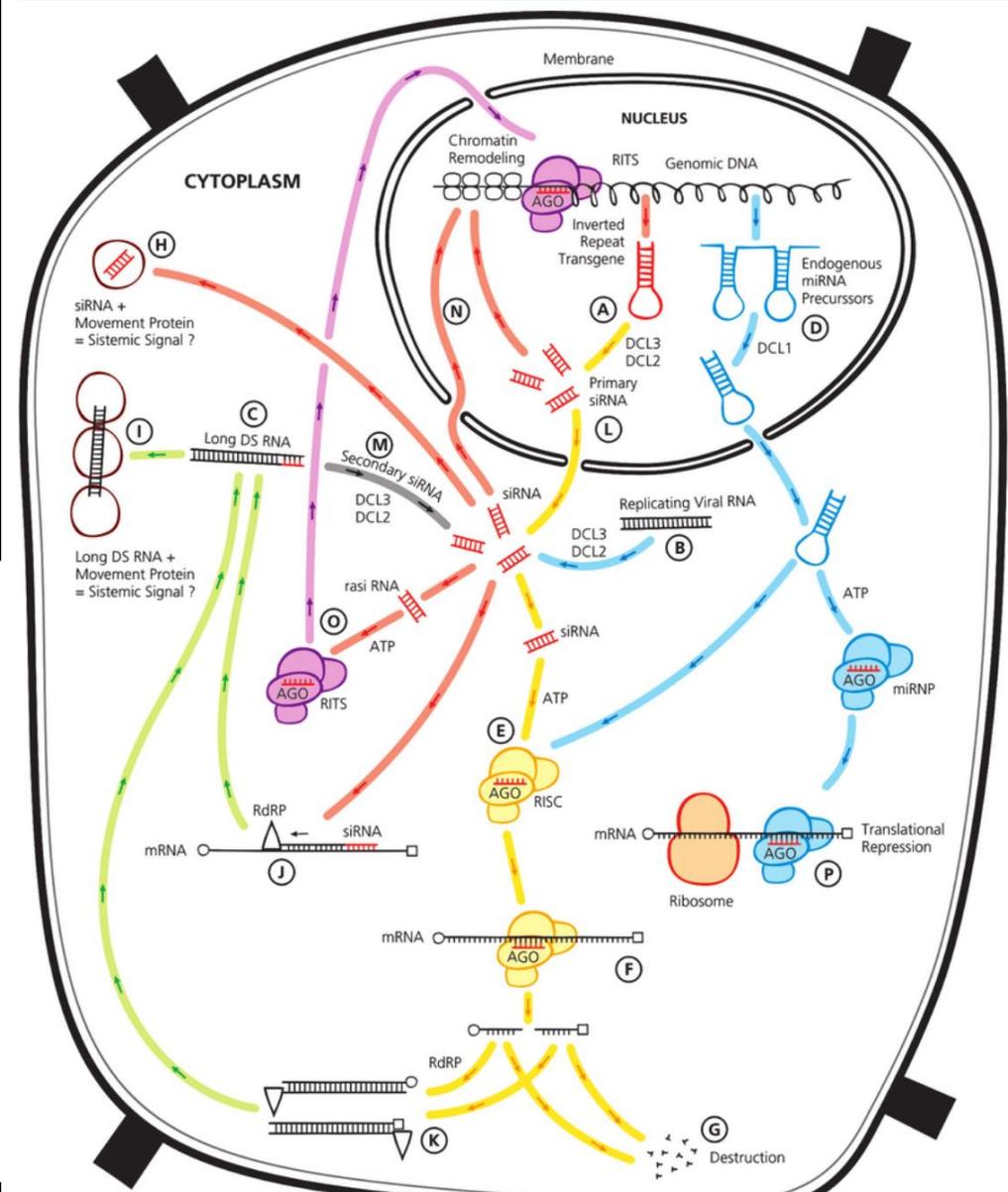


DCL, AGO e RdRp sono ELEMENTI CENTRALI, INTERCAMBIABILI E ANCHE MOLTO VARIABILI NEI DIVERSI ORGANISMI.

E' evidente che il processo di silenziamento mediato da RNA è molto importante ed evolutivamente ha avuto un'amplificazione e diversificazione. La figura evidenzia come vi siano diversi enzimi e complessi che agiscono in punti specifici. Alcuni ancora non si conoscono.

NB: Abbiamo comunque informazioni sufficienti per sfruttare questa tecnologia per il miglioramento genetico.

Gene Silencing pathways in plant cells. (A) Dicer-like protein (DCL2, DCL3) processing of transcripts containing inverted repeats (Meister & Tuschl, 2004); (B) Dicer-like protein (DCL2, DCL3) processing of intermediates formed during RNA virus replication (Hannon, 2002); (C) Long dsRNA; (D) Dicer-like protein (DCL1) processing of miRNAs precursors (Xie et al., 2004); (E) RNA-induced silencing complex (RISC) (Hammond et al., 2000; Nykänen et al., 2001); (F) Targeting and cleavage of sequence specific mRNA by RISC (Martinez & Tuschl, 2004); (G) mRNA destruction after RISC processing (Tolia & Joshua-Tor, 2006); (H) Possible systemic signal composed by siRNA + movement proteins; (I) Possible systemic signal composed by long dsRNA + movement proteins (Waterhouse et al., 2001); (J) Primer dependent RdRP amplification (Matzke et al., 2001; Ceruti, 2003; Baulcombe, 2004); (K) Primer-independent (aberrant RNA features) RdRP amplification (Baulcombe, 2004); (L) Primary siRNA (Pak & Fire, 2007); (M) Secondary siRNA processing by Dicer-like enzymes (Pak & Fire, 2007); (N) RNA-directed DNA methylation (RdDM) signal transmitted from the cytoplasm to the nucleus is most likely siRNA (Xie et al., 2004); (O) RNAi effector complex termed RITS (RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing) required for heterochromatin assembly in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) (Verdel et al., 2004). RITS is composed by repeat-associated short interfering RNA (rasiRNA) (Meister & Tuschl, 2004); (P) Translational repression of mRNA by miRNP (Meister & Tuschl, 2004).



Tratto dal: Souza, A. J. D., Mendes, B. M. J., & Mourão Filho, F. D. A. A. (2007). Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. Scientia Agricola, 64, 645-656.

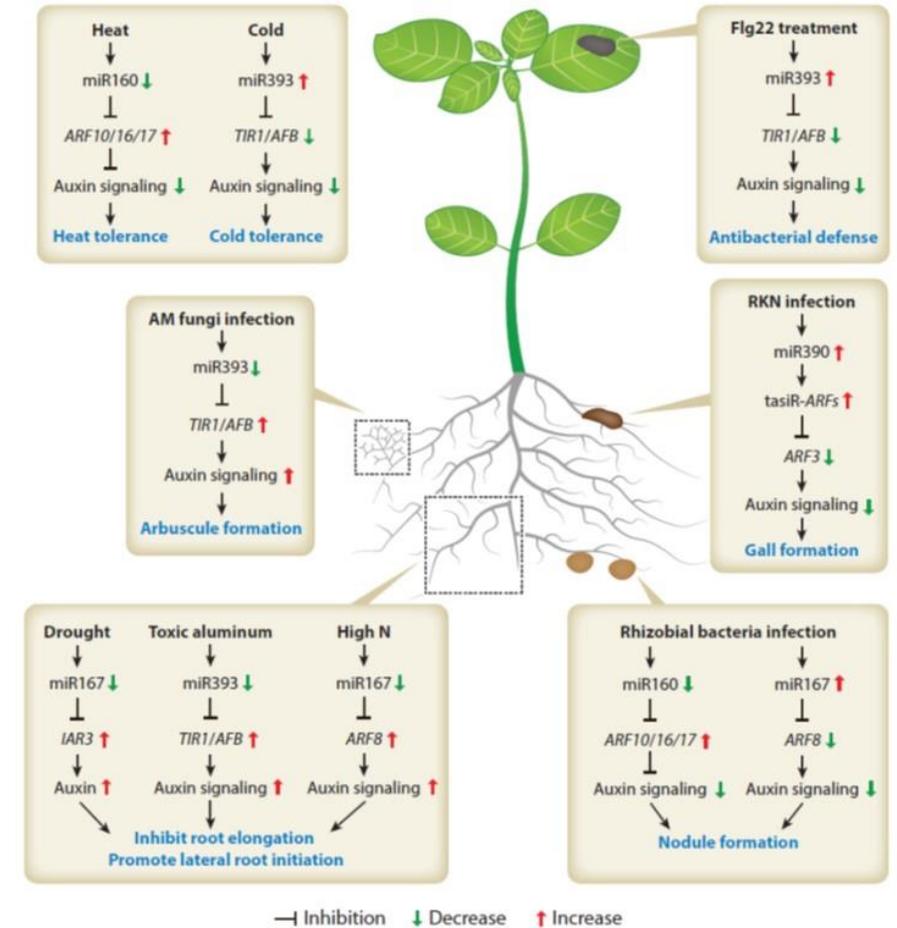
Biotecnologie basate su iRNA

Sulla base dei meccanismi di sintesi dei dsRNA e delle sequenze target sono stati classificati i diversi tipi di RNAi. Tra i più noti i microRNA o miRNA.

I microRNA o miRNA sono piccole molecole di 21 nt di origine endogena e nello specifico sono hairpin RNA in quanto si generano da una singola molecola che si ripiega formando una forcina.

Queste molecole sono quindi prodotte da 'geni' specifici della pianta (o di altri eucarioti) pertanto il sistema oltre ad essere molto regolato è antico e evolutivamente funzionale.

Il ruolo chiave dei miRNA nelle piante nasce dal fatto che essi hanno un'elevata complementarità con i loro siti bersaglio e questo li rende capaci di rispondere in modo specifico a diversi eventi. Un ruolo chiave dei miRNA è la risposta a fattori esterni e stress come riassunto nel paper di Song. Come si evidenzia vi sono miRNA specifici per diversi compartimenti e fattori di disturbo.



Tratto da: Song, Xianwei, et al. "MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions." *Annual review of plant biology* 70 (2019): 489-525.

I microRNA sono fondamentali anche nello sviluppo della pianta e ormai sono noti numerosi geni target dei miRNA coinvolti nello sviluppo degli organi della pianta.



microRNAs and Their Roles in Plant Development

Qingkun Dong¹, Binbin Hu^{1,2} and Cui Zhang^{1,2*}

¹Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, ²College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Small RNAs are short non-coding RNAs with a length ranging between 20 and 24 nucleotides. Of these, microRNAs (miRNAs) play a distinct role in plant development. miRNAs control target gene expression at the post-transcriptional level, either through direct cleavage or inhibition of translation. miRNAs participate in nearly all the developmental processes in plants, such as juvenile-to-adult transition, shoot apical meristem development, leaf morphogenesis, floral organ formation, and flowering time determination. This review summarizes the research progress in miRNA-mediated gene regulation and its role in plant development, to provide the basis for further in-depth exploration regarding the function of miRNAs and the elucidation of the molecular mechanism underlying the interaction of miRNAs and other pathways.

miRNA	Target	Target function	Species	References
miR156	SPL family	Plastochron length, promoting flowering; Leaf development, root development, secondary metabolism and abiotic stress; tillering and corn development in <i>Zea mays</i>	<i>Arabidopsis</i> and <i>Zea mays</i>	Aukerman and Sakai, 2003; Chuck et al., 2007a, 2010; Wang et al., 2008; Xu et al., 2016b; Dai et al., 2018
miR159	GAMYB or GAMYB-like gene	Male reproductive development, seed development, vegetative tissues and reproductive development	<i>Arabidopsis</i>	Allen et al., 2007; Millar et al., 2019
miR160	ARFs	Embryo, leaf and root development, hypocotyl elongation	<i>Arabidopsis</i> , <i>Medicago truncatula</i> and <i>Zea mays</i>	Bustos-Sanmamed et al., 2013; Lopez-Ruiz et al., 2019; Yang et al., 2019; Dai et al., 2021
miR164	NAC family	Meristem boundary identity, Auxiliary meristem formation, leaf and flower development, lateral root initiation	<i>Arabidopsis</i> , <i>Zea mays</i> and <i>Oryza</i>	Li et al., 2003; Laufs et al., 2004; Hibara et al., 2006; Raman et al., 2008; Zheng et al., 2019; Wang et al., 2021b
miR165/166	HD-ZIP III	Maintaining meristematic cells, adaxial identity of leaves, lateral root growth, and procambium identity	<i>Arabidopsis</i>	Williams et al., 2005; Jia et al., 2015; Merelo et al., 2016; Yan et al., 2016
miR167	ARFs	Development of male organ, roots, stems, leaves and flowers, flowering time, embryonic development, seed development and stress response, defense against pathogens	<i>Arabidopsis</i> and <i>Oryza</i>	Wu et al., 2006; Liu et al., 2012; Yao et al., 2019; Caruana et al., 2020
miR169	CBF and NF-YA family	Enhancer of C homeotic gene transcription and root architecture	<i>Arabidopsis</i> , <i>Antirrhinum majus</i> and <i>Zea mays</i>	Cartolano et al., 2007; Sorin et al., 2014; Xu et al., 2014; Xing et al., 2021
miR171	SCL	Chlorophyll biosynthesis, phase transitions and floral meristem determinacy	<i>Arabidopsis</i> , barley	Curaba et al., 2013; Ma et al., 2014; Li et al., 2021
miR172	AP2 family	Represses flowering, flower meristem identity and patterning; vegetative phase change, carpel and stamen development; flower opening, tuberization and salt tolerance	<i>Arabidopsis</i> , <i>Z. mays</i> , <i>Oryza</i> , <i>H. vulgare</i> , and <i>S. tuberosum</i>	Chuck et al., 2007b; Martin et al., 2009; Wu et al., 2009; Nair et al., 2010; Wollmann et al., 2010; Zhu and Hellinwell, 2011; Cheng et al., 2021a; Lian et al., 2021; Werner et al., 2021
miR319	TCP family	Leaf development and senescence, organ curvature, and hormone biosynthesis and signaling.	<i>Arabidopsis</i> and <i>Solanum lycopersicum</i>	Ori et al., 2007; Schommer et al., 2014; Koyama et al., 2017; Bresso et al., 2018
miR390	TAS3	ta-siRNA biogenesis for ARF repression and indirect miR165/166 regulation, lateral root growth, leaf patterning	<i>Arabidopsis</i>	Fahlgren et al., 2006; Marin et al., 2010; Endo et al., 2013; Dastidar et al., 2019
miR393	TIR1 and AFB	Auxin homeostasis, lateral root growth, leaf shape/number	<i>Arabidopsis</i> and <i>Oryza</i>	Parry et al., 2009; Chen et al., 2011; Windels and Vazquez, 2011; Lu et al., 2018; Wang et al., 2018
miR394	LCR	Meristematic identity suppression via WUS downregulation, leaf inclination and architecture,	<i>Arabidopsis</i>	Baumann, 2013; Knauer et al., 2013; Qu et al., 2019
miR396	GRF	Cell proliferation in leaves, disease-resistance, somatic embryogenesis, grain size and panicle branching	<i>Arabidopsis</i> , <i>Medicago</i> , and <i>Oryza</i>	Debernardi et al., 2012; Bazin et al., 2013; Liu et al., 2014a; Chandran et al., 2018; Szczygiel-Sommer and Gaj, 2019; Liebsch and Palatnik, 2020; Zhang et al., 2020
mir397	OsLAC	Grain yield, panicle branches	<i>Oryza</i>	Zhang et al., 2013
miR824	AGL16	Stomatal patterning	<i>Arabidopsis</i>	Bergmann and Sack, 2007
miR828 and miR858	MYBs	Fiber development, anthocyanin, and flavonol accumulation	Cotton, grapes	Guan et al., 2014; Tirumalai et al., 2019
miR847	IAA28	Lateral root formation	<i>Arabidopsis</i>	Wang and Guo, 2015
miR857	LACCASE7	Secondary growth	<i>Arabidopsis</i>	Abdel-Ghany and Pilon, 2008; Zhao et al., 2015
TAS3	ARF3/4 and (only in mosses) AP2-like	Vasculature development, Leaf polarity / phase transition	All land plants	Fahlgren et al., 2006; Jing et al., 2017

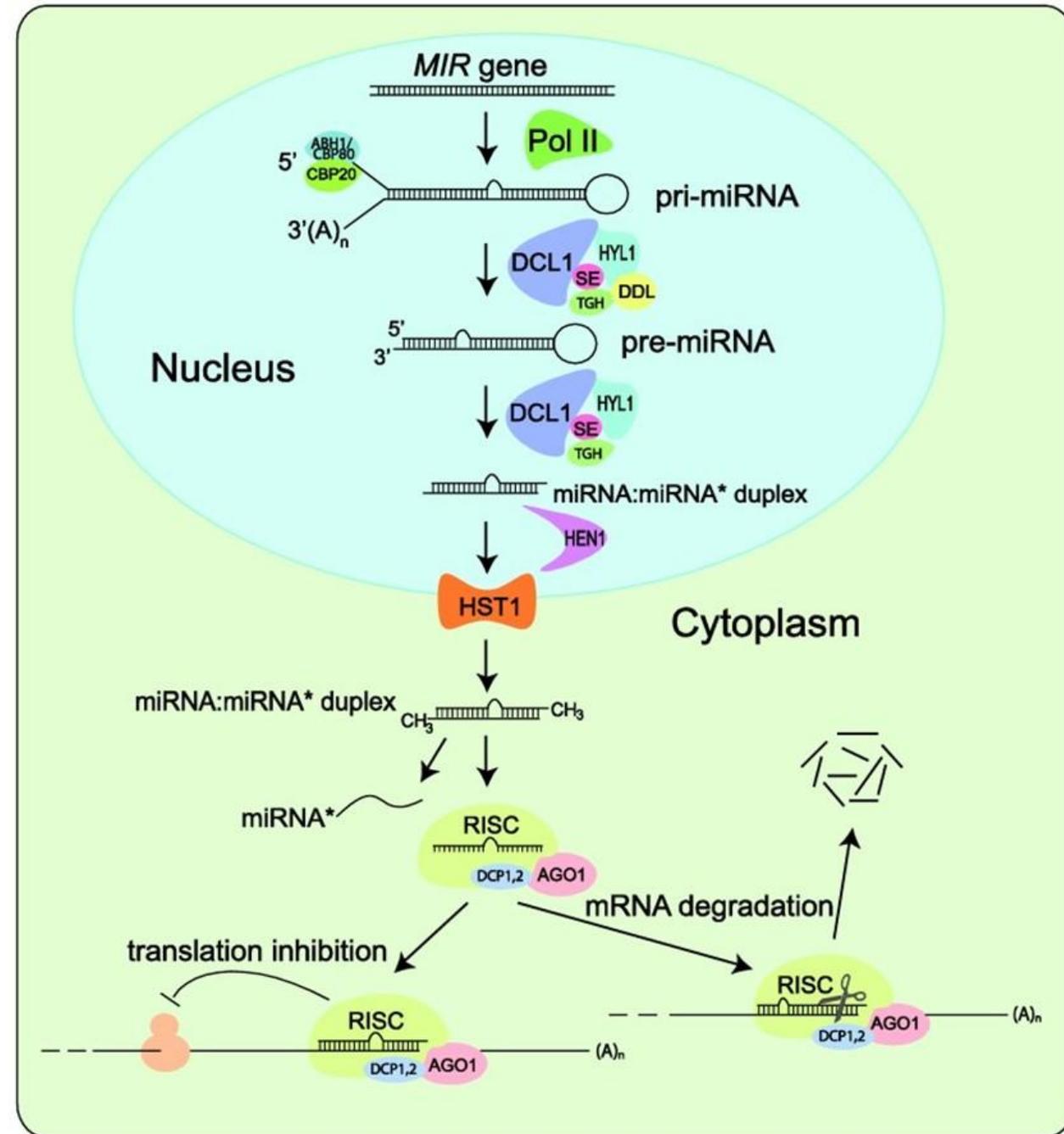
Biosintesi dei miRNA

I geni codificanti i miRNA della piante sono localizzati in regioni intergeniche, sono molto conservati a livello evolutivo e sono trascritti ad opera della RNA polimerasi II.

La trascrizione porta alla formazione di un trascritto primario che ha i canonici 7 metil-guanosina al 5' e una coda di poli-A al 3', detto pri-miRNA.

L'azione di diversi enzimi porta prima alla trasformazione del pri-miRNA in frammenti più piccoli con un'ansa detti pre-miRNA e successivamente in dsRNA detti miRNA duplex.

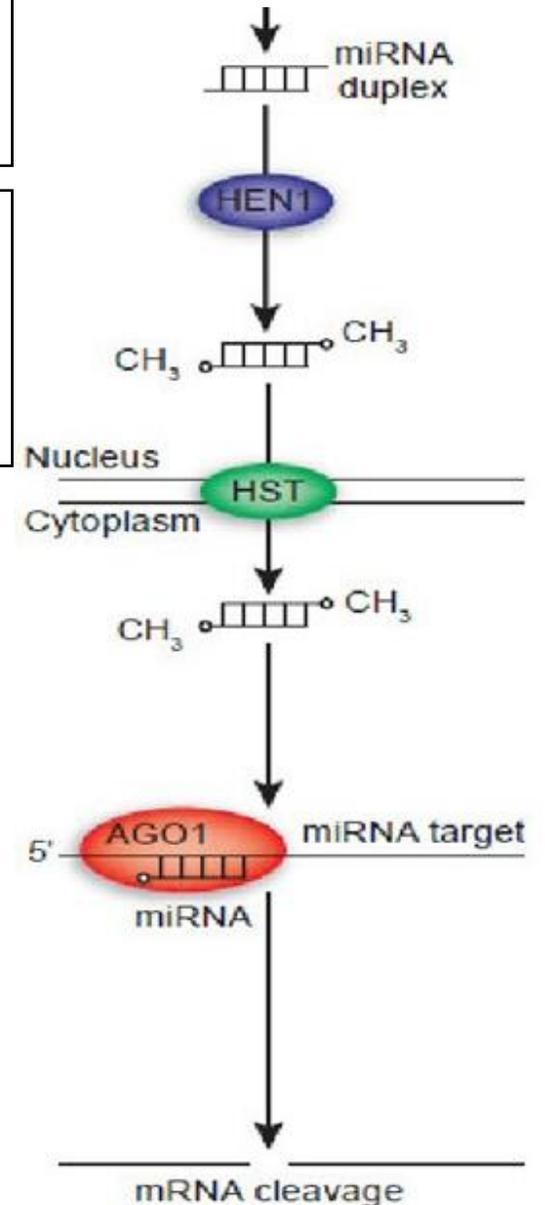
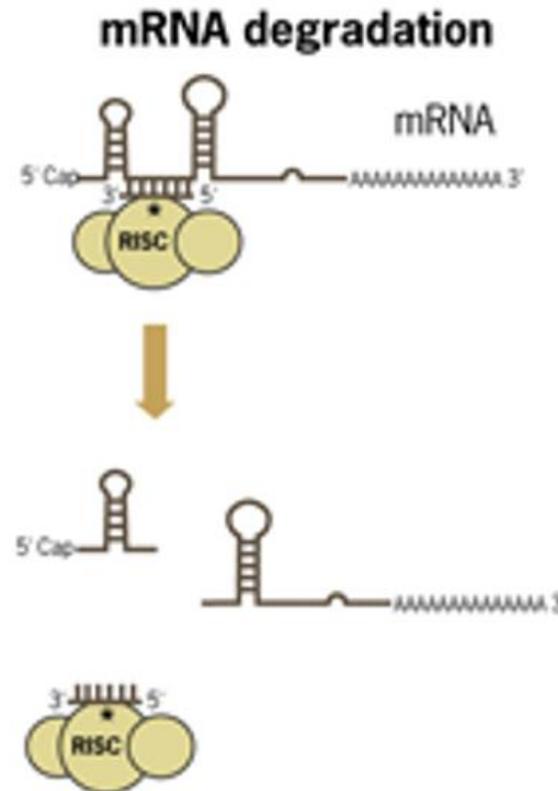
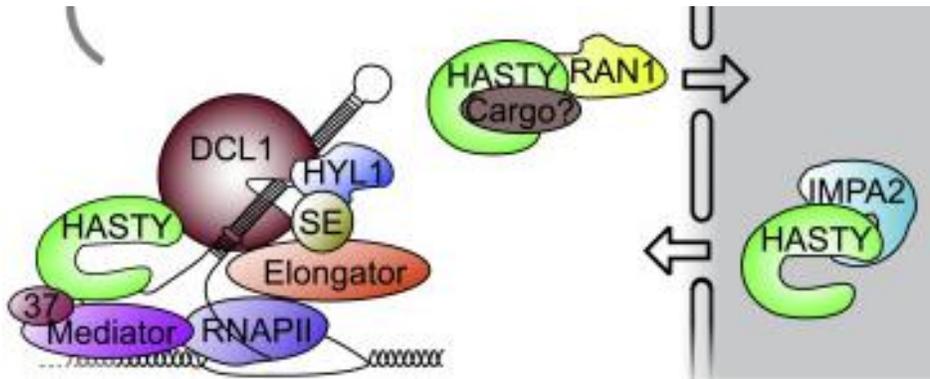
Dicer o DCL sono fondamentali in questo processo ed in particolare DCL1 agisce insieme ad altri fattori come la proteina HYL1 e la proteina zinc finger SE.



I miRNA duplex sono composti da un filamento attivo chiamato **miRNA maturo** e da un filamento destinato alla degradazione che è il complementare e viene chiamato **miRNA star o miRNA***

La metilasi HEN1 protegge questi miRNA duplex dalla degradazione metilando entrambe i filamenti.

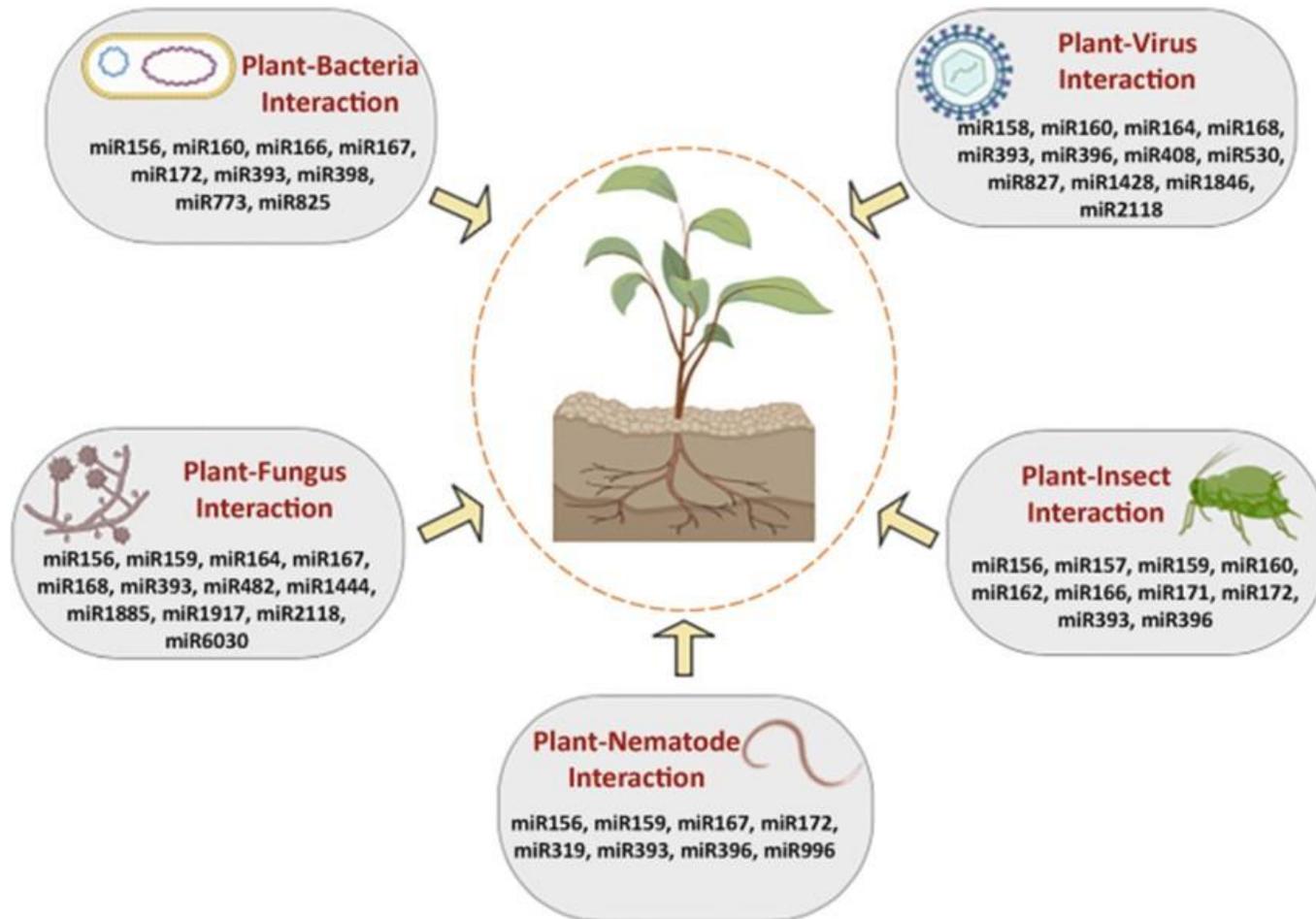
Il trasporto dal nucleo al citoplasma, dove avviene l'azione di silenziamento degli mRNA, si realizza grazie a un'ESPORTINA ovvero la proteina HASTY o HST.



Nel citoplasma la proteina AGO1 svolge l'azione di degradazione dei messaggeri sia realizzando un taglio dell'mRNA bersaglio, sia impedendone la traduzione.

miRNA: sistema regolato

I geni codificanti per i microRNA sono altamente regolati sia nello spazio (tessuto specificità, funzioni specifiche), sia nel tempo (fasi di sviluppo) attraverso promotori specifici. Anche l'espressione di DICER e di AGO sono regolati in modo fine.

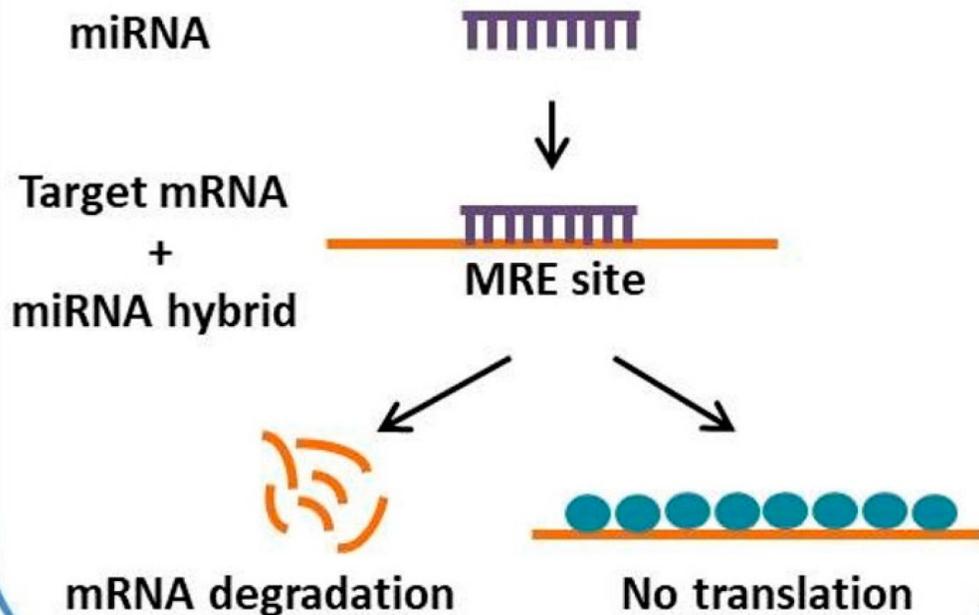


Questi specificità e questo livello di regolazione suggeriscono che a livello cellulare questo meccanismo di controllo non è opzionale ma è fondamentale per controllare la trascrizione e traduzione anche dopo che sono stati attivati fenomeni di stimolazione diretti a generare mRNA.

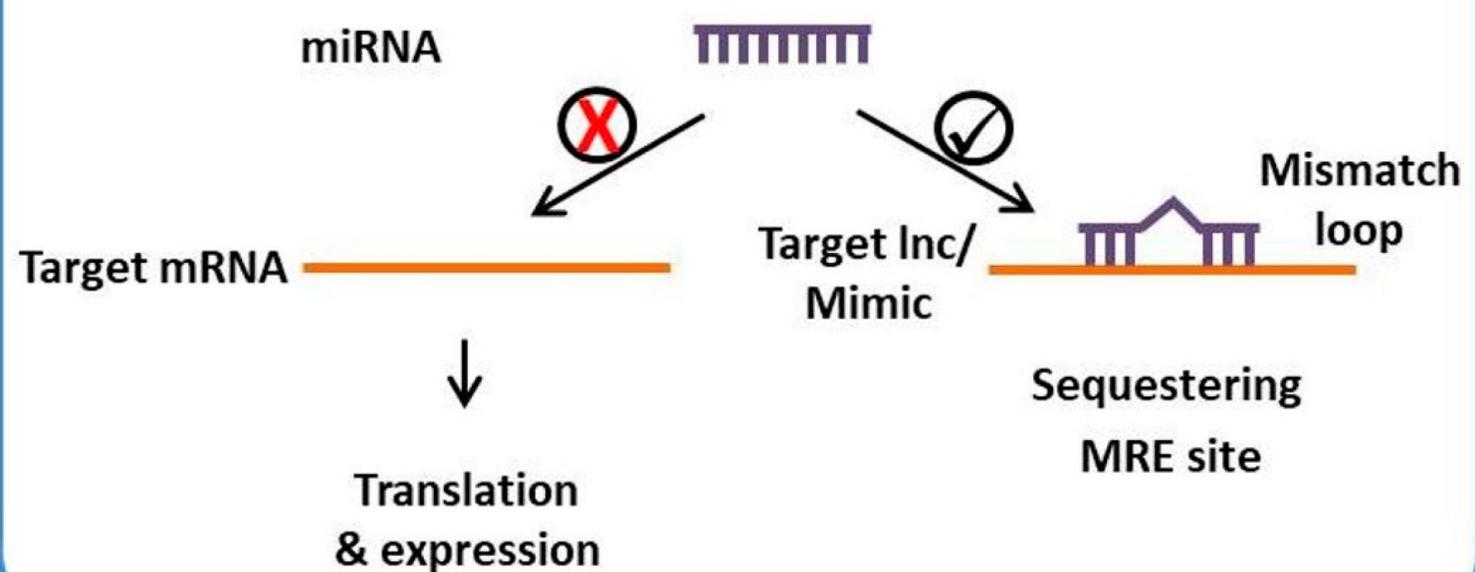
Target mimicry

Nelle piante esiste un ulteriore meccanismo di regolazione noto come target mimicry in cui la pianta inibisce l'azione del miRNA. Nello specifico produce un mRNA che è identico a quello bersaglio tranne nelle posizioni 10 e 11 che è dove AGO esegue il taglio. In questo modo il miRNA viene sequestrato da questo target mimicry RNA e rimane legato (senza tagliarlo) senza poter agire sul vero mRNA bersaglio come nella figura b. Questo meccanismo può essere anche usato in ingegneria generica per silenziare l'azione di specifici miRNA.

(a) miRNA silencing



(b) Target mimicry



Trans acting siRNA o ta-siRNA

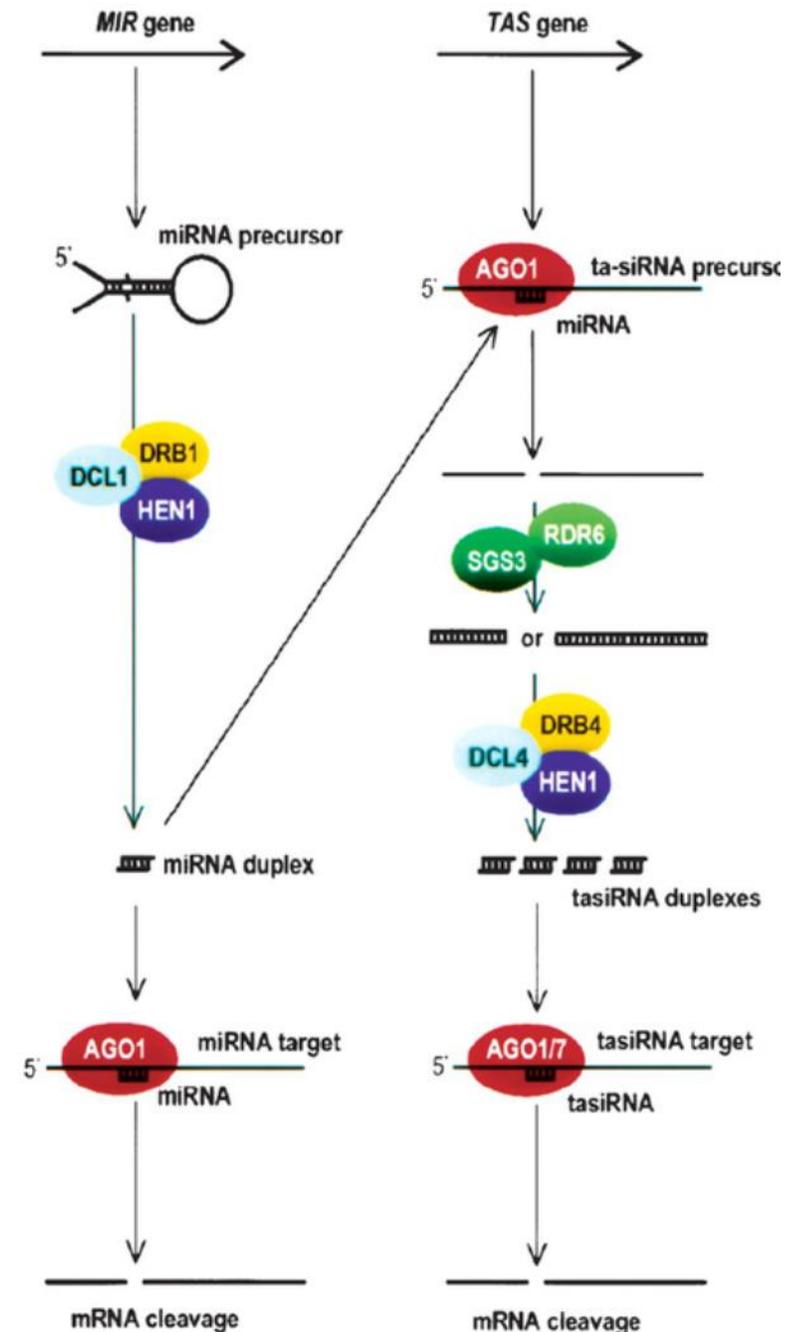
I ta-siRNA sono una classe di piccoli RNA che derivano da siti genomici specifici noti come TAS. I Trascritti TS generano siRNA ovvero dsRNA composti da due molecole diverse che si appaiano. (Ricordiamo che miRNA sono hairpin RNA).

Il processo di sintesi dei ta-siRNA inizia con il taglio dei trascritti TAS ad opera di miRNA, AGO 1 e/o AGO7. Si ottengono quindi molecole di RNA che fungono da stampo per formare un filamento complementare ad opera della ribonucleasi 6 (RDRP6). Si genera un dsRNA lungo.

Questo subisce un taglio da parte di DCL. La DCL non è la 1 bensì la 4. Questa è una differenza sostanziale perché sembra che DCL4 sia in grado di generare frammenti di dimensioni differenti rispetto ai miRNA che avrebbero la capacità di spostarsi da cellula a cellula amplificando il segnale a cellule limitrofe.

I miRNA di solito sono attivi solo nella singola cellula!

Evolutivamente i ta-siRNA sarebbero pensati per diffondere il segnale in cellule affini anche per generare una gradualità di segnale e una polarità di informazione.

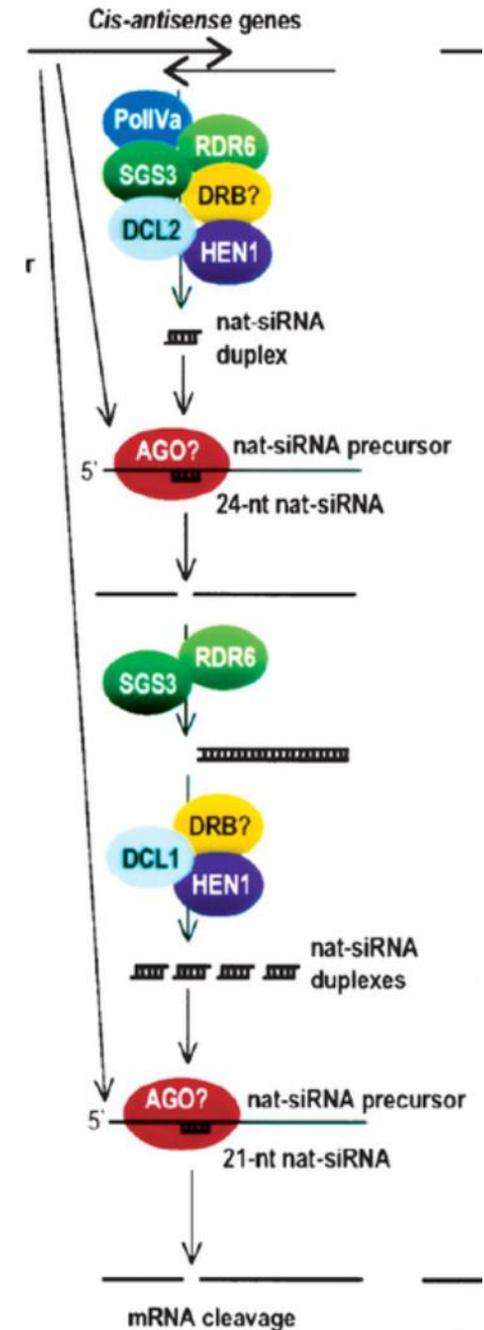
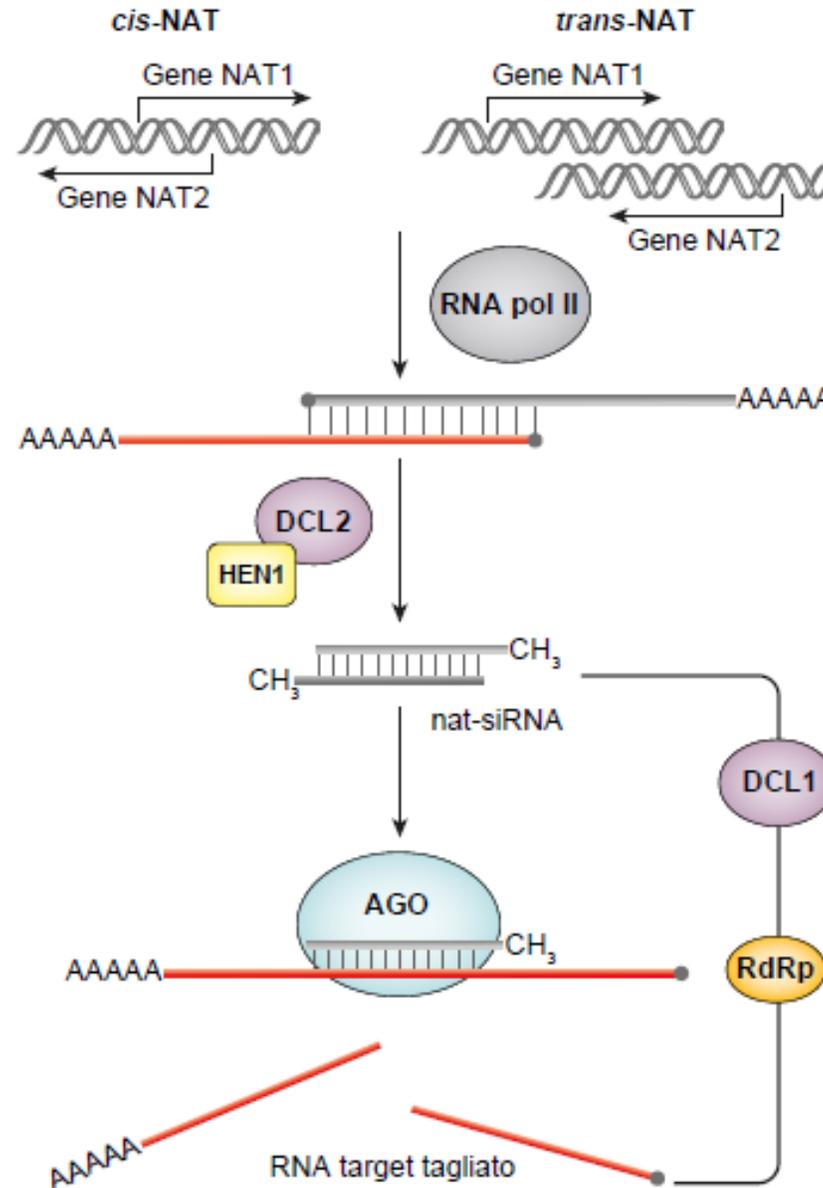


Natural antisense transcriptional RNA o nat-siRNA

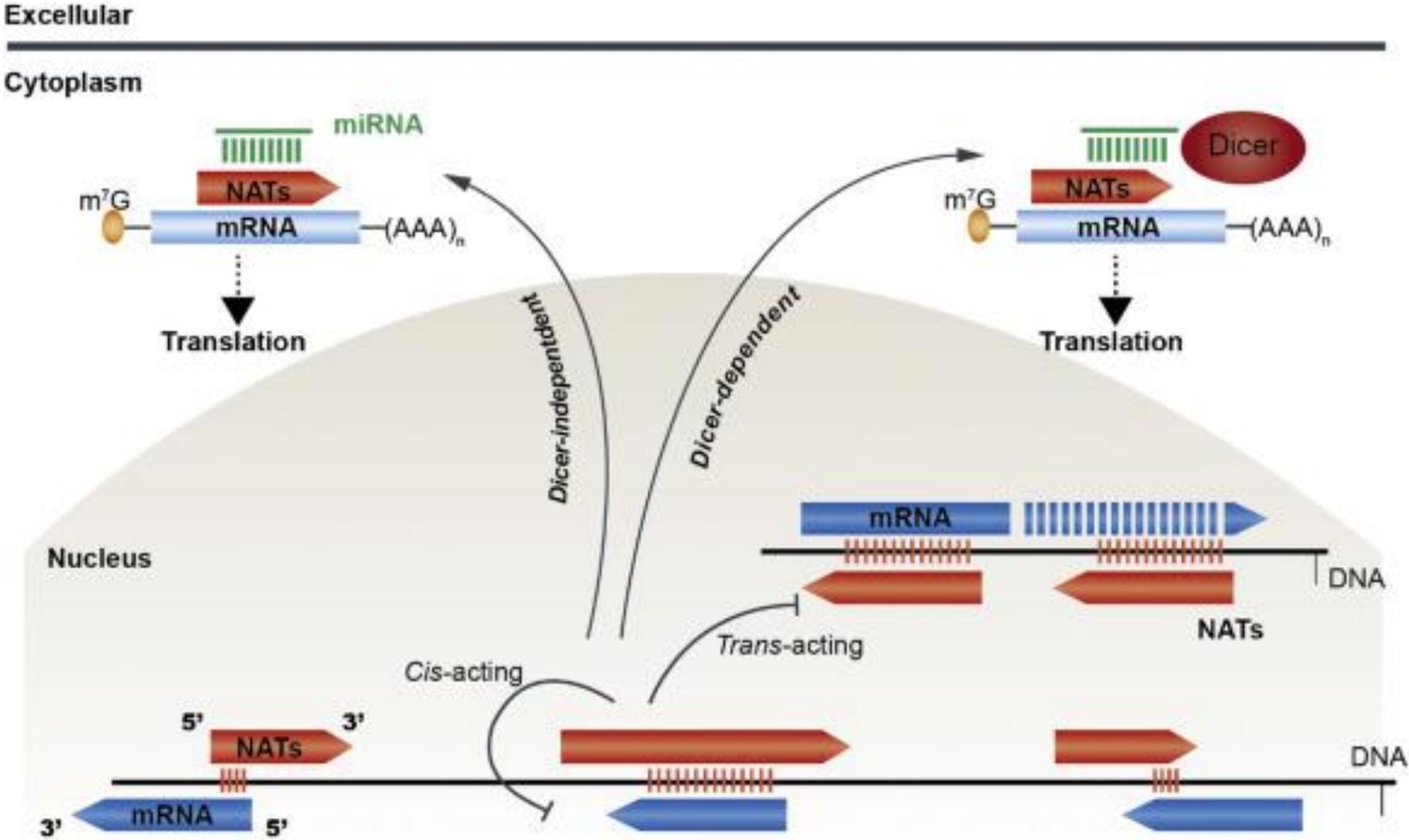
Sono sRNA endogeni che derivano da geni codificanti e non codificanti presenti nel genoma. Sono stati classificati in cis-Nat ovvero quelli che vengono trascritti nella stessa porzione di genoma sui due filamenti opposti e generano un dsRNA perfettamente appaiato.

I trans-NAT si generano invece da porzioni diverse del genoma e i diversi frammenti si appaiano in base alla complementarietà generando spesso dsRNA non perfettamente allineati.

In entrambi i casi i dsRNA vengono processati in siRNA ed hanno come siti bersaglio gli stessi geni da cui sono stati generati o anche altri.



I NAT esercitano effetti regolatori sul gene in parte in modo dipendente da Dicer o -indipendentemente (Fig. sotto). In particolare, è stato recentemente scoperto che questi RNA sono in grado di tradursi in proteine proprio come fanno i tradizionali geni codificanti per le proteine annotati, e generare peptidi che potrebbero intervenire nel taglio dell' mRNA.



Silenziamento genico mediante azioni dirette su cromatina

I piccoli RNA sono anche in grado di promuovere la formazione di eterocromatina trascrizionalmente silente e questo impedisce la trascrizione e traduzione di uno o più geni vicini.

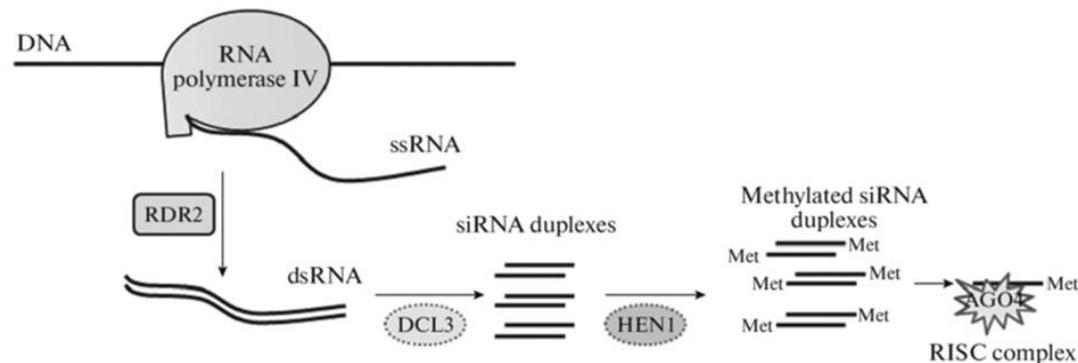
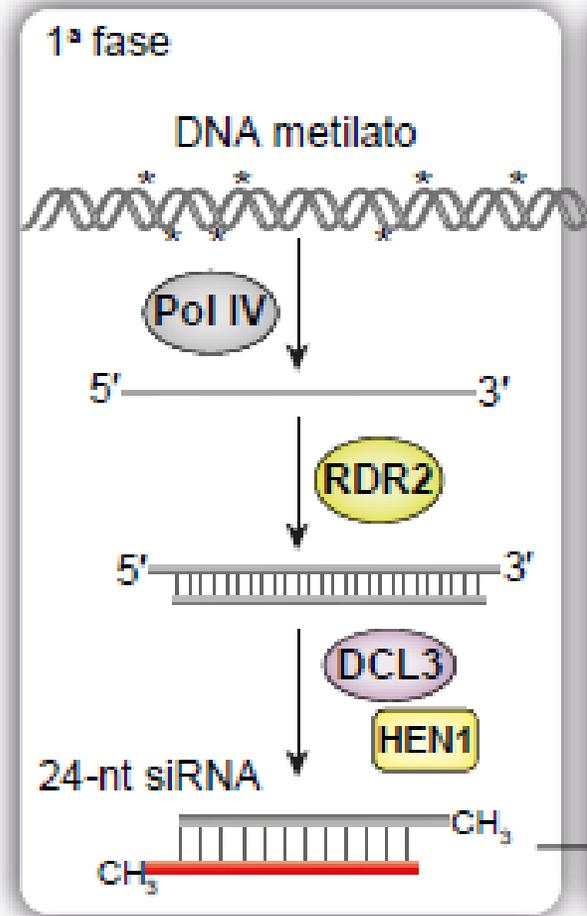
Nelle piante questo processo avviene grazie a processi di metilazione delle citosine grazie al sistema della RdDM (RNA-directed DNA Methylation). Il DNA metilato viene compattato da proteine specifiche che lo rendono inattivo e silente.

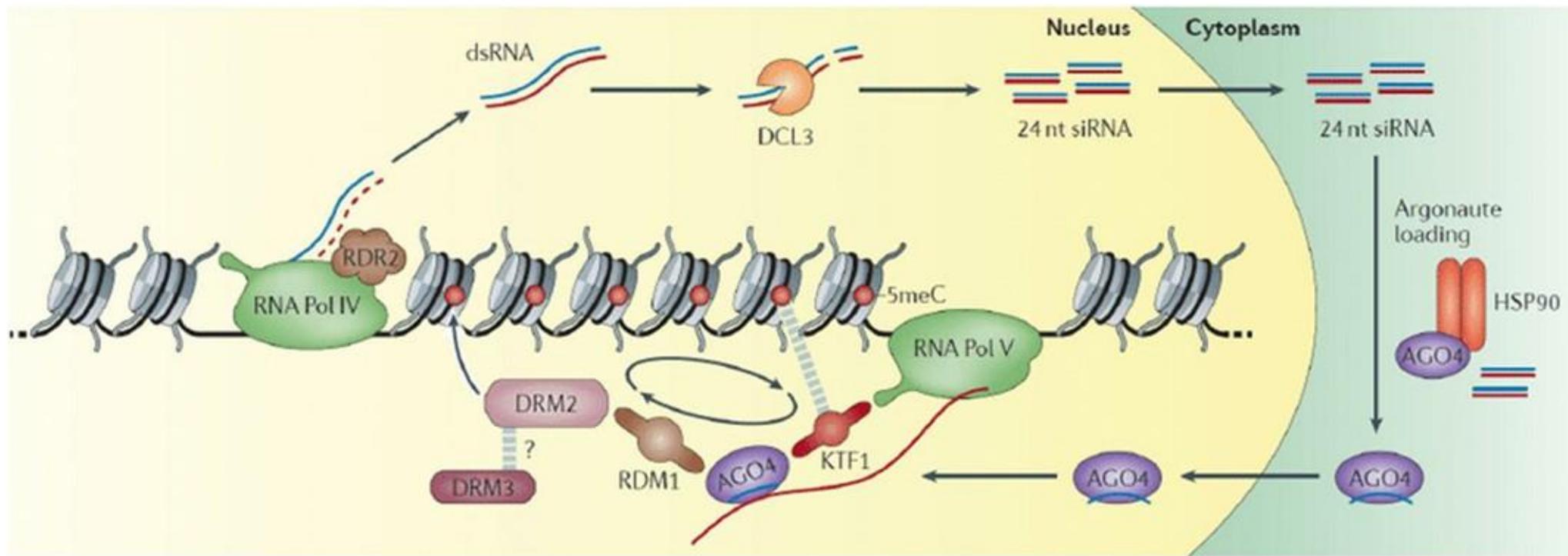
Il processo è in due fasi:

Fase I – Partendo da regioni di cromatina condensata, spesso caratterizzate da sequenze ripetute di DNA e da DNA metilato, la RNA polimerasi V origina trascritti di RNA. Il reclutamento coinvolge complessi proteici che contengono enzimi come SSH e CLSY1.

Si formano molecole di RNA di 24-25 nt che vengono convertiti in dsRNA dalla RdDM – RDR2.

Interviene quindi DCL3 che forma i siRNA che diventano stabili grazie a HEN1 che li metila in posizioni terminali.





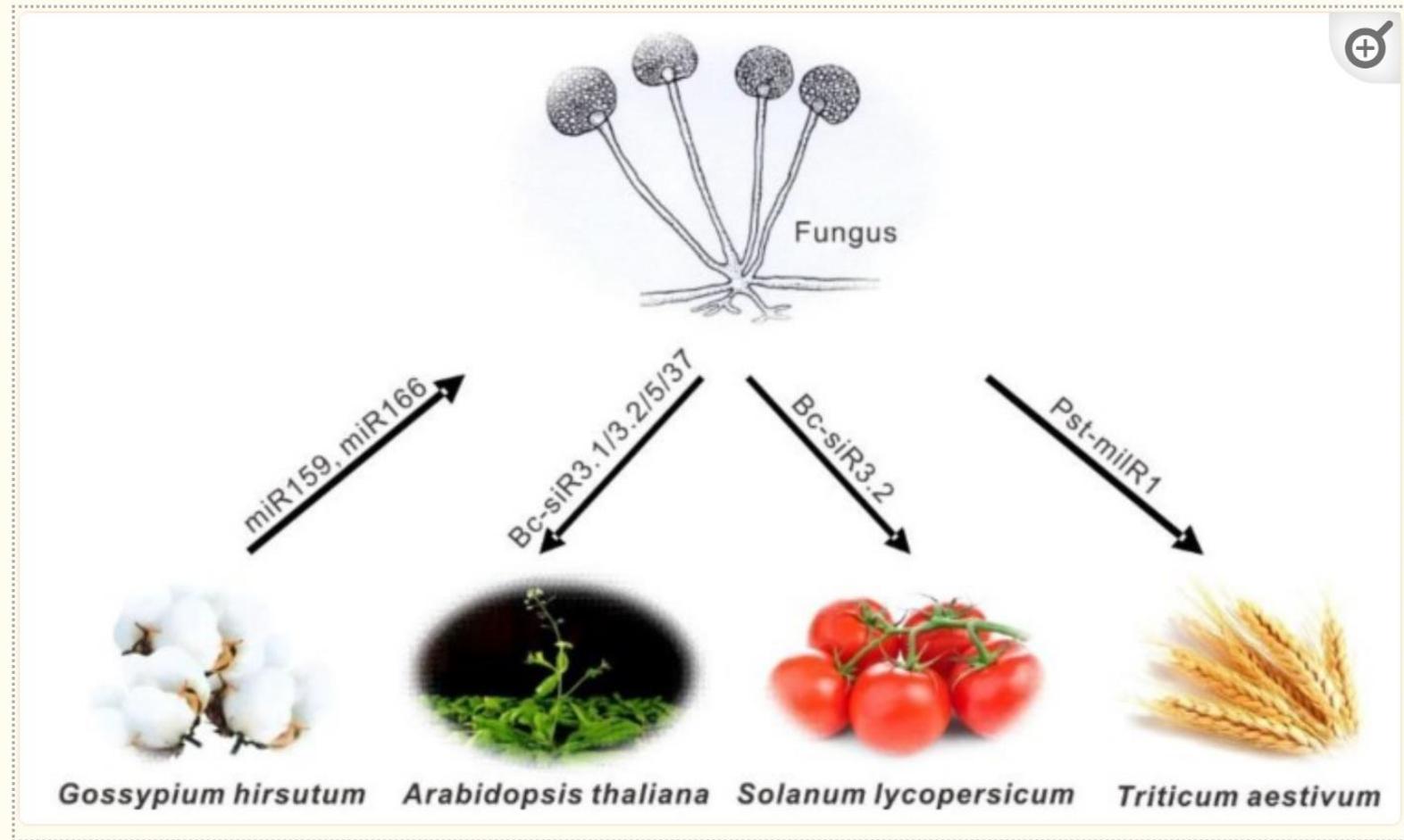
Fase II – Nella fase 2, il siRNA viene trasferito nel citoplasma dove viene reclutato dalla proteina Argonatura 4 (forse anche AGO6). Il complesso siRNA –AGO4 si trasferisce quindi nuovamente nel nucleo e prende di mira i trascritti generati sempre dalla RNA pol IV.

L'interazione è diretta ovvero i siRNA riconoscono e bersagliano le sequenze complementari prodotte dalla RNA pol IV. Il complesso RdDM contiene i seguenti componenti: AGO4, RNA Pol V, la de novo metiltransferasi DRM2. Questo è un enzima che diviene cataliticamente attiva quando si forma questo legame e in presenza di altre proteine (KTF1, RDM1, 2). DRM2 esegue la metilazione de novo delle citosine presenti nelle sequenze target rendendole quindi inattive.

IMP: Si pensa che questo meccanismo serva alle piante per stabilizzare i genomi e soprattutto per silenziare gli elementi trasponibili rendendoli inattivi. Nelle piante i trasposoni sono ampiamente diffusi e provocano ampie modificazione genomiche.

II CROSS-KINGDOM RNAi

I piccoli RNA possono agire non solo all'interno dello stesso organismo in organi differenti ma anche inviare segnali ad altre specie. La maggior parte delle scoperte si riferiscono a studi che riguardano meccanismi di simbiosi e parassitismo. Sembra ormai appurato che, sia l'ospite, sia l'invasore, utilizzino piccoli RNA per silenziare geni di difesa o di attacco.



[Figure 1](#)

Cross-kingdom small regulatory RNAs in plant-pathogen interactions. Transfer of representative sRNAs between fungal pathogens and host plant species are presented. The arrows indicate the direction of the sRNA transfer.

Il fenomeno dell'RNA trans KINGDOM è stato ampiamente studiato nelle piante anche per sfruttarlo in agricoltura e prevenire infezioni virali o da funghi.

E' stato scoperto che il meccanismo è bidirezionale e che i piccoli RNA vengono estrusi dalla cellula mediante la generazione di esosomi che vengono secreti nello spazio apoplastico e che possono essere assorbiti dal parassita.

[Cells](#). 2019 Apr; 8(4): 371.

Published online 2019 Apr 23. doi: [10.3390/cells8040371](https://doi.org/10.3390/cells8040371)

PMCID: PMC6523504

PMID: [31018602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31018602/)

Cross-Kingdom Small RNAs among Animals, Plants and Microbes

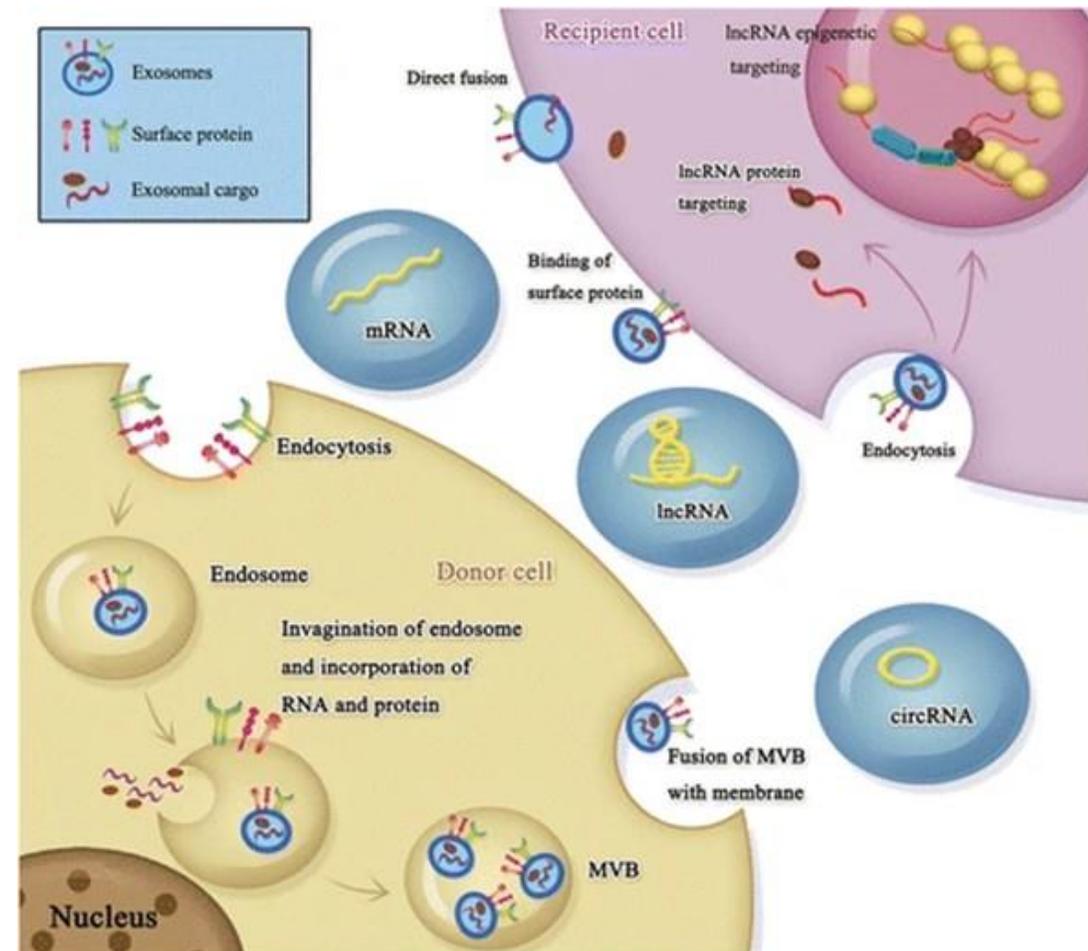
[Jun Zeng](#),^{1,2} [Vijai Kumar Gupta](#),³ [Yueming Jiang](#),^{4,5} [Bao Yang](#),^{4,5} [Liang Gong](#),^{4,5,*} and [Hong Zhu](#)^{1,5,*}

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ► [Disclaimer](#)

Abstract

[Go to:](#) ►

Small RNAs (sRNAs), a class of regulatory non-coding RNAs around 20~30-nt long, including small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs), are critical regulators of gene expression. Recently, accumulating evidence indicates that sRNAs can be transferred not only within cells and tissues of individual organisms, but also across different eukaryotic species, serving as a bond connecting the animal, plant, and microbial worlds. In this review, we summarize the results from recent studies on cross-kingdom sRNA communication. We not only review the horizontal transfer of sRNAs among animals, plants and microbes, but also discuss the mechanism of RNA interference (RNAi) signal transmission via cross-kingdom sRNAs. We also compare the advantages of host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS) technology and look forward to their applicable prospects in controlling fungal diseases.



Le ricerche bioinformatiche hanno permesso di identificare molti small RNA segnali che sono prodotti per esempio da funghi e che si dirigono verso i sistemi di difesa della pianta. Questo promuove quindi l'infezione del fungo.

Conoscere i meccanismi molecolari e le sequenze dei piccoli RNA attivi permetterebbe di generare altri RNA di contrasto!

Naturally occurring small RNAs and their target genes in cross-kingdom interactions.

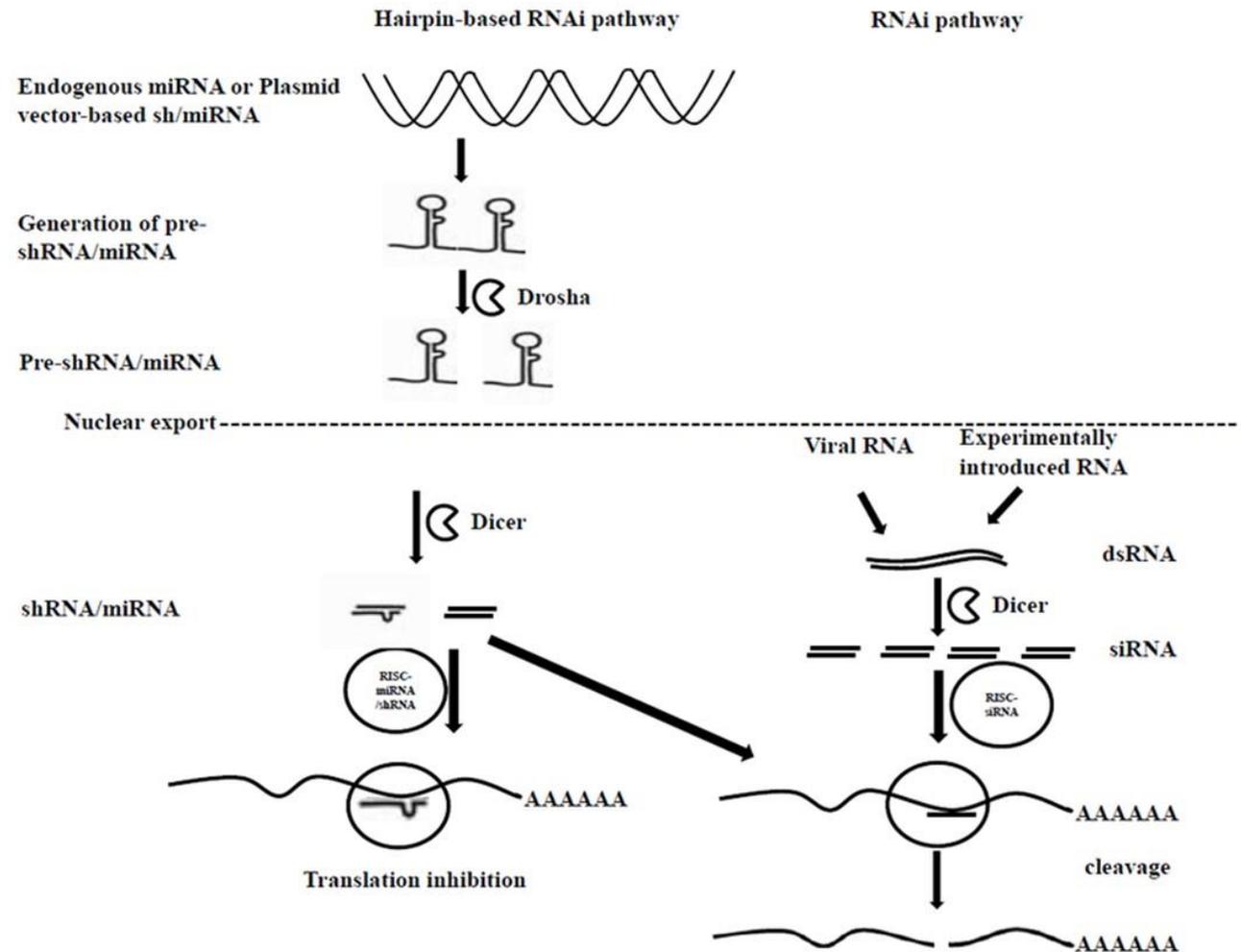
sRNA	From	To	Target Genes	Reference
miR-515-5p	<i>H. sapiens/M. musculus</i>	<i>F. nucleatum</i>	16S rRNA	[31]
miR-1226-5p	<i>H. sapiens/M. musculus</i>	<i>E. coli</i>	<i>yegH</i>	[31]
Bc-siR3.2	<i>B. cinerea</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>MPK2</i> and <i>MPK1</i>	[32]
Bc-siR3.1	<i>B. cinerea</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>PRXIIF</i>	[32]
Bc-siR5	<i>B. cinerea</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>WAK</i>	[32]
Bc-siR3.2	<i>B. cinerea</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>MAPKKK4</i>	[32]
Bc-siR37	<i>B. cinerea</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>WRKY7</i> , <i>PMR6</i> and <i>FEI2</i>	[35]
Pst-milR1	<i>P. striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>T. aestivum</i>	<i>PR2</i>	[43]
vsiR1378	GFkV	<i>V. vinifera</i>	S2P metalloprotease	[41]
vsiR6978	GRSPaV	<i>V. vinifera</i>	<i>VPS55</i>	[41]
miR166	<i>G. hirsutum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>Clp-1</i>	[12]
miR159	<i>G. hirsutum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>HiC-15</i>	[12]
miR2911	<i>L. japonica</i>	IAVs	<i>PB2</i> and <i>NS1</i>	[48]
miR162a	<i>B. campestris</i>	<i>A. mellifera</i>	<i>amTOR</i>	[57]
miR168a *	<i>O. sativa</i>	<i>H. sapiens/M. musculus</i>	LDLRAP1	[58]
miR159	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>TCF7</i>	[70]

Le metodiche di silenziamento genico nelle piante

Hairpin RNAi

Si tratta di un approccio che sfrutta DNA endogeno che viene inserito mediante un vettore nella pianta. Solitamente sono sequenze di 300-650 nt con sequenze ripetute ed invertite.

I trascritti formano dei dsRNA che si appaiano a causa dell'alto grado di ripetizioni. Si attiva quindi il processo degli RNAi con enzimi DICER ecc.



Questo approccio è molto più efficiente per silenziare dei geni e per eseguire dei controlli raffinati. Sebbene il sistema sia efficiente vi è un elevato grado di aspecificità in quanto le sequenze ripetute dei dsRNA potrebbero non essere così specifici per il gene target.

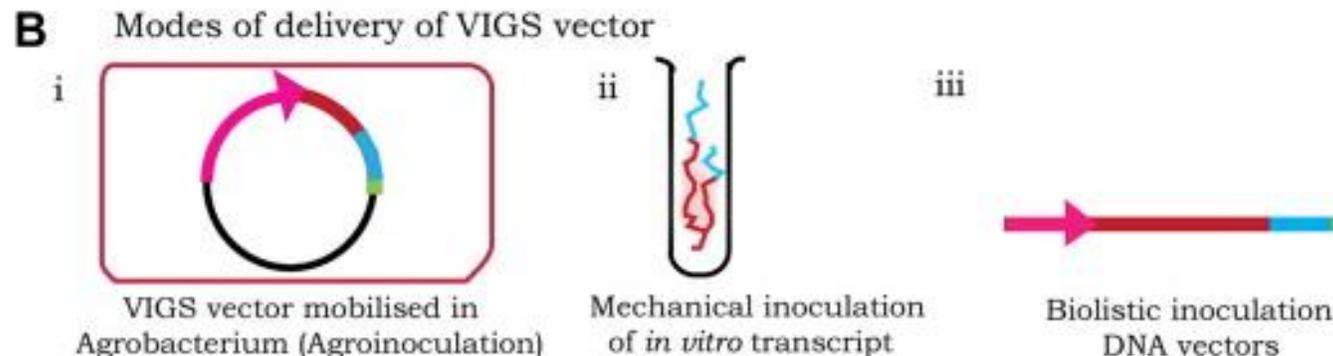
VIGS (Virus Induces Gene Silencing)

Meccanismo che sfrutta la capacità delle cellule vegetali di difendersi dai virus con un approccio di silenziamento genico.

Si utilizzano vettori plasmidici tipo i plasmidi Ti di *A. tumefaciens* in cui si inserisce una sequenza virale. Al centro di questa si genera una regione di clonaggio in cui è possibile inserire di volta in volta i geni che si vogliono silenziare.

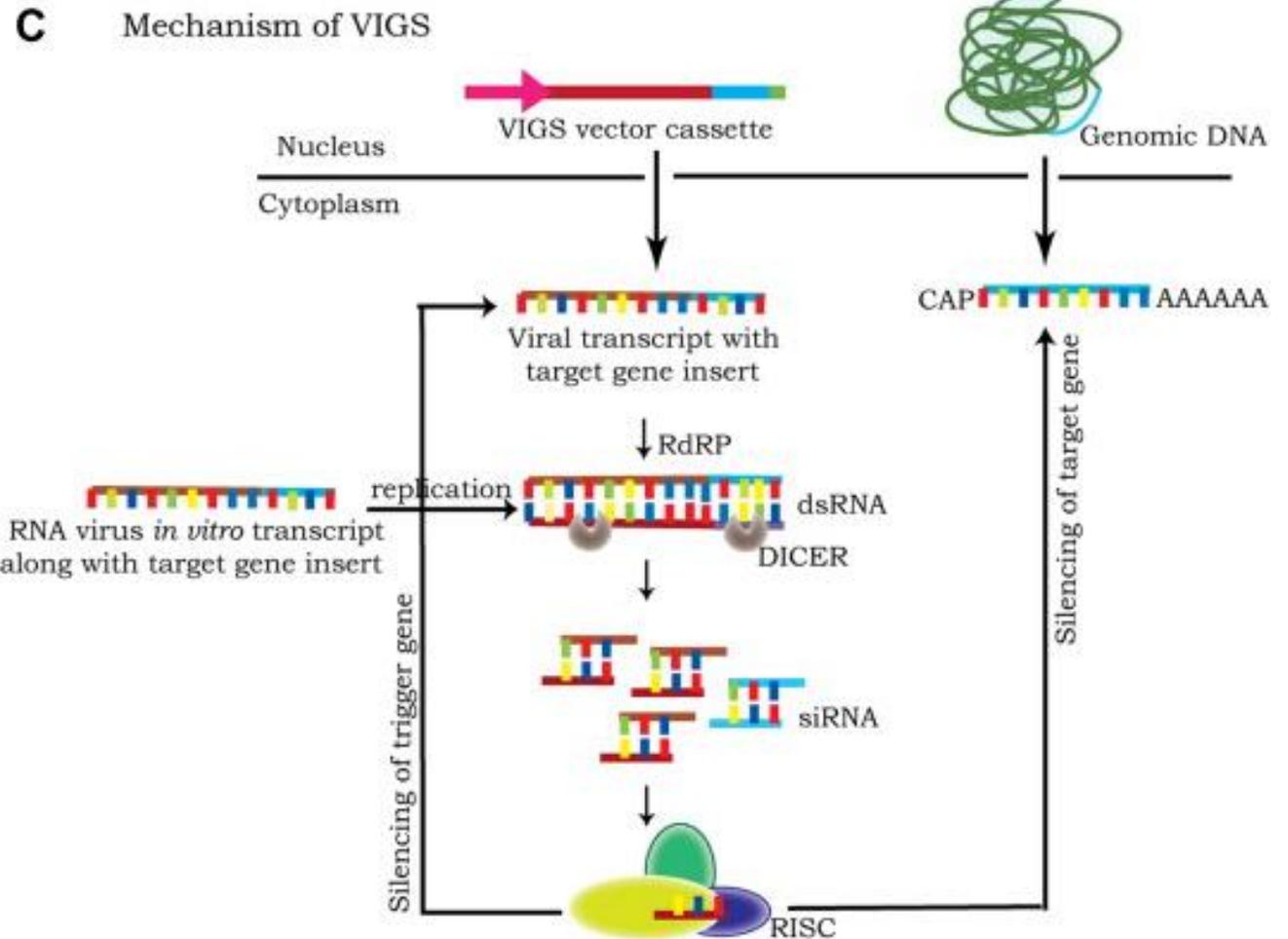


Il vettore viene quindi veicolato in cellula o mediante *A. tumefaciens* o anche sfruttando approcci biolistici a seconda delle caratteristiche e delle dimensioni.



In cellula la sequenza virale + inserto viene trascritta e si possono creare dei loop spontanei che formano doppi filamenti di RNA oppure si possono appaiare sequenze senso e antisenso dello stesso trascritto generando molecole a dsRNA.

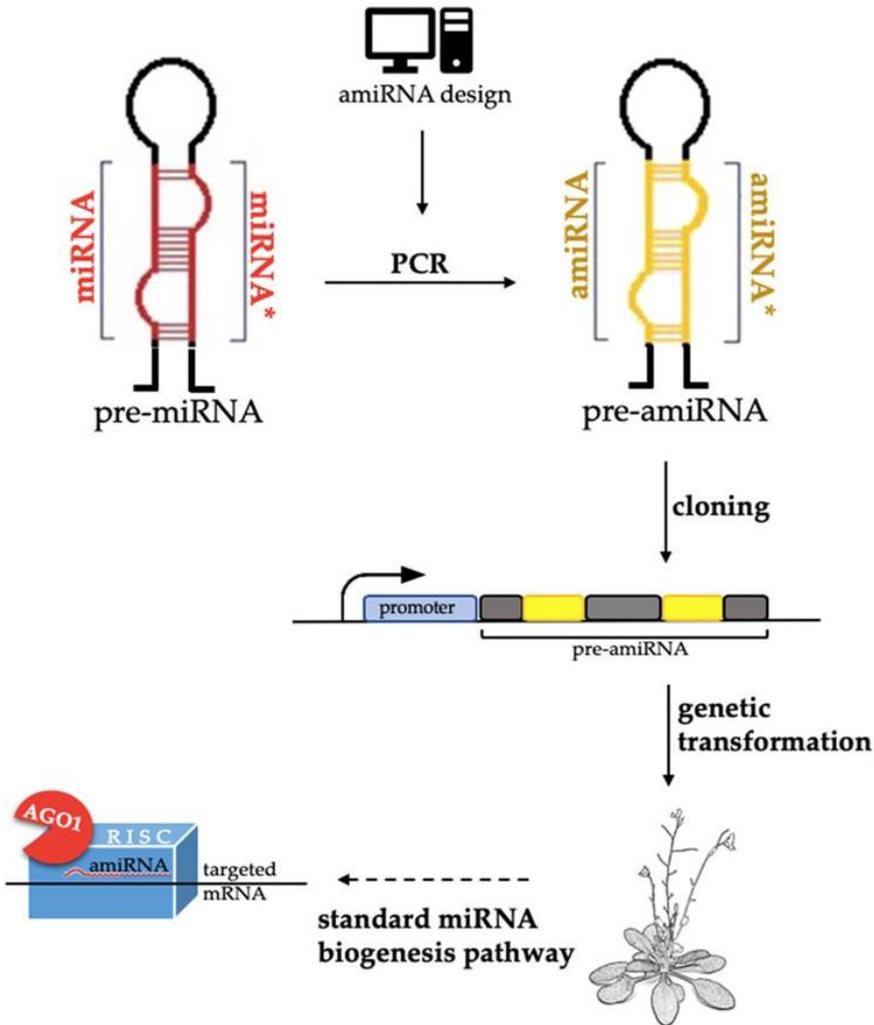
Interviene quindi DICER che produce siRNA di 21-24 nt che portano sia a degradare l'RNA virale introdotto sia le sequenze dei geni target che sono stati inseriti mediante il processo RISC.



I vantaggi di questo metodo sono l'ampia PROPAGAZIONE dei trascritti VIGS a cellule, tessuti e organi limitrofi ottenendo quindi un effetto amplificatore. Il sistema è inoltre rapido, molto efficiente in specie sensibili a *A. tumefaciens* ed in continua evoluzione.

microRNA artificiali

Gli amiRNA si generano grazie a trascritti di miRNA che vengono ingegnerizzati e nello specifico viene inserita una sequenza 'artificiale' nella parte centrale del gene che è quella che promuove il riconoscimento per il silenziamento.



Rispetto agli haipinRNA c'è molta specificità anche se al tempo stesso si ha solo un miRNA target e quindi se non dovesse essere così specifico e complementare non avremo un silenziamento genico efficiente.

L'efficacia di questo metodo è molto legata alla bioinformatica e alla conoscenza puntuale sia delle sequenze da silenziare sia delle loro isoforme.

E' fondamentale definire con cura la sequenza 'artificiale' da inserire per essere sicuri che sia da un lato specifica e dall'altro capace di agire anche su isoforme differenti.

Sistemi a confronto

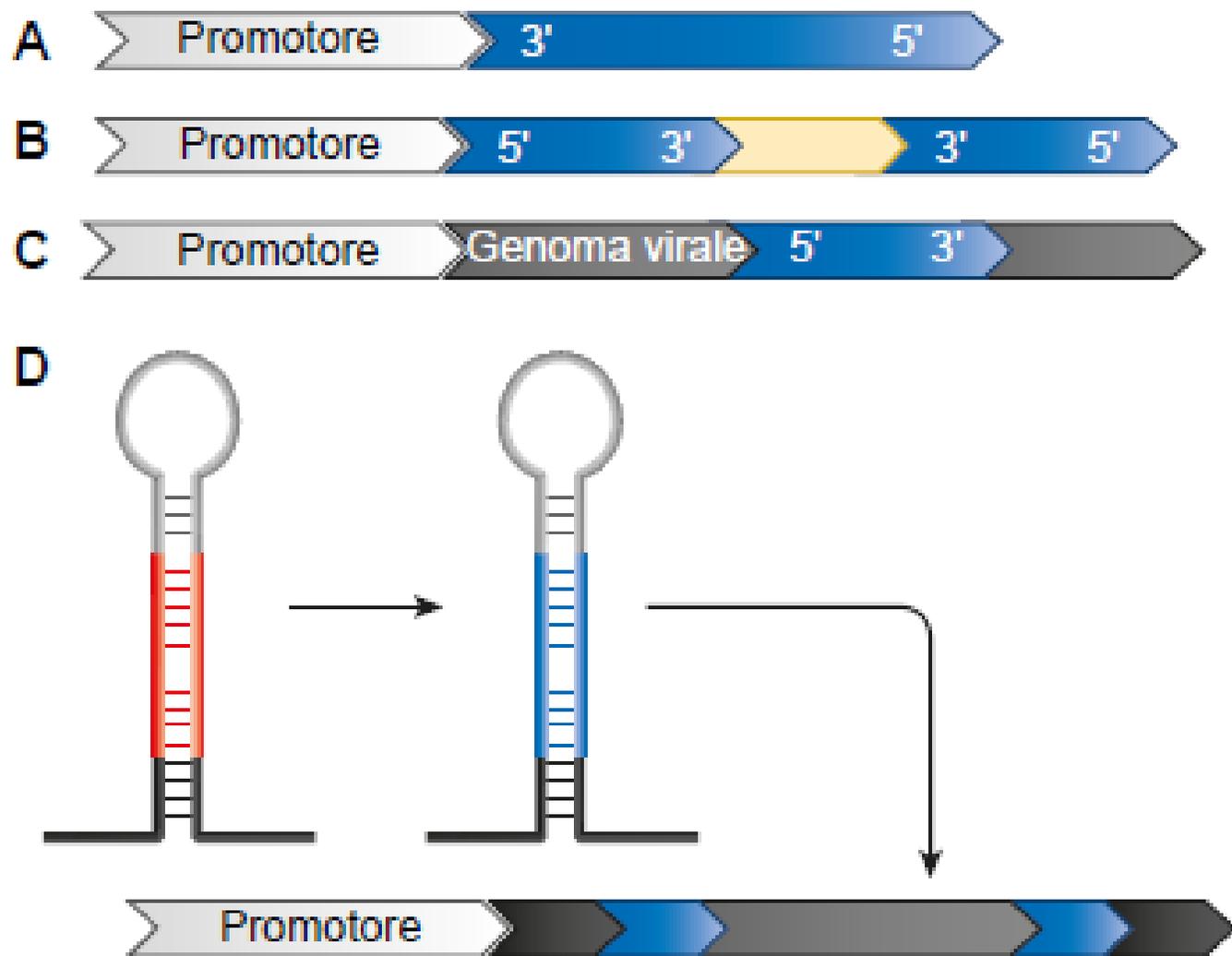


Figura 14.8. Tipi di costrutti per il silenziamento genico mediato dai piccoli RNA. **A.** RNA antisense: a valle del promotore (costitutivo o inducibile) è inserita la sequenza del gene di interesse nell'orientamento antisenso (3'-5'). **B.** *Hairpin* RNAi: una porzione del gene di interesse è clonata a valle del promotore nell'orientamento senso e antisenso separate da una sequenza spaziatrice (talvolta un introne) che genererà a livello del trascritto l'ansa terminale della forcina. **C.** VIGS (*virus-induced gene silencing*): la sequenza bersaglio è generalmente inserita in un vettore che contiene alcune porzioni di un genoma virale, qui indicato in grigio scuro. **D.** microRNA artificiali (amiRNA): la sequenza di un gene per un miRNA viene ingegnerizzata in laboratorio per sostituire la parte centrale (quella che in ultimo induce il silenziamento genico, qui indicata in rosso) con una sequenza del gene che si intende silenziare. In tutti gli schemi le sequenze del gene di interesse, oggetto di silenziamento, sono colorate in blu.



Article

Artificial microRNA-Based RNA Interference and Specific Gene Silencing for Developing Insect Resistance in *Solanum lycopersicum*

Mohammad Faisal ^{*}, Eslam M. Abdel-Salam and Abdulrahman A. Alatar

Department of Botany & Microbiology, College of Science, King Saud University, Riyadh 11451, Saudi Arabia; eabdelsalam@ksu.edu.sa (E.M.A.-S.); aalatar@ksu.edu.sa (A.A.A.)

* Correspondence: faisalm15@yahoo.com; Tel.: +966-(011)-4675877

Abstract: RNA Interference (RNAi), which works against invading nucleic acids or modulates the expression of endogenous genes, is a natural eukaryotic regulating system, and it works by noncoding smaller RNA molecules. Plant-mediated gene silencing through RNAi can be used to develop plants with insect tolerance at transcriptional or post-transcriptional levels. In this study, we selected *Myzus persicae*'s *acetylcholinesterase* 1 gene (*Ace 1*) as a silencing target to develop transgenic *Solanum lycopersicum* L. plants' resistance to aphids. An RNAi plasmid vector containing an artificial microRNA (amiRNA) sequence was engineered and successfully transformed into Jamila and Tomaland, two elite tomato cultivars. A northern blot analysis and PCR were carried out to check the efficacy of *Agrobacterium*-mediated transformation in T₀ transgenic plants. The quantitative PCR data showed a substantial downregulation of the *Ace 1* gene in aphids fed in clip cages on T₁ transgenic plants. Furthermore, there was a substantial drop in aphid colonies that were fed on T₁ transgenic plants of both the cultivars. These findings strongly suggest that transgenic plants that express amiRNA could be an important tool for engineering plants resistant to aphids and possibly for the prevention of viral disease in other plant-infested pests.



Citation: Faisal, M.; Abdel-Salam, E.M.; Alatar, A.A. Artificial microRNA-Based RNA Interference and Specific Gene Silencing for Developing Insect Resistance in *Solanum lycopersicum*. *agronomy* 2023, 13, 1234.

In questo studio i ricercatori prendono di mira l'acetilcolinesterasi nello specifico sono stati creati miRNA che prendono come bersaglio il gene *Ace1* dell'insetto. Questo silenziamento produrrà atrofia muscolare, paralisi e persino la morte dell'insetto.q22

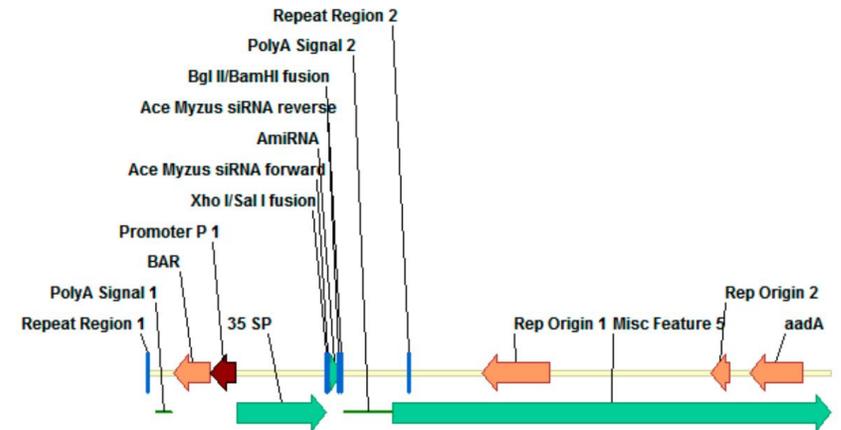


Figure 1. Schematic representation of the binary vector *pFGC5941* with amiRNA.

```
tcgacatgcgggcggttaaatcggtataggaagagtaaaagccattaaaggcaagttaagctcctgagatatgcaatcca  
tataaccaatccttttactttacaaggattaggcttatgggatccatagcttagcagcttttcttaccctgctcaactcatgcta  
tagccgattaaaccgcgcttccatcgctcagatcaagatc
```

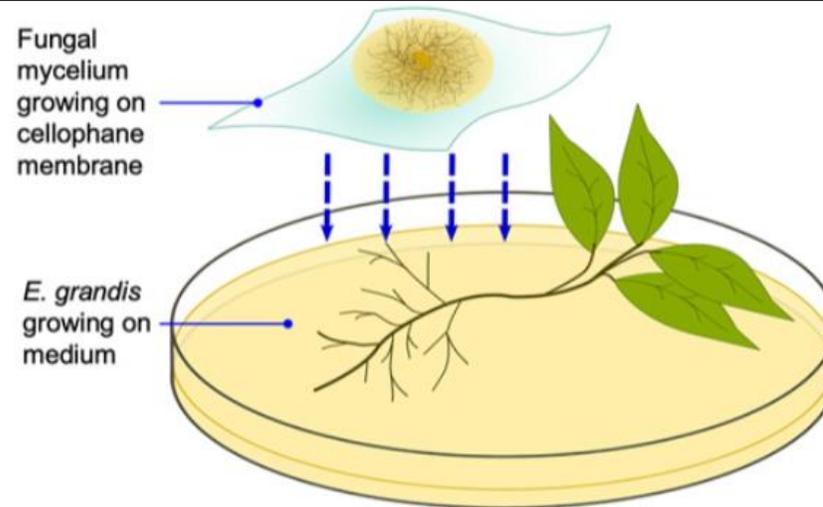
Figure 2. Nucleotide sequence of the artificial microRNA to an *Ace 1* gene sequence (highlighted in bold) from *M. persicae*, inserted in the binary vector.

The ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* encodes a microRNA involved in cross-kingdom gene silencing during symbiosis

Johanna Wong-Bajracharya^{a,b} , Vasanth R. Singan^c, Remo Monti^c, Krista L. Plett^{a,b}, Vivian Ng^c, Igor V. Grigoriev^{c,d} , Francis M. Martin^e, Ian C. Anderson^a, and Jonathan M. Plett^{a,1} 

Small RNAs (sRNAs) are known to regulate pathogenic plant-microbe interactions. Emerging evidence from the study of these model systems suggests that microRNAs (miRNAs) can be translocated between microbes and plants to facilitate symbiosis. The roles of sRNAs in mutualistic mycorrhizal fungal interactions, however, are largely unknown. In this study, we characterized miRNAs encoded by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* and investigated their expression during mutualistic interaction with *Eucalyptus grandis*. Using sRNA sequencing data and in situ miRNA detection, a novel fungal miRNA, *Pmic_miR-8*, was found to be transported into *E. grandis* roots after interaction with *P. microcarpus*. Further characterization experiments demonstrate that inhibition of *Pmic_miR-8* negatively impacts the maintenance of mycorrhizal roots in *E. grandis*, while supplementation of *Pmic_miR-8* led to deeper integration of the fungus into plant tissues. Target prediction and experimental testing suggest that *Pmic_miR-8* may target the host NB-ARC domain containing transcripts, suggesting a potential role for this miRNA in subverting host signaling to stabilize the symbiotic interaction. Altogether, we provide evidence of previously undescribed cross-kingdom sRNA transfer from ectomycorrhizal fungi to plant roots, shedding light onto the involvement of miRNAs during the developmental process of mutualistic symbioses.

In questo lavoro si analizza il processo di infezione partendo dalla co coltivazione del fungo con radici di Eucalipto. L'obiettivo è analizzare la presenza di miRNA nelle diverse fasi di sviluppo. Lo studio ha evidenziato diverse differenze (circa una decina di miRNA) differenziamene espressi a seconda della fase di infezione.



E' stato identificato un miRNA noto come Pmic_miR-8 che agisce durante le prime fasi di infezione creando stabilità e favorendo l'ingresso del fungo. E' stato ipotizzato che il fungo emetta delle vescicole contenute mRNA che vengono inglobate dalla pianta. La maturazione di questo miRNA avviene grazie alle proteine della cellula come Argonauta.

Questo lavoro conferma non solo la comunicazione tra organismi filogeneticamente distanti ma anche che le molecole segnale sono ubiquitari e i processi di maturazione sono condivisi e molto antichi

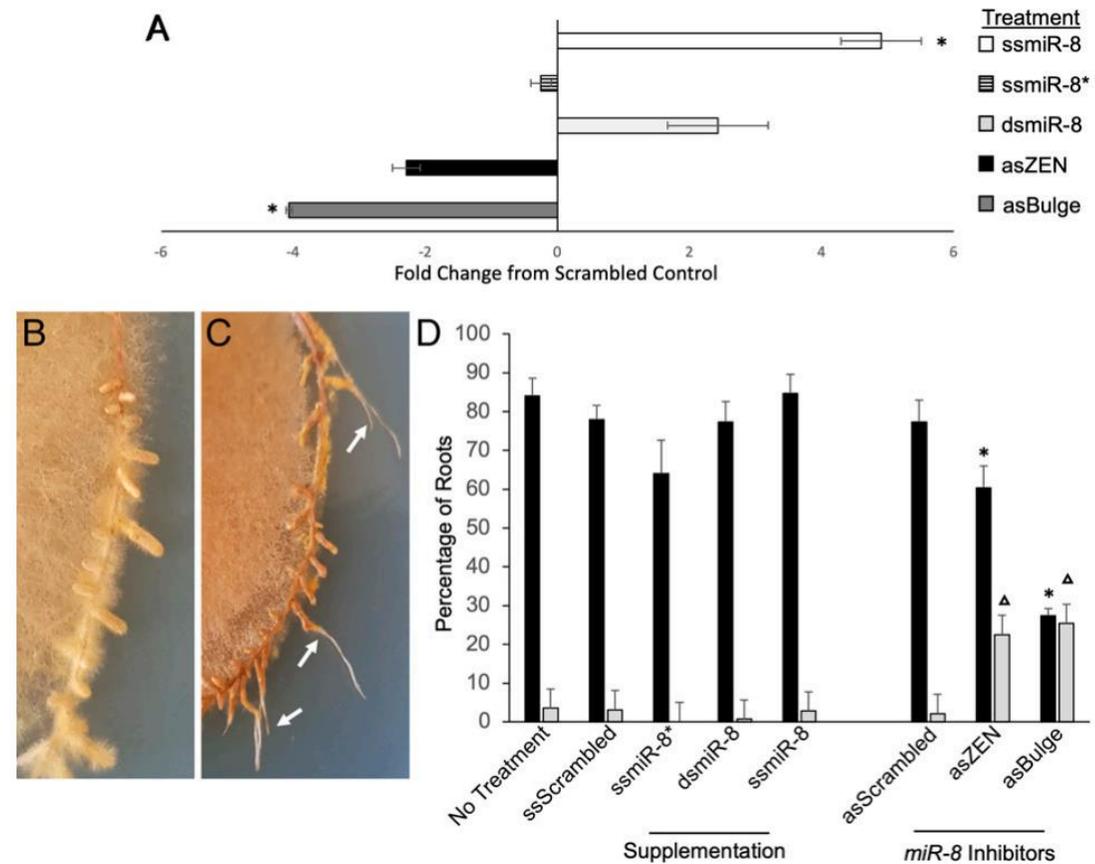


Fig. 2. Supplementation and inhibition of *P. microcarpus* miR-8 alters colonization of *E. grandis* roots. (A) Relative *Pmic_miR-8* levels in *E. grandis* mycorrhizal root tips treated with either mature, single-stranded *Pmic_miR-8* (white bar), mature as *Pmic_miR-8** (striped bar), or ds *Pmic_miR-8* (light gray bar), as compared to treatment with a scrambled miRNA. We also tested *E. grandis* mycorrhizal root tips treated with either a single-stranded ZEN-tagged as *Pmic_miR-8* inhibitor (i.e., repression; black bar) or a single-stranded as *Pmic_miR-8* with designed bulge mismatch at nucleotides 10 to 11 (dark gray bar), as compared to a scrambled inhibitor sequence. All values are the result of three biological replicates, \pm SE; * indicates significant difference from scrambled control ($P < 0.05$; Student's *t* test). (B) Representative image of *P. microcarpus* mycorrhizal root tips on *E. grandis* showing a typical mycorrhizal phenotype. (C) Representative image of *P. microcarpus* mycorrhizal root tips on *E. grandis* treated with the *Pmic_miR-8* inhibitor in the final week of fungal colonization. White arrows indicate mycorrhizal root tips that have senesced, and the root has recommenced growth. (D) Percent of *E. grandis* root tips in contact with *P. microcarpus* that are either colonized by the fungus (black bars) or that exhibit the beginning of colonization followed by senescence (light gray bars). Values are shown for either no spray treatment (No Treatment) or spray treated with scrambled miRNA (ssScrambled); as single-stranded, mature *Pmic_miR-8* (ssmiR-8*); sense ds, mature *Pmic_miR-8* (dsmiR-8); sense single-stranded, mature *Pmic_miR-8* (ssmiR-8); scrambled as inhibitor (asScrambled); single-stranded, ZEN-tagged as *Pmic_miR-8* inhibitor (asZEN); and single-stranded as *Pmic_miR-8* with designed bulge mismatch at nucleotides 10 to 11 (asBulge). All values are based on six biological replicates, \pm SE; */ Δ indicates significant difference from scrambled control ($P < 0.05$; Student's *t* test).

Studiare i miRNA permette lo sviluppo di terapie geniche

Review

miRNA Mediated Regulation and Interaction between Plants and Pathogens

Xiaoqian Yang^{1,2,3}, Lichun Zhang^{1,2,3}, Yuzhang Yang^{1,2,3}, Markus Schmid^{1,4}  and Yanwei Wang^{1,2,3,*}

¹ Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; xiaoqianyang51@163.com (X.Y.); lc Zhang@bjfu.edu.cn (L.Z.); yuzhangyang0@163.com (Y.Y.); markus.schmid@umu.se (M.S.)

² National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

³ College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

⁴ Umeå Plant Science Centre, Department of Plant Physiology, Umeå University, SE-901 87 Umeå, Sweden

* Correspondence: ywwang@bjfu.edu.cn; Tel.: +86-010-62338105

Abstract: Plants have evolved diverse molecular mechanisms that enable them to respond to a wide range of pathogens. It has become clear that microRNAs, a class of short single-stranded RNA molecules that regulate gene expression at the transcriptional or post-translational level, play a crucial role in coordinating plant-pathogen interactions. Specifically, miRNAs have been shown to be involved in the regulation of phytohormone signals, reactive oxygen species, and *NBS-LRR* gene expression, thereby modulating the arms race between hosts and pathogens. Adding another level of complexity, it has recently been shown that specific lncRNAs (ceRNAs) can act as decoys that interact with and modulate the activity of miRNAs. Here we review recent findings regarding the roles of miRNA in plant defense, with a focus on the regulatory modes of miRNAs and their possible applications in breeding pathogen-resistance plants including crops and trees. Special emphasis is placed on discussing the role of miRNA in the arms race between hosts and pathogens, and the interaction between disease-related miRNAs and lncRNAs.

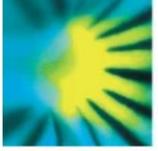


Citation: Yang, X.; Zhang, L.; Yang,

Le piante rispondono all'invasione di patogeni sia con un'immunità rivolta verso il patogeno (pathogen-associated molecular pattern PAMP) oppure con una risposta che agisce sugli effetti prodotti dall'attacco stesso (effector triggered immunity ETI) [17,18]. Le varie proteine vegetali che si attivano per la difesa sono codificata da vari geni classificati come R. Questi geni riconoscono questi effettori di virulenza e innescare vari tipi di risposta inclusa ma morte per apoptosi.

E' sempre più evidente che l'attivazione di questi geni e i meccanismi di risposta coinvolgano diversi miRNA che sono sia rivolti verso sequenze e proteine dell'ospite, sia nei confronti del genoma vegetale per attivare macro-risposte complesse.

I super miRNA



New Phytologist

Research review | [Full Access](#)

MicroRNA482/2118, a miRNA superfamily essential for both disease resistance and plant development

Summary

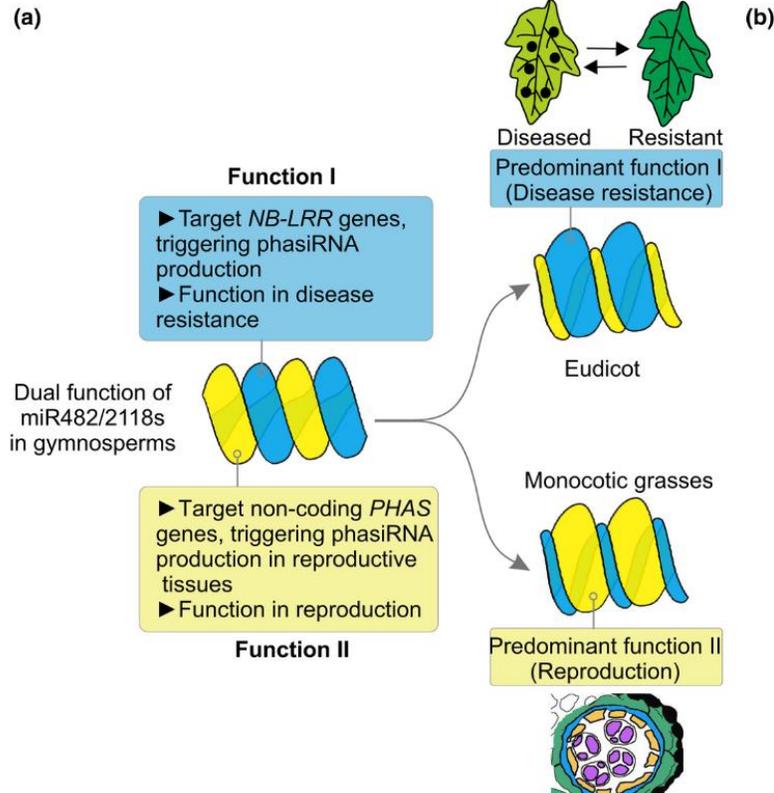
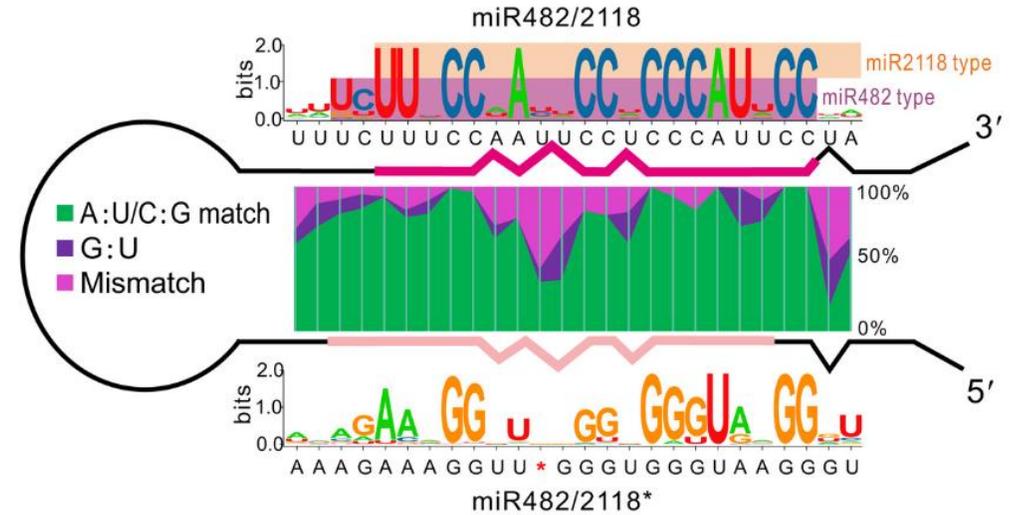
MicroRNAs (miRNAs) are a class of 21–24 nucleotides (nt) noncoding small RNAs ubiquitously distributed across the plant kingdom. miR482/2118, one of the conserved miRNA superfamilies originating from gymnosperms, has divergent main functions in core-angiosperms. It mainly regulates *NUCLEOTIDE BINDING SITE-LEUCINE-RICH REPEAT (NBS-LRR)* genes in eudicots, functioning as an essential component in plant disease resistance; in contrast, it predominantly targets numerous long noncoding RNAs (lncRNAs) in monocot grasses, which are vital for plant reproduction. Usually, miR482/2118 is 22-nt in length, which can trigger the production of phased small interfering RNAs (phasiRNAs) after directed cleavage. PhasiRNAs instigated from target genes of miR482/2118 enhance their roles in corresponding biological processes by *cis*-regulation on cognate genes and expands their function to other pathways via *trans* activity on different genes. This review summarizes the origin, biogenesis, conservation, and evolutionary characteristics of the miR482/2118 superfamily and delineates its diverse functions in disease resistance, plant development, stress responses, etc.

miR482/2118 è una superfamiglia di miRNA costituita da due miRNA fondatori: miR482 e miR2118. Il primo miR482 è stato identificato in *Populus trichocarpa* (Lu et al., 2005), mentre miR2118 è stato individuato nei tessuti riproduttivi di riso e mais (Nobuta et al., 2008; Johnson et al., 2009) . Inizialmente, si pensava che questi miRNA fossero completamente distinti ma successivamente vennero combinati in una superfamiglia a causa di

- **Alta similarità di sequenza;**
- **Ubiquitari nella piante da seme**
- **Agiscono su vari processi biologici, come la resistenza alle malattie e lo sviluppo delle piante**

Similarità e divergenze

Analisi di allineamento della sequenza delle varie isoforme miR482/2118 ha evidenziato che il "tipo miR482" inizia spesso con "UC«. Il "tipo miR2118" ha tipicamente uno shift di 2 nt rispetto al 482. A causa di questo spostamento, questi miRNA da 22 nt hanno una conservazione della sequenza della regione sovrapposta di 20 nt



C'è un ipotesi molto interessante che spiega l'origine di questa superfamiglia. E' probabile che si sia originata nell'antenato comune tra tutte le piante a semi. I target di questi miRNA sarebbero sia i geni di infezione, sia quelli legati allo sviluppo e riproduzione della pianta. Queste funzioni oggi sarebbero mantenute nelle gimnosperme mentre nella angiosperme ci sarebbe stata una certa specializzazione come da schema affianco. ;

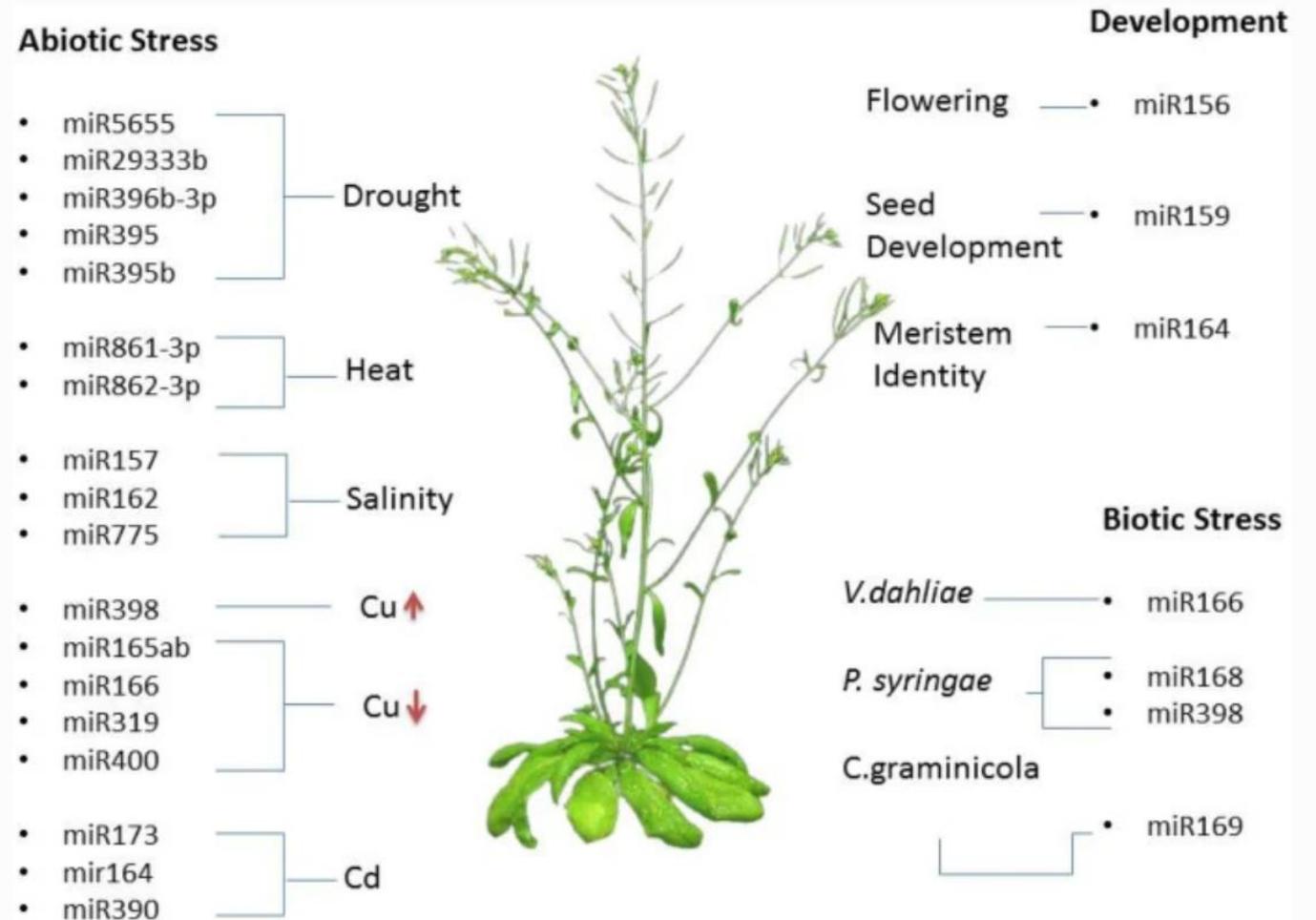
Pronti ad usare i miRNA in plant biotechnology

Sebbene le tecnologie di trasferimento e le conoscenze bioinformatiche siano sufficienti per poter sfruttare i sistemi di silenziamento nelle specie di interesse agricolo si sottolinea che

1- Molte conoscenze disponibili sulle specie modello devono essere testate su specie agronomiche. I miRNA possono essere molto specifici e NON funzionare anche solo per 1-2 basi differenti

2- Il trasferimento dei miRNA è comunque considerata una modificazione genetica e sottostà alle leggi in vigore per gli OGM. Vi sono pressioni per modifiche in diversi Paesi anche se l'Europa per ora rimane restrittiva.

Fig. 2



Overview of miRNAs involved in *A. thaliana* biotic, abiotic stress and development [[122](#),[123](#),[124](#),[125](#)].

(Color figure online)