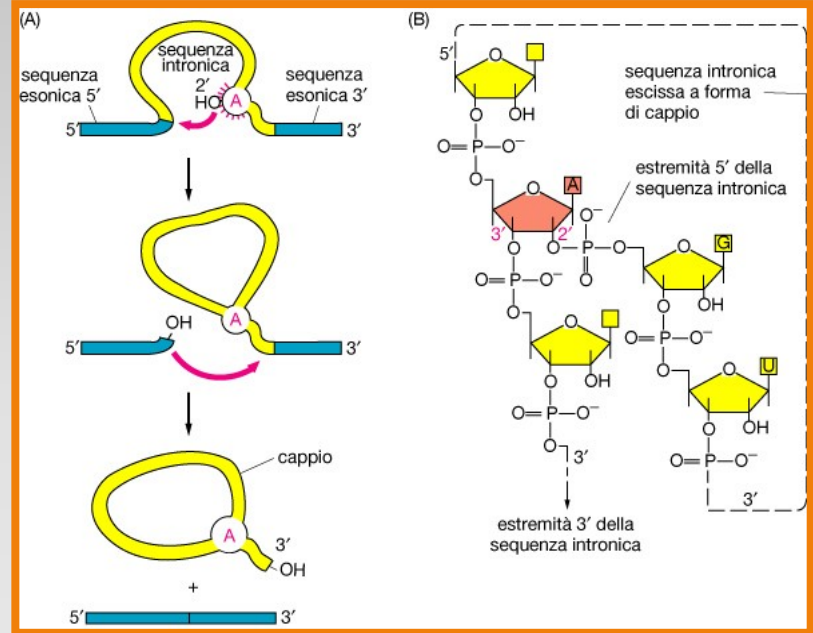
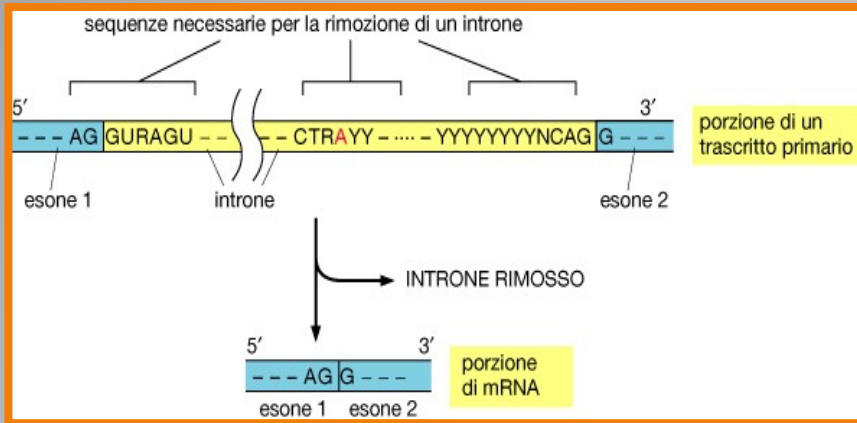


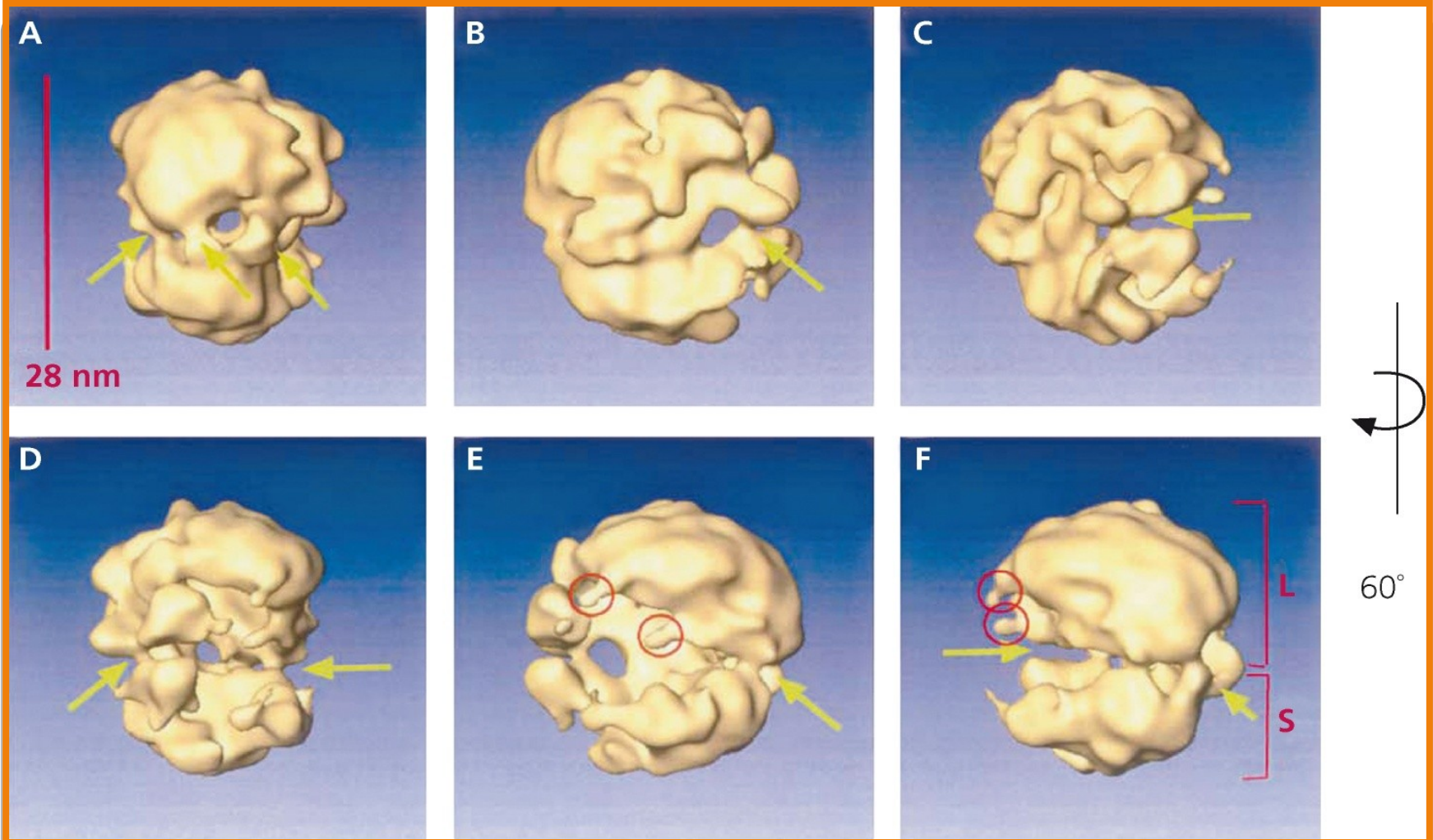
Modificazioni post-trascrizionali dell'RNA

- La rimozione degli introni e la successiva unione degli esoni devono essere estremamente accurate per gli mRNA.
- Sequenze "targets" per lo splicing degli introni:
 - ✓ All'estremità **5'** dell'introne il dinucleotide **GU (sito donatore)**;
 - ✓ All'estremità **3'** dell'introne il dinucleotide **AG (sito accettore)**;
 - ✓ Regione ricca di pirimidine (Py) vicino all'estremità 3' dell'introne;
 - ✓ Presenza di un nucleotide adenilico in prossimità dell'estremità 3' dell'introne (**sito di ramificazione**).

Splicing e splicing alternativo

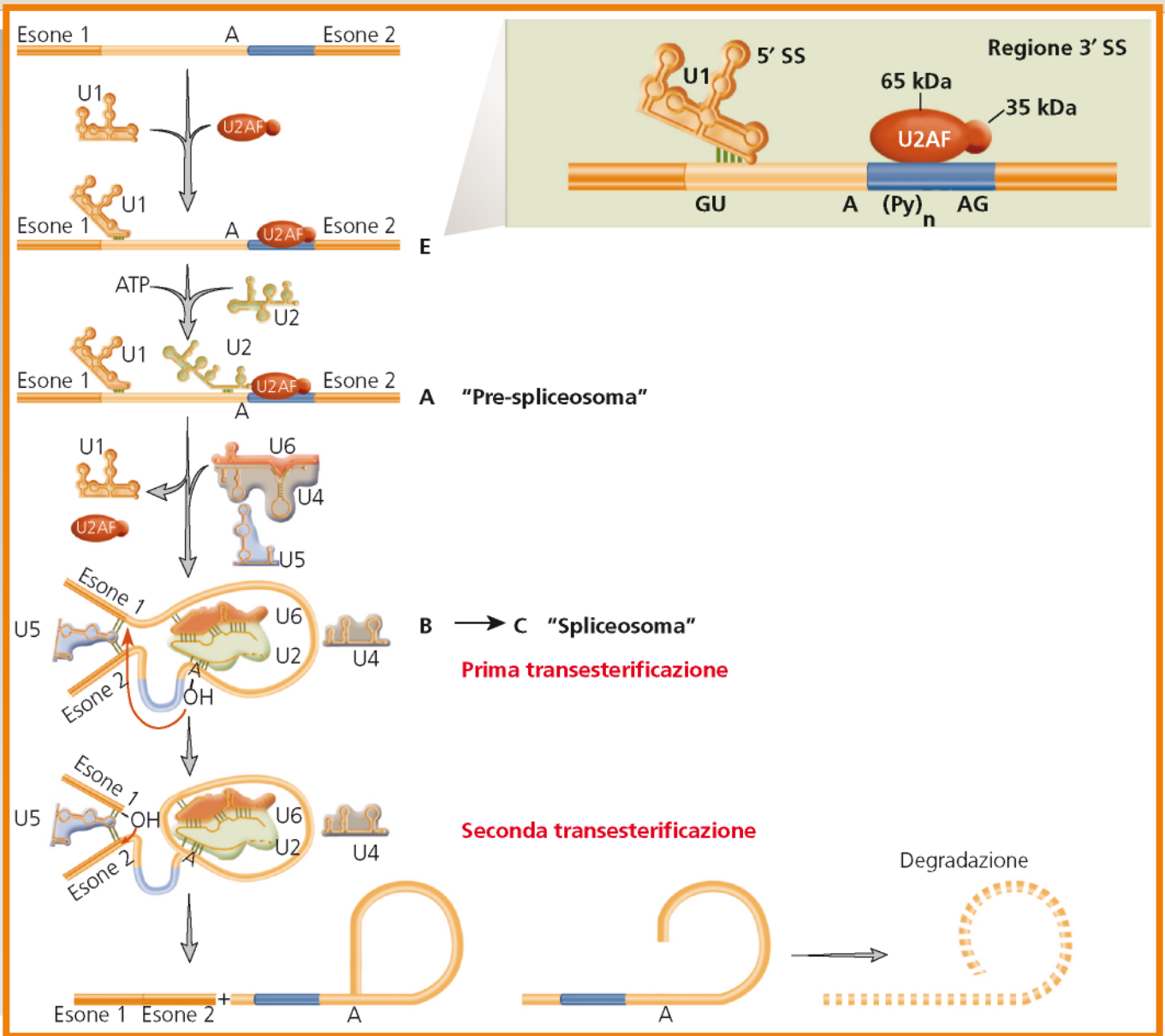


Splicing e splicing alternativo



Struttura dello spliceosoma

Via di splicing del pre-mRNA nucleare



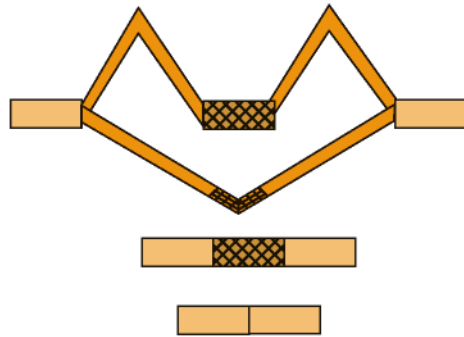
- Un tipico gene umano consiste di 8-10 esoni, che possono essere uniti in disposizioni diverse mediante splicing alternativo.
- Almeno il 60-70% dei geni umani è sottoposto a splicing alternativo.
- Studi recenti hanno dimostrato che oltre il 90% dei geni umani è sottoposto a splicing alternativo.
- Lo splicing alternativo rappresenta un mezzo versatile per regolare l'espressione genica.

Lo splicing alternativo

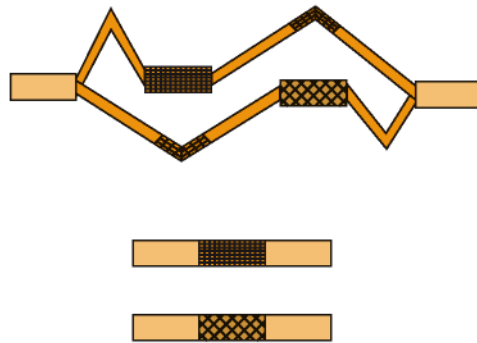
- Lo splicing della maggior parte degli esoni è costitutivo.
- Possibili eventi elementari che concorrono alla generazione di più trascritti a partire da un unico gene:
 - ✓ Esoni cassetta (A) ed esoni mutuamente esclusivi (B);
 - ✓ Ritenzione di introni (E);
 - ✓ Siti di splicing alternativi al 5' o al 3' (C);
 - ✓ Siti alternativi di poliadenilazione (D).

Lo splicing alternativo

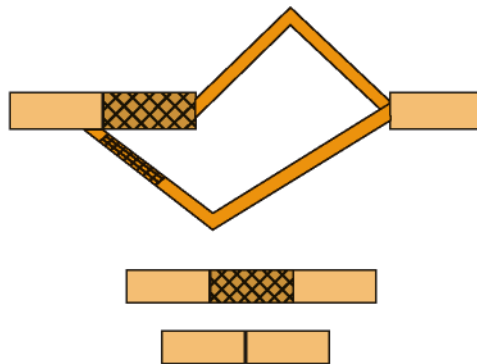
(A)



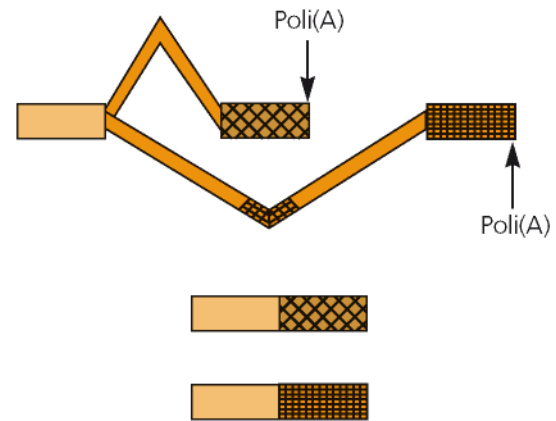
(B)



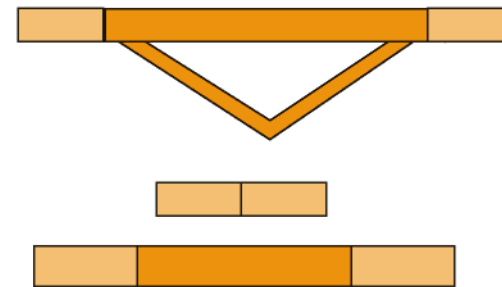
(C)



(D)



(E)



(F)



- Alcuni pre-mrNA hanno spesso posizioni multiple di splicing alternativo (F), che danno origine da un singolo gene ad una famiglia di proteine correlate.
- Tuttavia ~ 20% della variabilità dell'mRNA che deriva dallo splicing alternativo si trova in regioni non tradotte. Queste regioni, 5' o 3', contengono elementi che regolano la traduzione, la stabilità o la localizzazione dell'mRNA.
- Un terzo degli eventi di splicing alternativo inserisce codoni di terminazione prematura nel trascritto (codoni di stop) ⇒ degradazione dell'mRNA mediata da nonsense.

Lo splicing alternativo

- Lo splicing alternativo è importante in molti processi cellulari e di sviluppo:
 - ✓ determinazione del sesso;
 - ✓ apoptosi;
 - ✓ guida degli assoni;
 - ✓ eccitazione e contrazione cellulare.
- Errori nella regolazione dello splicing sono stati implicati in numerose malattie [es. β -talassemia (anemia mediterranea); disautonomia familiare (disordine del sistema nervoso sensoriale ed autonomo) (salto dell'esone 20 del gene IKBKAP)].

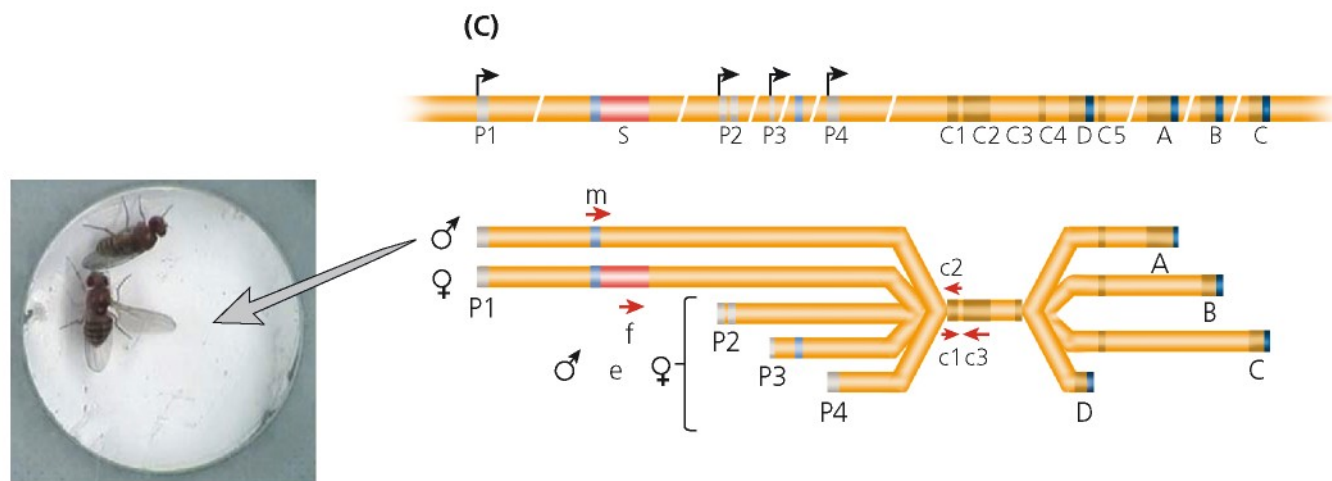
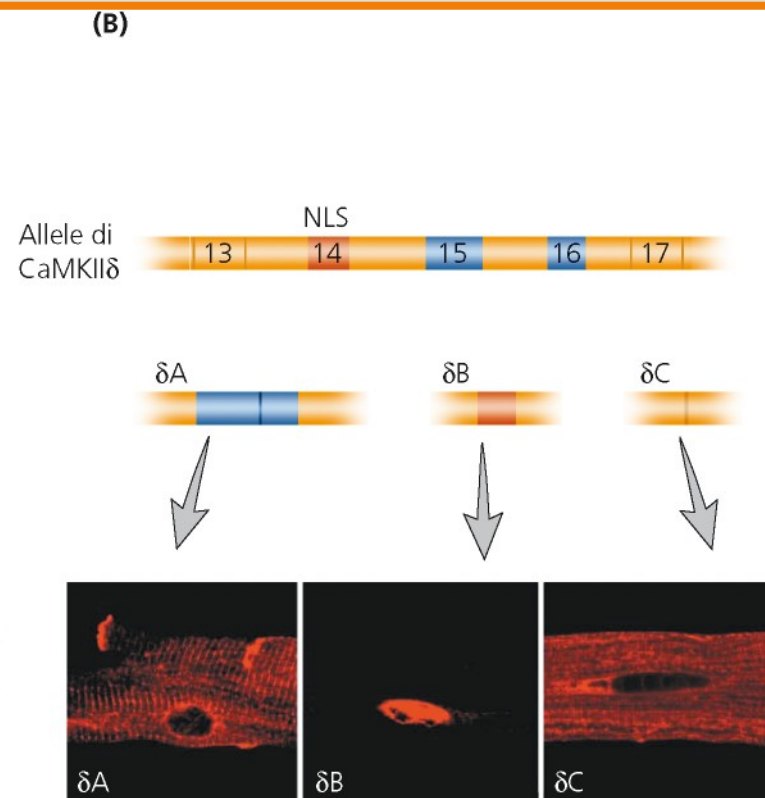
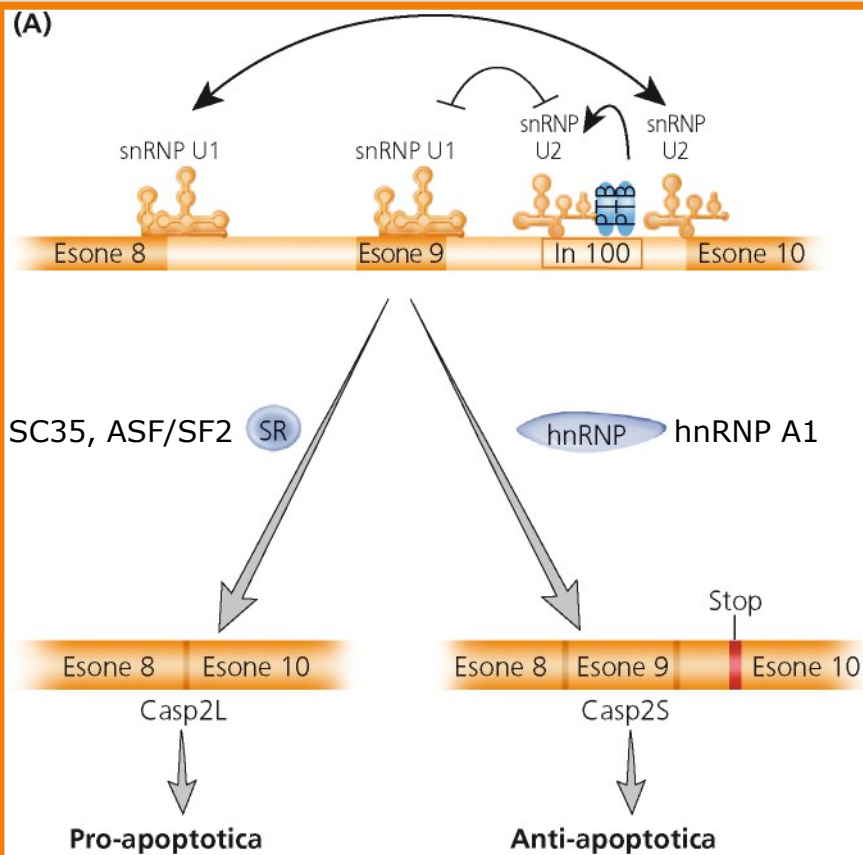
Lo splicing alternativo

- Negli esoni e negli introni dei pre-mRNA esistono elementi regolatori *cis*-agenti. A questi elementi si legano proteine *trans*-agenti che regolano lo splicing.
- Gli elementi regolatori *cis*-agenti agiscono stimolando o inibendo lo splicing:
 - ✓ enhanser di splicing degli esoni (ESE);
 - ✓ silenziatori di splicing degli esoni (ESS).
- I cambiamenti nella selezione del sito di splicing derivano da cambiamenti nel legame dei fattori iniziali al pre-mRNA e nell'assemblaggio dello spliceosoma.

Regolazione dello splicing alternativo

- Splicing alternativo dell'mRNA della caspasi 2:
- ✓ lo splicing alternativo porta ad un mRNA che contiene l'esone 9 che ha un codone di stop ⇒ isoforma corta della caspasi 2 (anti-apoptotica);
- ✓ il salto dell'esone 9 porta alla produzione dell'isoforma lunga della caspasi 2 (pro-apoptotica).
- Splicing alternativo della chinasi II δ dipendente da Ca^{2+} /calmodulina (ruolo cruciale nello sviluppo cardiaco dei mammiferi: tra 1 e 2 mesi di età CaMKII δ subisce una transizione di splicing alternativo).

Esempi di splicing alternativo



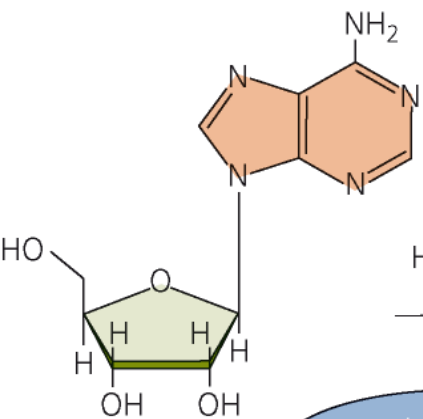
- ❑ L'editing dell'RNA è un processo post-trascrizionale utilizzato per modificare l'informazione genetica presente nel DNA e quindi generare molecole di RNA che differiscono dal loro stampo di DNA in una o più posizioni.
- ❑ Due diversi meccanismi:
 - ✓ la **conversione** di una base in un'altra;
 - ✓ l'inserzione o la delezione di nucleotidi.
- ❑ Effetti dell'editing:
 - ✓ sostituzione di un amminoacido in una proteina;
 - ✓ creazione/eliminazione di codoni d'inizio e di stop;
 - ✓ creazione di intere ORF.

Editing dell'RNA

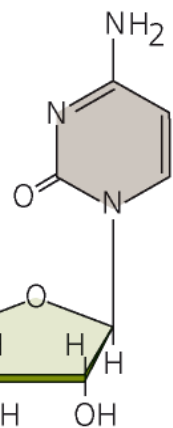
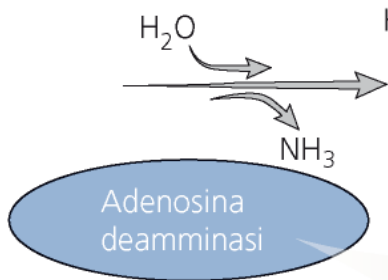
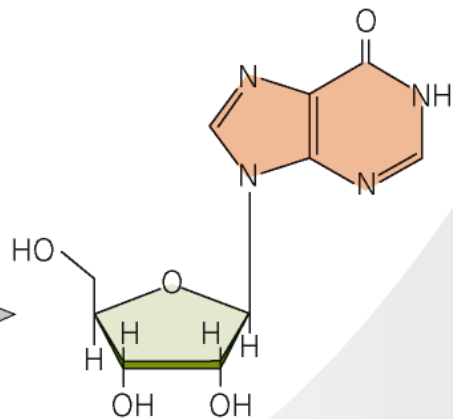
- ❑ Due classi principali di enzimi per l'editing: (1) adenosina deaminasi (ADA)(A → I) e (2) citidina deaminasi (C → U).
- ❑ Editing A → I è molto frequente ed interessa più di 1600 geni. E' catalizzato da una ADA specifica per l'RNA a doppio filamento (ADAR).
- ❑ In alcuni casi l'editing A → I cambia un amminoacido nella proteina tradotta, ma frequentemente gli eventi di editing si verificano all'interno di introni e di regioni non tradotte. La maggior parte dei siti di editing si trova negli elementi *Alu* (sequenze AGCT) (SINE) all'interno di regioni non tradotte.

Editing dell'RNA nei mammiferi

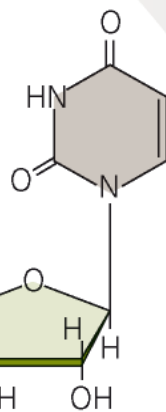
Adenosina



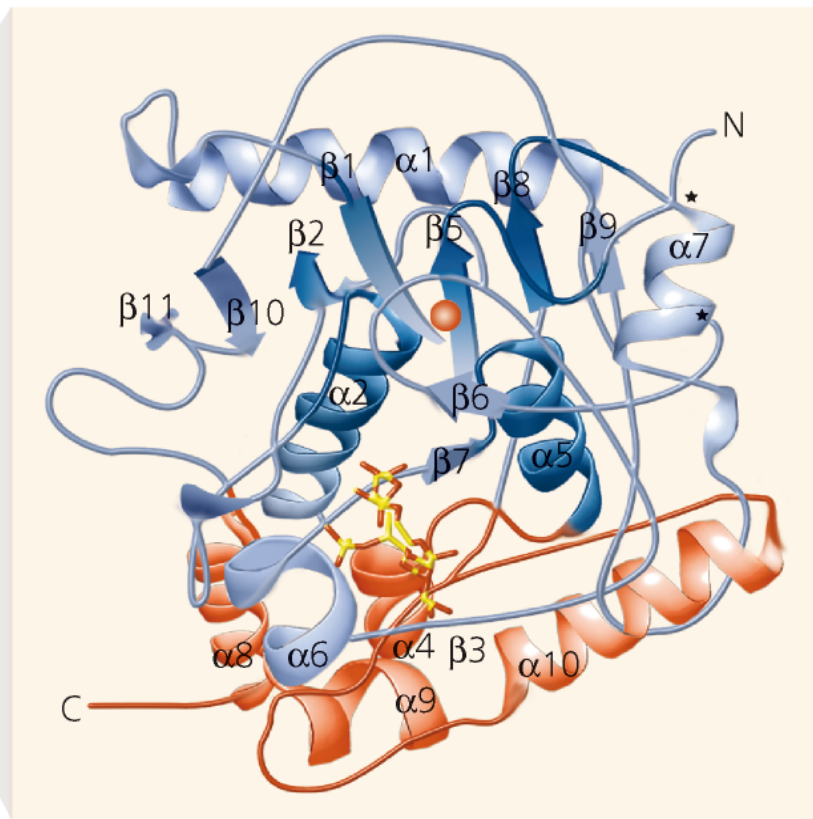
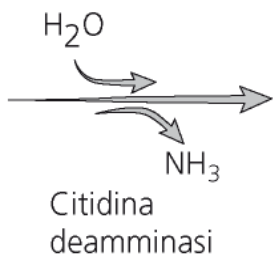
Inosina



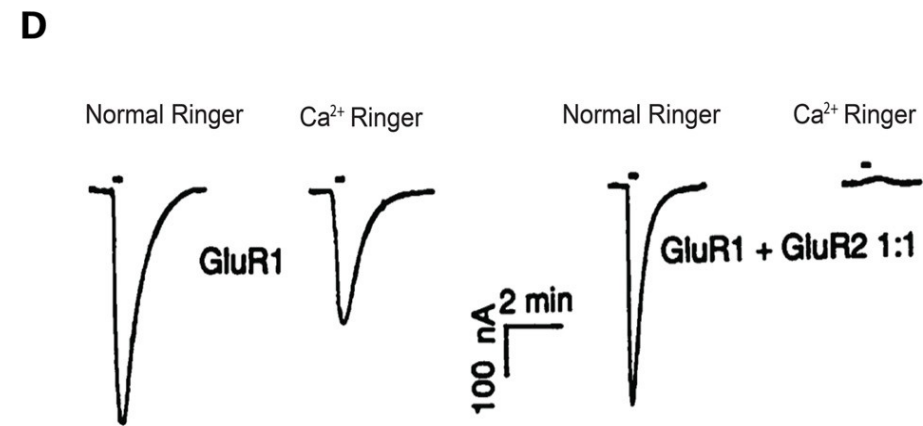
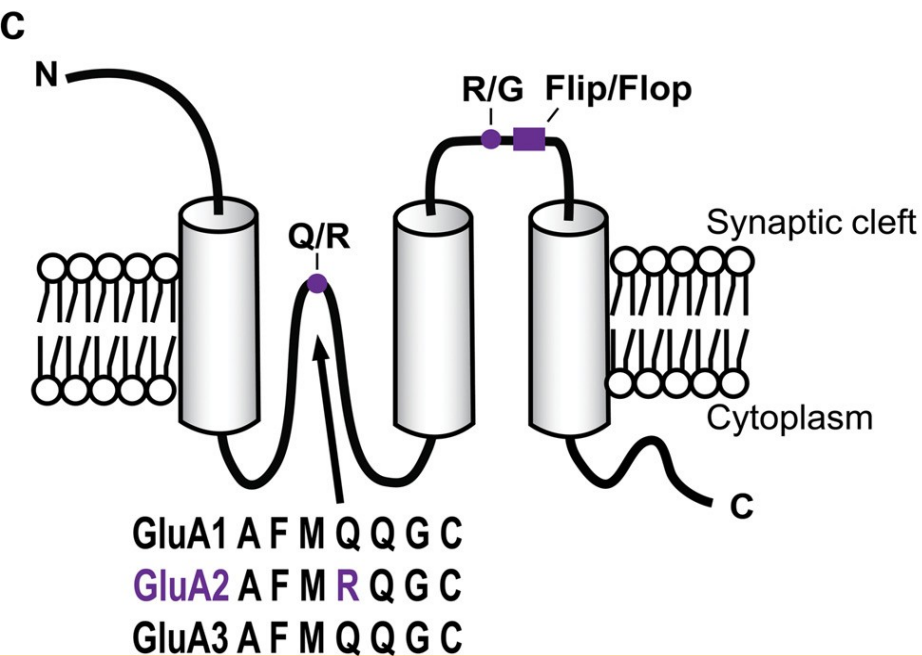
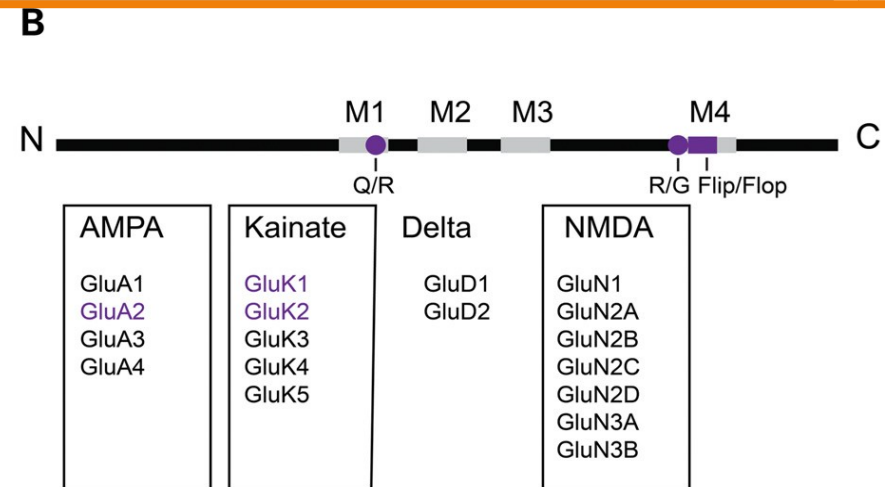
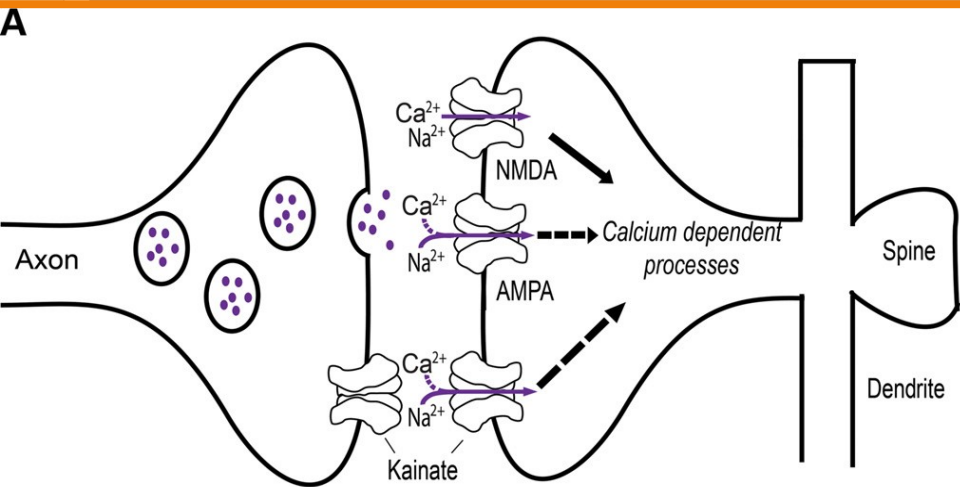
Citidina



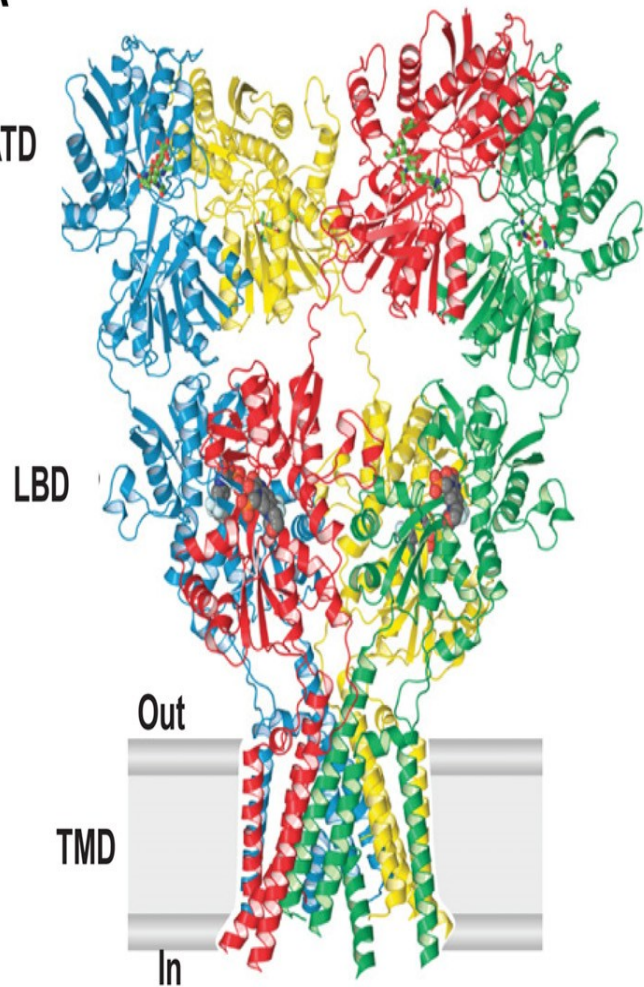
Uridina



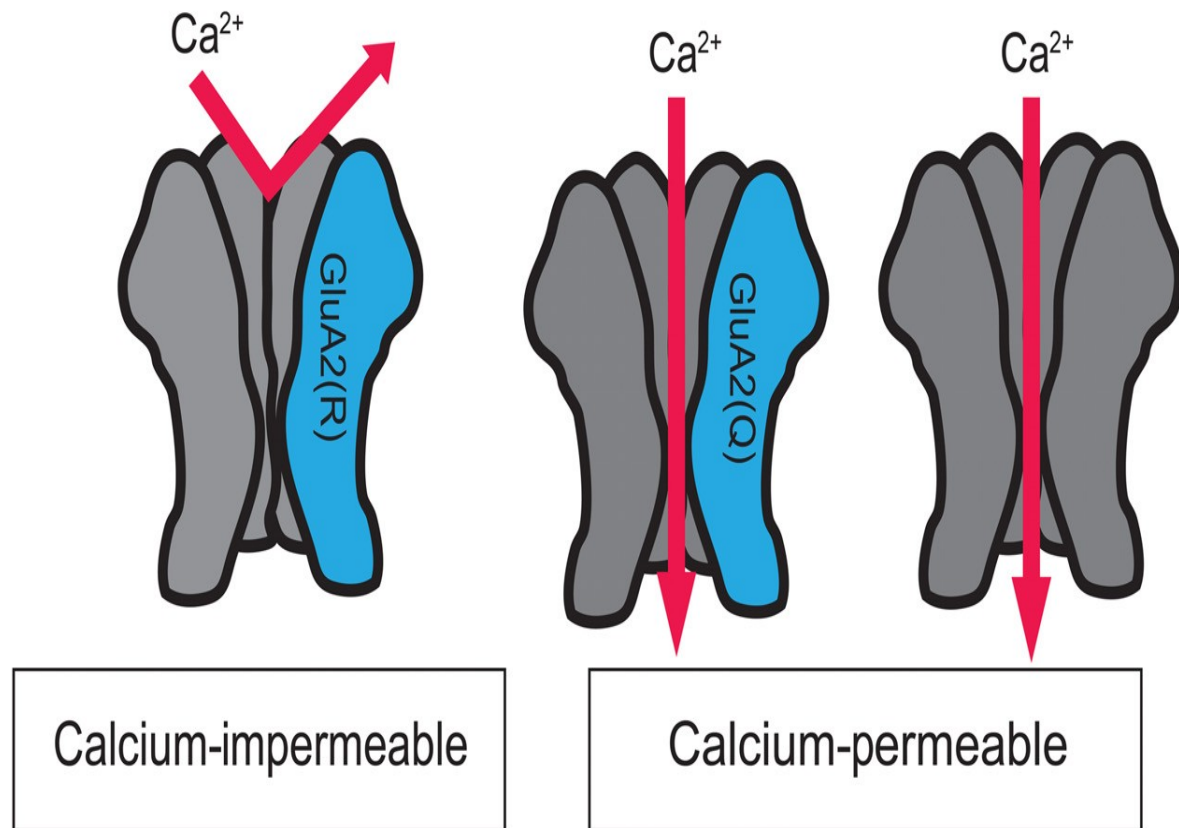
- ❑ L'editing A → I è particolarmente abbondante nei tessuti cerebrali, soprattutto nell'mRNA di recettori e canali ionici.
- ❑ Difetti di editing ⇒ disordini neurologici, quali epilessia, depressione, gliomi maligni e sclerosi laterale amiotrofica (ALS).
- ❑ ALS familiare (difetti nei geni SOD1, ALS2, senataxina), ALS sporadica (morte neuronale mediata da recettori per il glutammato di tipo AMPA difettosi ⇒ difetto dell'editing dell'RNA dei recettori AMPA (subunità GluR2)).



A

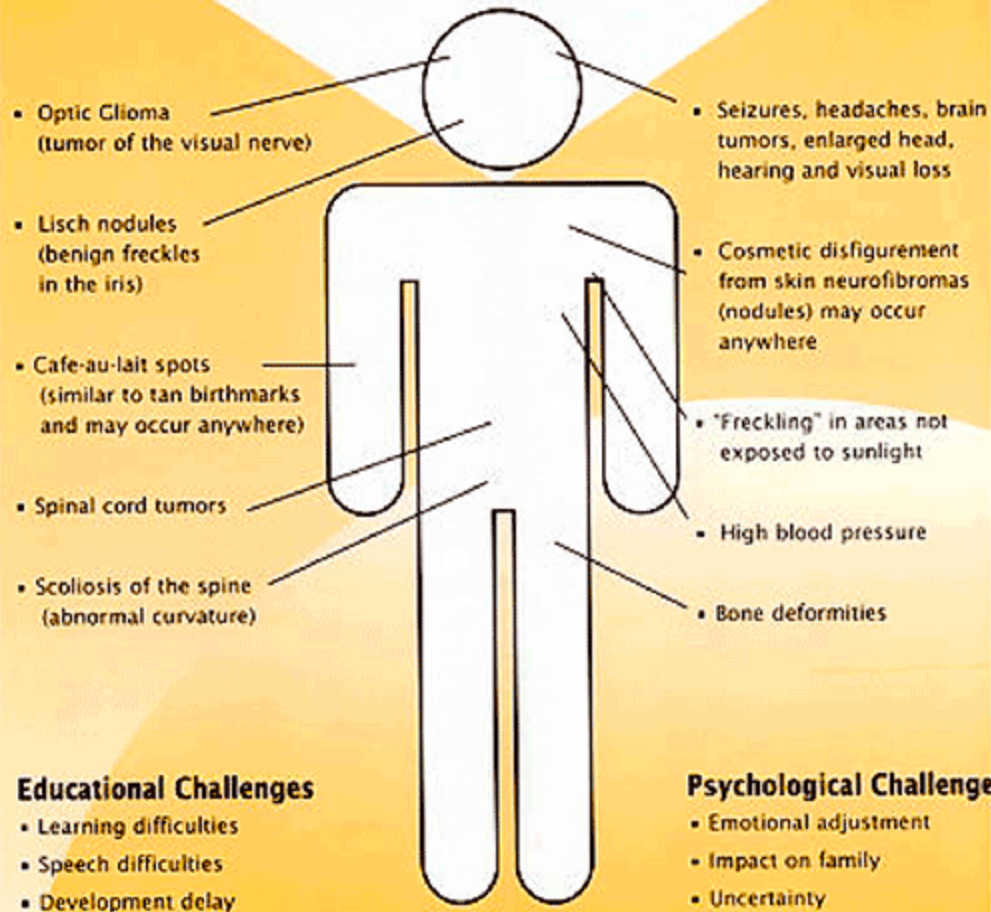


B

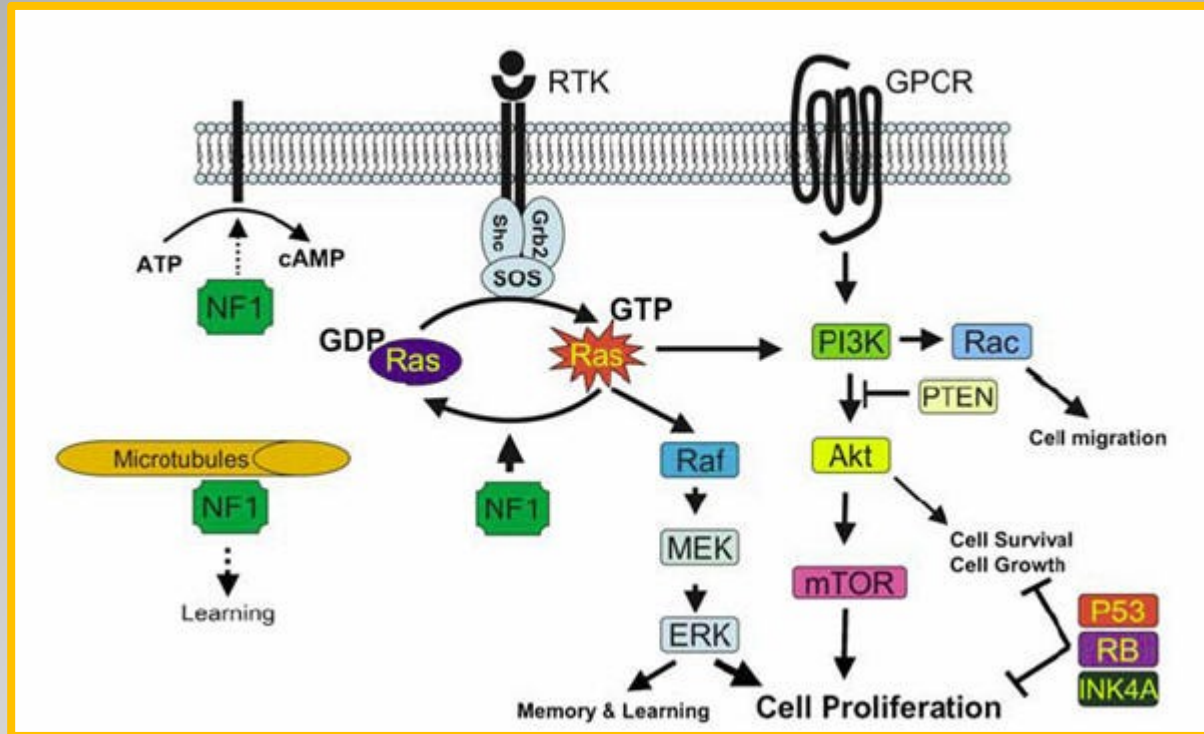


- ❑ Mentre l'editing A → I è molto diffuso, l'editing C → U è stato identificato soltanto nei trascritti dell'apolipoproteina B (ApoB) e della proteina correlata alla neurofibromatosi di tipo 1 (NF1)(neurofibromina).
- ❑ La NF1 è una malattia ereditaria autosomica dominante che predispone gli individui affetti a varie forme di neoplasie.
- ❑ Un editing C → U porta ad un codone stop prematuro sul mRNA della neurofibromina.
- ❑ La forma tronca della proteina è priva della funzione di soppressione dei tumori.

Possible Signs of Neurofibromatosis

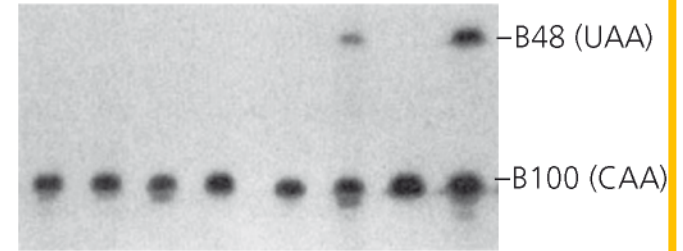


While it is unlikely that any one person diagnosed with NF will experience all of these symptoms, it is difficult to predict the severity or progression of the disorder in any individual case.



Le L.Q., Parada I.F., *Oncogene*, **26**: 4609-4616, 2007

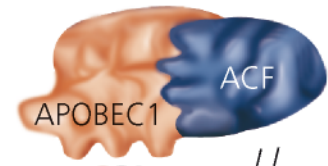
Editing *in vitro* con estratti di tessuti di babuino



5' — CCA — UAA — 3' mRNA apoB pre-editing

Fegato (assenza di editing)

Intestino tenue



Complesso di editing

5' — CCA — UAA — 3'

5' — UAA — UAA — 3'

Traduzione

Traduzione

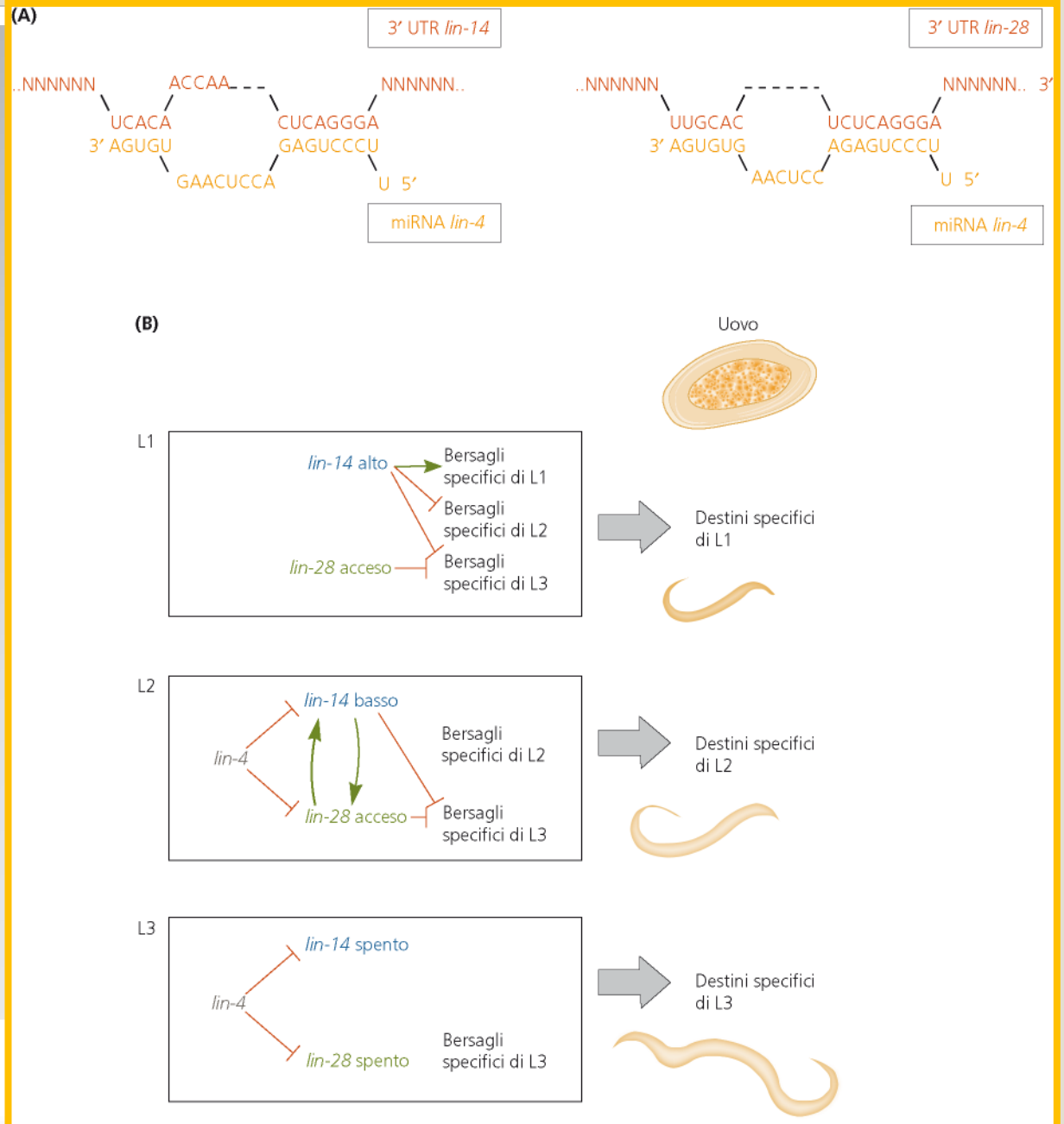
H₂N — Gln — COOH
ApoB-100

H₂N — COOH
ApoB-48

- ❑ Due classi principali di piccoli RNA regolatori:
 - ✓ microRNA (miRNA);
 - ✓ piccoli RNA interferenti (siRNA).
- ❑ Le sequenze dei miRNA sono quasi sempre conservate in organismi correlati, mentre le sequenze dei siRNA endogeni sono raramente conservate.
- ❑ I miRNA specificano "eterosilenziamento" - sono derivati da geni unici che specificano il silenziamento di geni molto diversi.
- ❑ I siRNA specificano invece "autosilenziamento" - guidano il silenziamento dello stesso locus genico o di un locus molto simile a quello da cui si originano. I siRNA possono derivare da virus, elementi trasponibili (trasposoni), eterocromatina o geni esogeni inseriti in una cellula in laboratorio. Una funzione significativa dei siRNA è La difesa del genoma da virus e da elementi mobili di DNA.

Regolazione genica post-trascrizionale da parte dei microRNA

Il miRNA *lin-4* regola la tempistica dello sviluppo della larva di *Caenorhabditis elegans*.



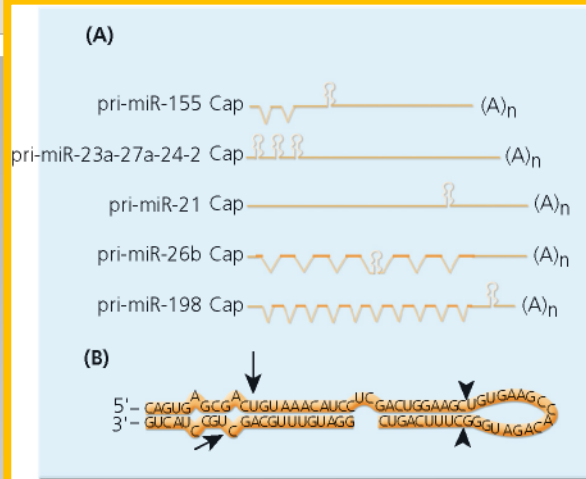
- ❑ Sono stati scoperti miRNA in tutti gli eucarioti multicellulari.
- ❑ Sono stati identificati più di 200 miRNA umani diversi, ma si stima che siano molti di più.
- ❑ Sono generati per modificazione di trascritti genici con struttura a forcina.
- ❑ La maggioranza dei miRNA umani sono sparsi in tutto il genoma, ma prevalentemente si trovano in gruppi che sono trascritti in modo coordinato.
- ❑ Molti miRNA (~ 56%) si trovano all'interno di introni di mRNA, mentre altri sono situati negli esoni o negli introni di RNA non codificanti.
- ❑ Trascrizione di miRNA primari (pri-miRNA) lunghi ~ 100 nucleotidi da parte della RNA pol. II.

I miRNA

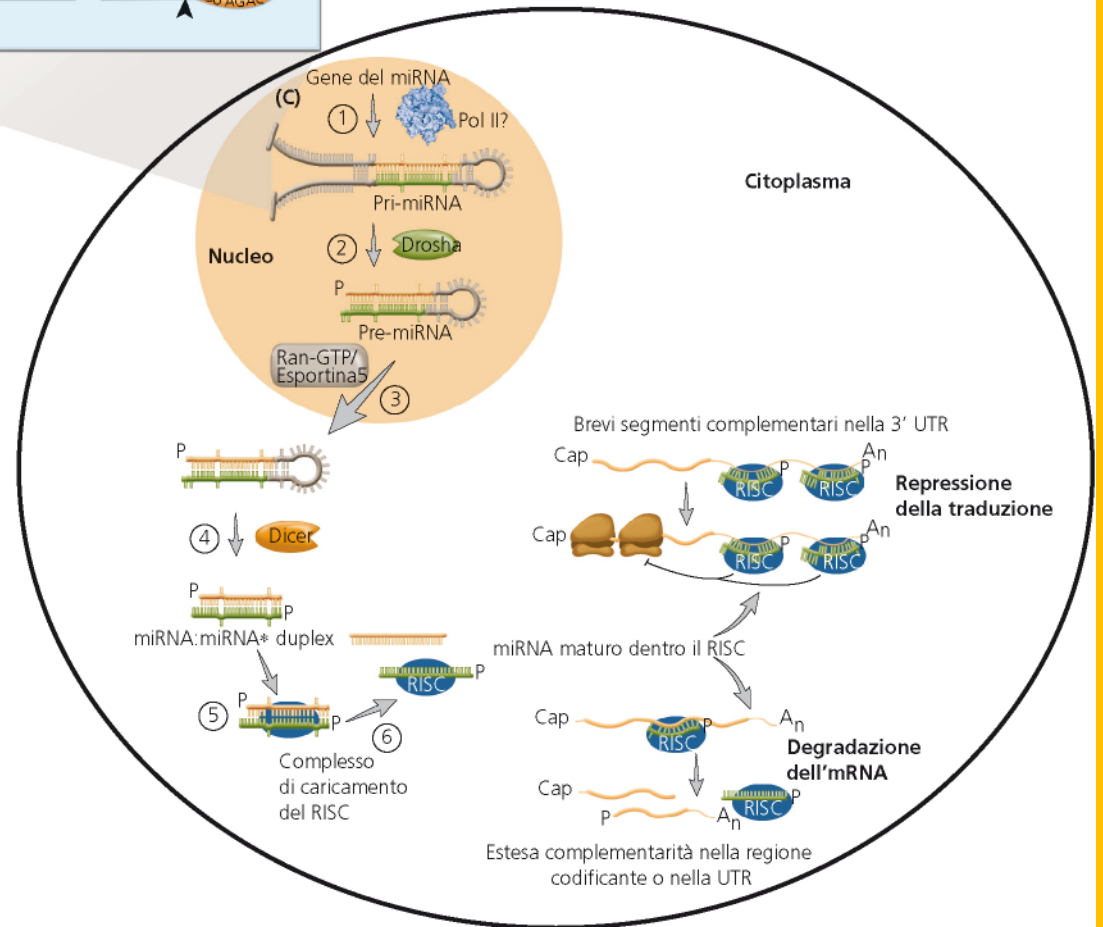
- ❑ I miRNA primari sono tagliati in sequenza da Rnasi II che sono specifiche per dsRNA, Drosha e Dicer.
- ❑ 1° taglio: Drosha \Rightarrow libera una forcina più corta di 60-70 nt (pre-miRNA) con una sporgenza al 3' di due nucleotidi.
- ❑ Esportazione nucleare mediata da esportina 5.
- ❑ Nel citoplasma, Dicer si lega alla sporgenza in 3' e libera un dsRNA di circa 22 bp con sporgenze di due nt al 3'.

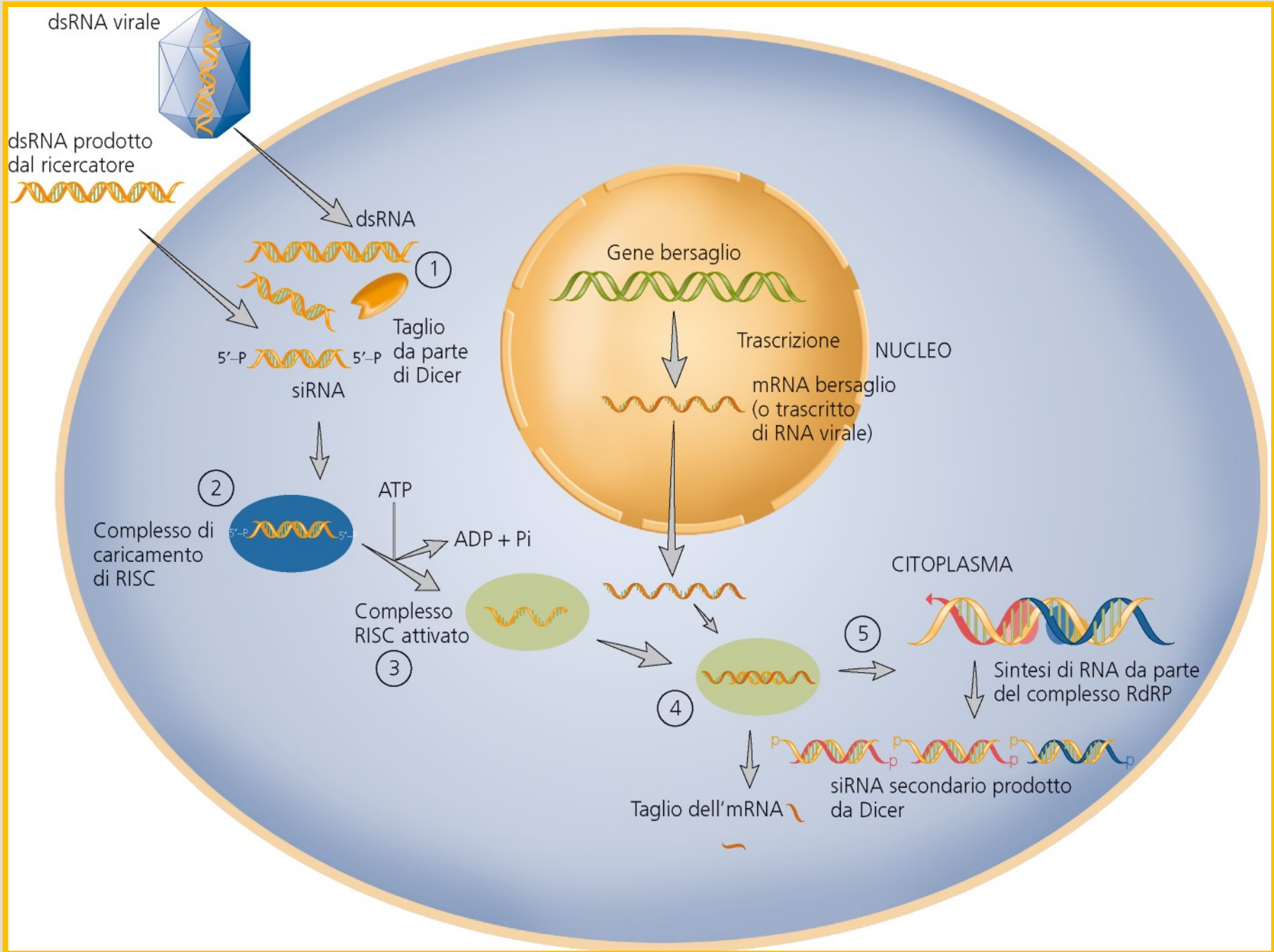
I miRNA

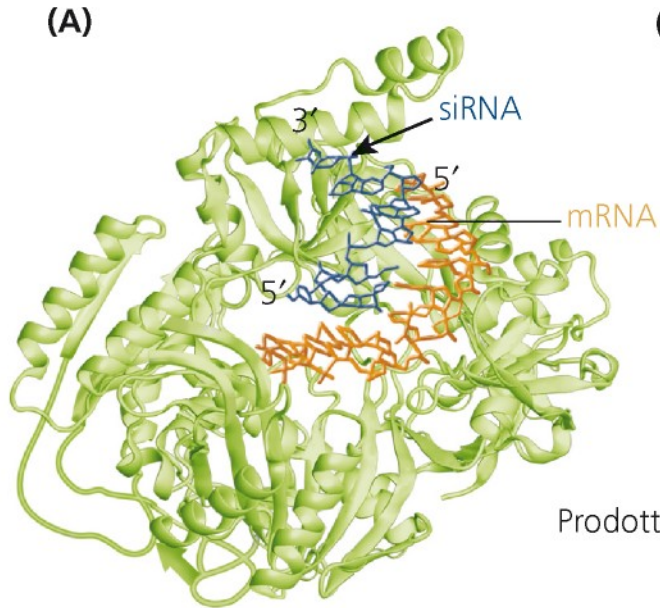
Biogenesi dei miRNA



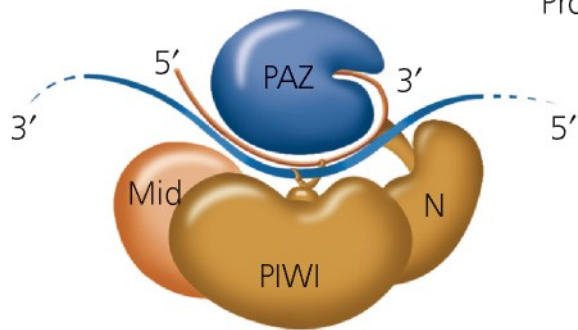
RISC: complesso di silenziamento indotto da RNA.



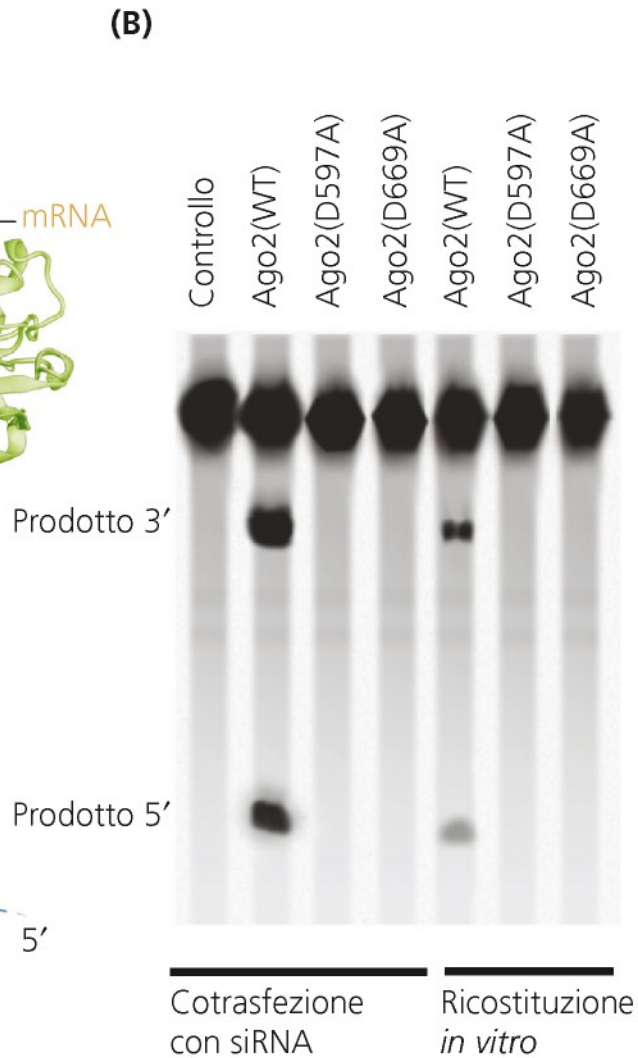




Proteina Argonauta
(slicer di RISC)



PIWI: dominio nucleasico (RNasi H)



- ❑ Funzioni dei miRNA:
 - Contribuiscono alla regolazione dell'apoptosi e della proliferazione cellulare nella *Drosophila*.
 - Contribuiscono all'asimmetria neuronale nel nematode *C. elegans*.
 - Contribuiscono allo sviluppo di foglie e fiori nelle piante.
 - Contribuiscono al differenziamento emopoietico ed allo sviluppo delle neoplasie negli esseri umani.
 - Contribuiscono alla morfogenesi del cervello nel pesce zebra.
- ❑ Studi recenti indicano che miRNA hanno un ruolo importante nell'espressione tessuto-specifica dei geni e possono mediare anche difese antivirali.

I miRNA

- ❑ **Turnover dell'RNA nel nucleo:** introni dei pre-mRNA rimossi dallo splicing ed intermedi a vita breve dei processi di modificazione degli rRNA, degli snoRNA e degli snRNA (degradazione da parte dell'esosoma nucleare); pre-mRNA sottoposti al "controllo di qualità".
- ❑ **Esosoma nucleare:** complesso multiproteico con molte esoribonucleasi (degradazione in direzione 3' → 5').
- ❑ Nel lievito la degradazione da parte dell'esosoma è promossa da un complesso che contiene un RNA elicasi ATP dipendente, una proteina a nocca di zinco, ed una poli(A) polimerasi.

Turnover dell'RNA

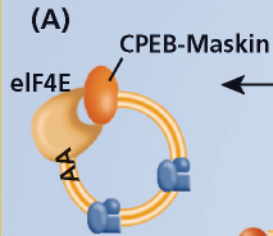
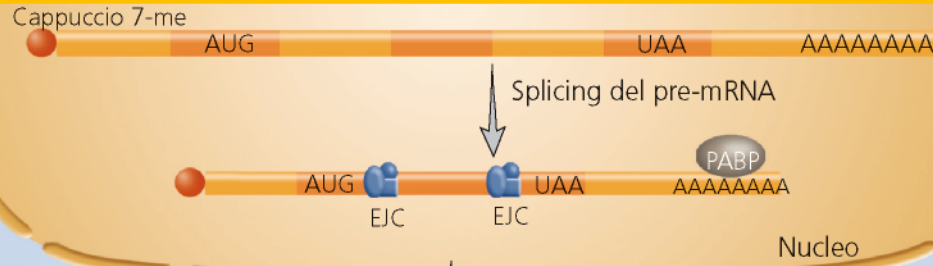
- ❑ **Esportazione nucleare:** Trascrizione/export (TREX) e proteine SR reclutano i fattori generali di esportazione nucleare (NXF), come TAP/NXF1.
- ❑ TREX è reclutato sul pre-mRNA in una fase finale dello splicing nei mammiferi, mentre TAP/NXF1 interagisce preferenzialmente con proteine SR ipofosforilate.
- ❑ Due proteine filamentose del NPC servono da filtro di selezione, interagendo di preferenza con particelle mRNP assemblate a modo appropriato.

Controllo di qualità ed esportazione nucleare dei mRNA

- Una volta nel citoplasma l'mRNA può avere diversi destini:
- ✓ può essere tenuto in uno stato tradizionalmente silente (negli oociti);
- ✓ può essere tradotto e quindi degradato;
- ✓ può essere rapidamente degradato, mediante nonsense, se contiene un codone di stop prematuro.

Il turnover dell'RNA citoplasmatico

CPEB: proteina che lega l'elemento di poliadenilazione citoplasmatico.



(B) mRNA normale



Primo ciclo di traduzione
Rimozione completa degli EJC



Traduzione normale

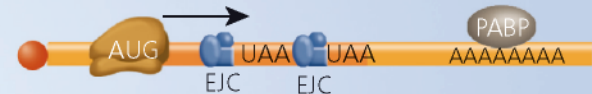
Turnover dell'mRNA

Corpi P

Deadenilazione e degradazione esonucleolitica 3'→5'

Rimozione del cappuccio dell'mRNA e digestione esonucleolitica 5'→3'

(C) mRNA nonsense



Primo ciclo di traduzione
Rimozione incompleta degli EJC



Reclutamento della proteina Upf



Traduzione prematura
Individuazione degli EJC da parte del "complesso di sorveglianza"

Degradazione dell'mRNA nonsense

