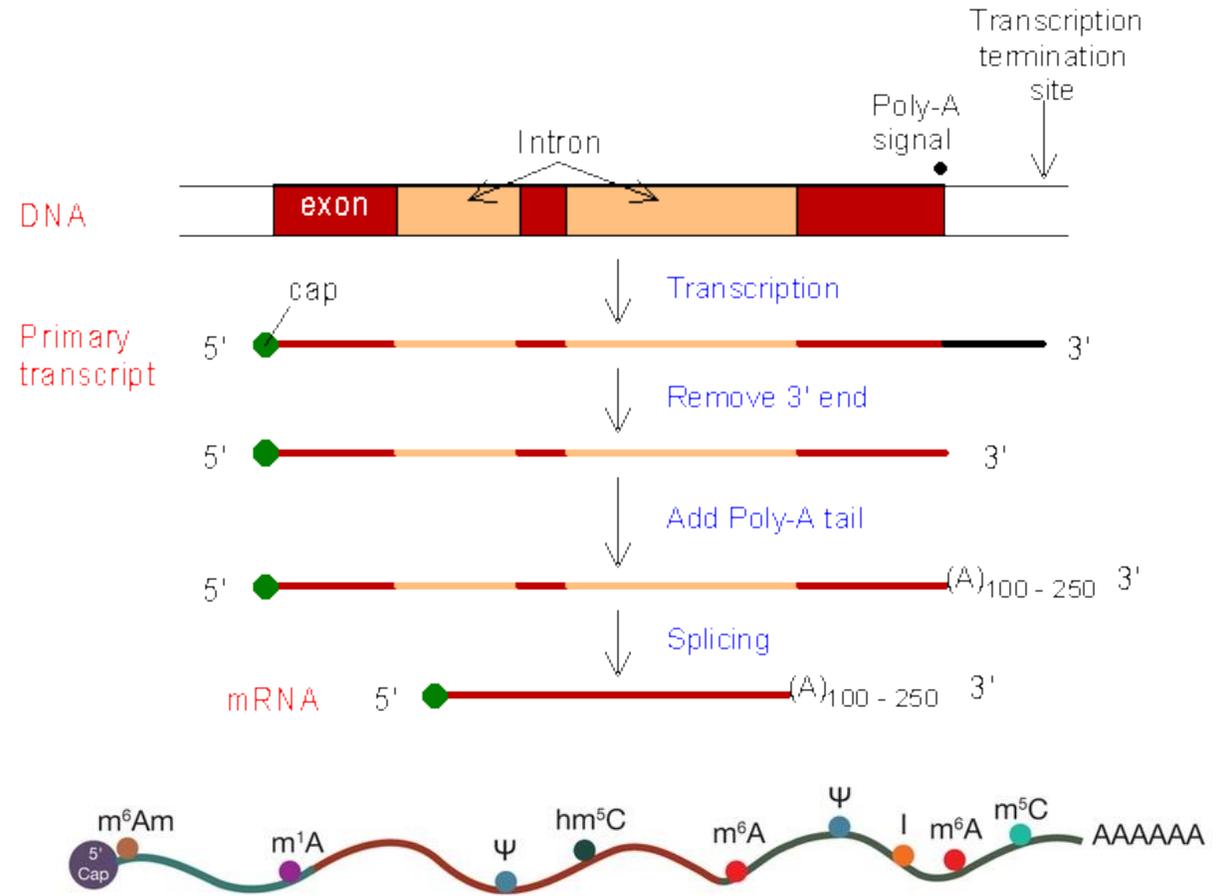




Processamento del mRNA, rRNA e tRNA

Processamento

- Meccanismo per il quale l'RNA precursore da luogo ad un RNA maturo (mRNA, rRNA, tRNA).
- Durante questo processo vengono **eliminate o aggiunte regioni al RNA**
- Avvengono delle **modificazioni chimiche a livello delle basi azotate e del ribosio**. Sono presenti in tutti gli RNA, ma soprattutto negli rRNA e tRNA (75%, 1nt su 10 è modificato)



Processamento rRNA

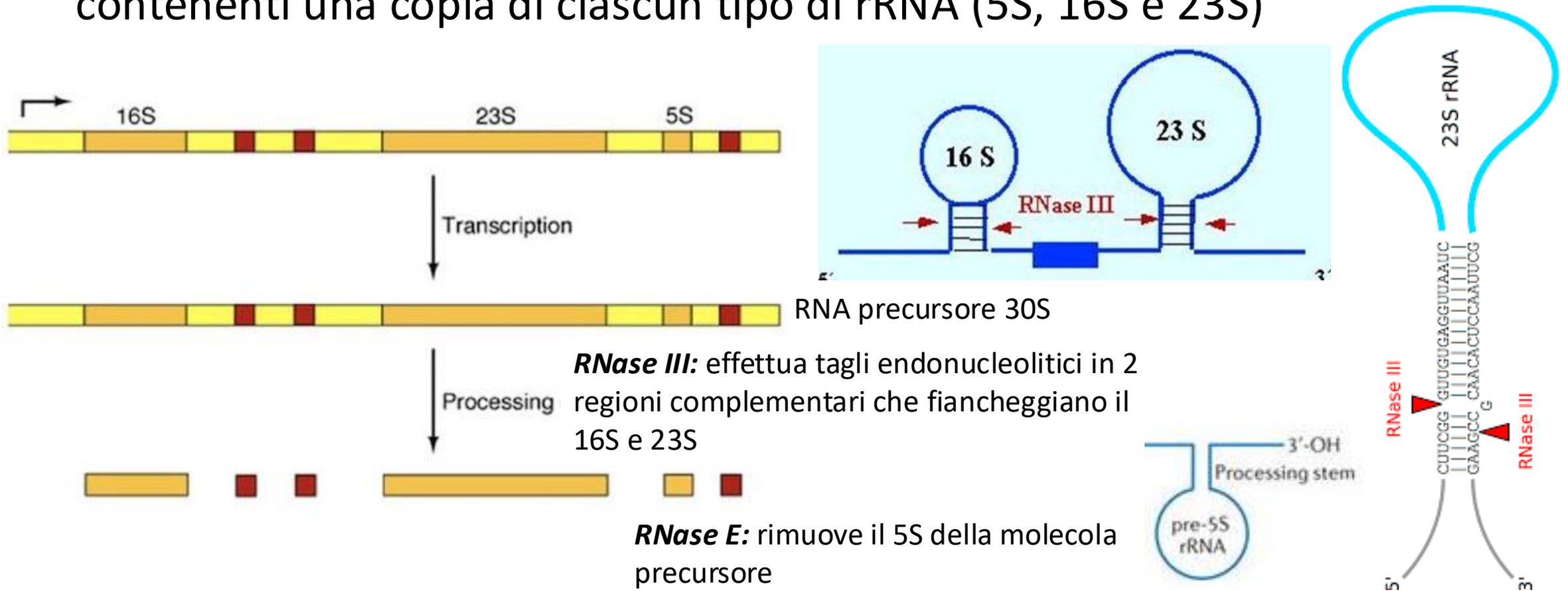
Le lunghe molecole di RNA sono processate mediante **tagli endonucleolitici con o senza azione di esonucleasi**

Procarioti

Eucarioti

Processamento rRNA: Procarioti

- In *E.coli* i geni del rRNA sono organizzati in operoni (7 copie) contenenti una copia di ciascun tipo di rRNA (5S, 16S e 23S)



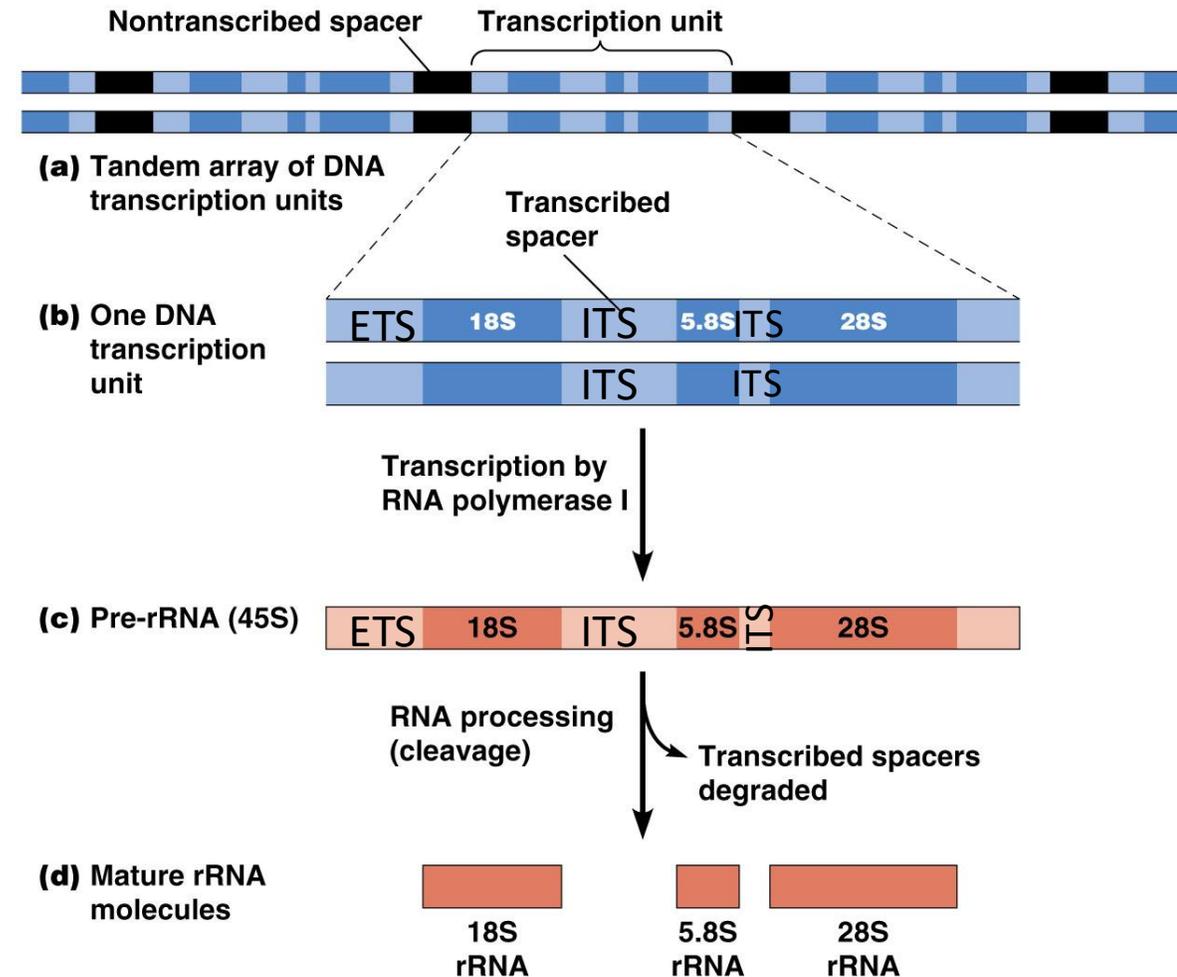
Processamento rRNA: Eucarioti

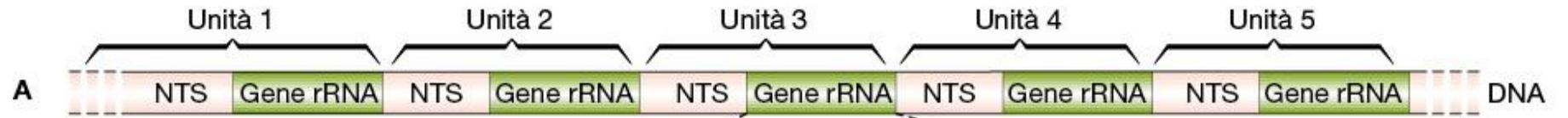
Negli eucarioti i **geni degli RNA** sono ripetuti in tandem trovandosi posizionati in **diversi cromosomi**.

Ogni unità trascrizionale è separata della successiva da una regione spaziatrice non trascritta (NTS, Non Transcribed Spacer)

La **Pol I** genera un lungo pre-rRNA 45S contenente gli rRNA 28S, 18S, 5.8S, e i separatori **ITS (Internal Transcribed Spacer)**. Questo pre-RNA include anche una sequenza 5' **ETS (External transcribed sequence)**

La **Pol III** trascrive il gene del rRNA5S che si trova anche essi in copie in tandem in una localizzazione differente del genoma.





Nucleolo

Maturazione del 45S

Rimozione dell'estremità 5' formando il 41S

Il 41S viene diviso nel 20S+32S

Viene rimossa l'estremità 3' del 20S formando il 18S. Si separano il 5.8S e 28S che vanno ad associarsi

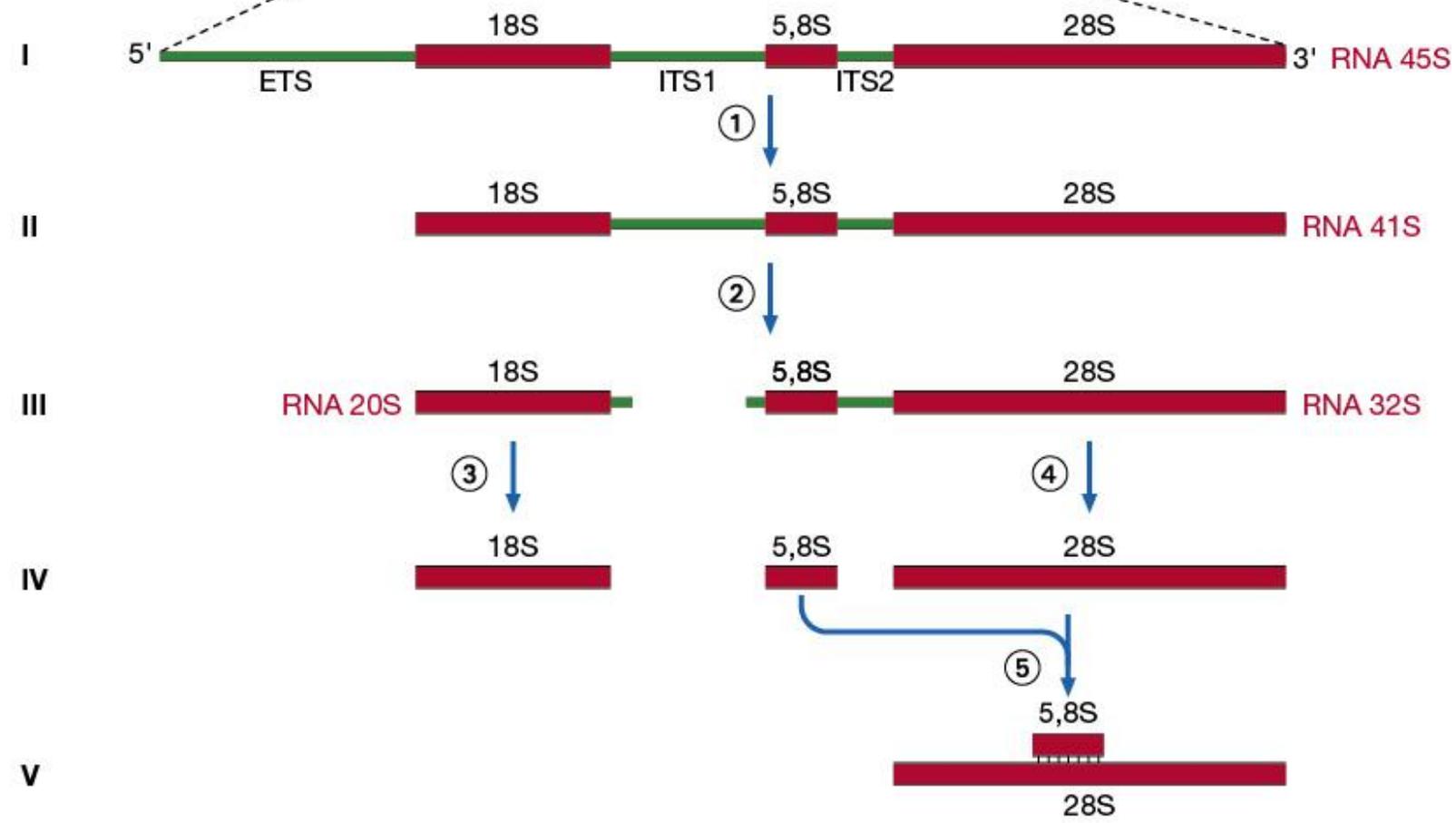


Fig. 12.2 Amaldi et al. Biol.Molecolare, Ambrosiana

Modificazioni chimiche degli rRNA

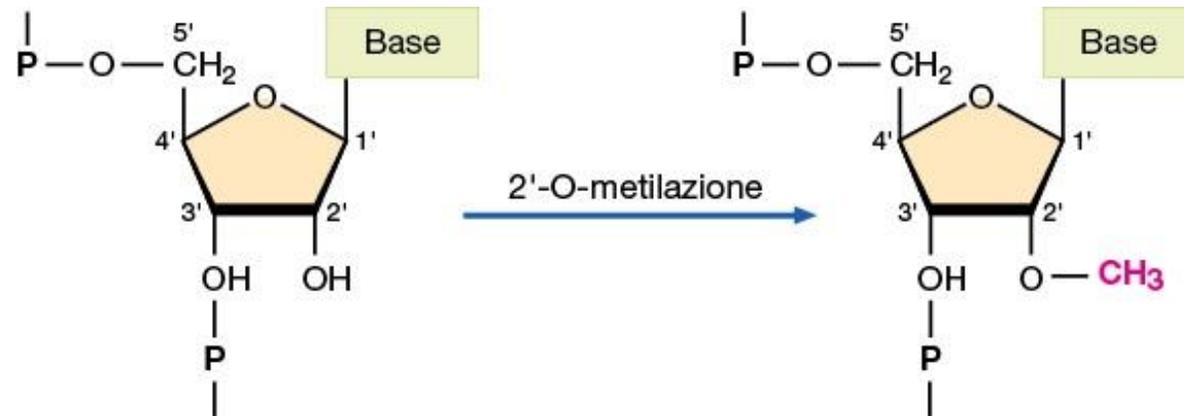
Dopo il processamento mediante i tagli endonucleotidici, la maturazione degli rRNA continua con delle **modificazioni post-trascrizionali**.

Nell **nucleolo** (dove avviene la sintesi del rRNA)

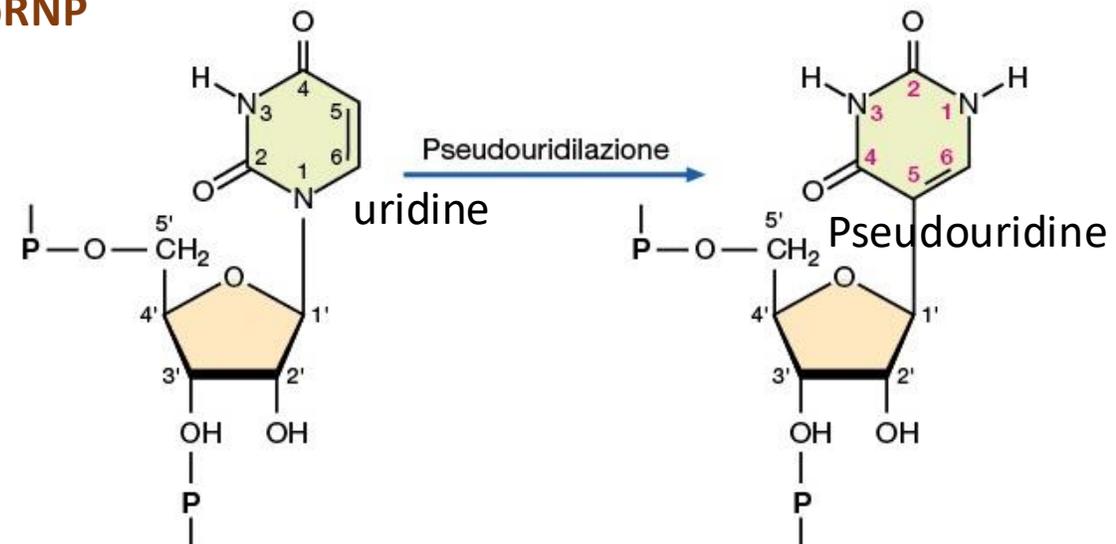
Mediata da 2 classi di **snoRNA** (small nucleolar RNA) che guidano la scelta fra le due modificazioni qui descritte.

Gli snoRNA agiscono assemblandosi in ribonucleoproteine con attività enzimatica chiamate **snoRNP**

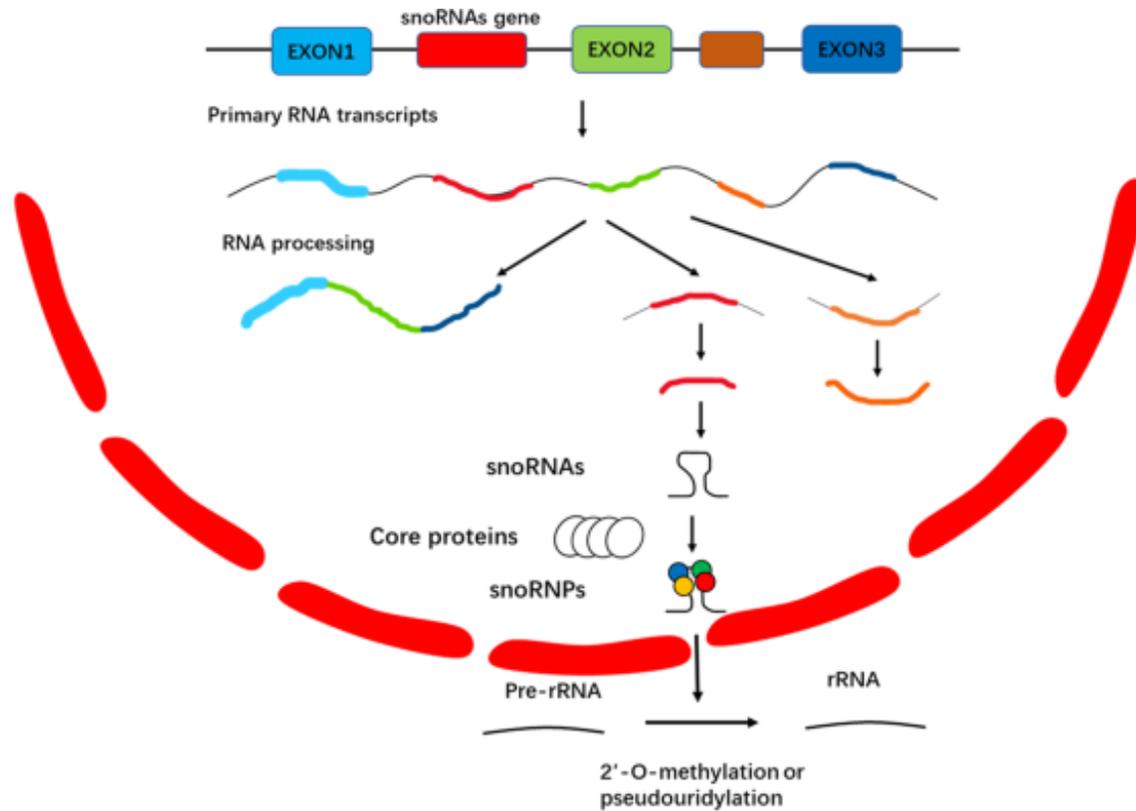
Metilazione del 2'-O del ribosio



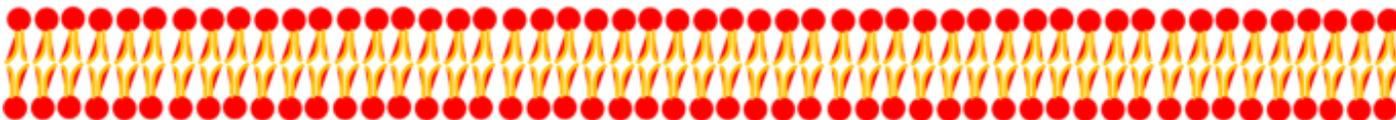
Pseudouridilazione



snoRNA: small nucleolar RNA



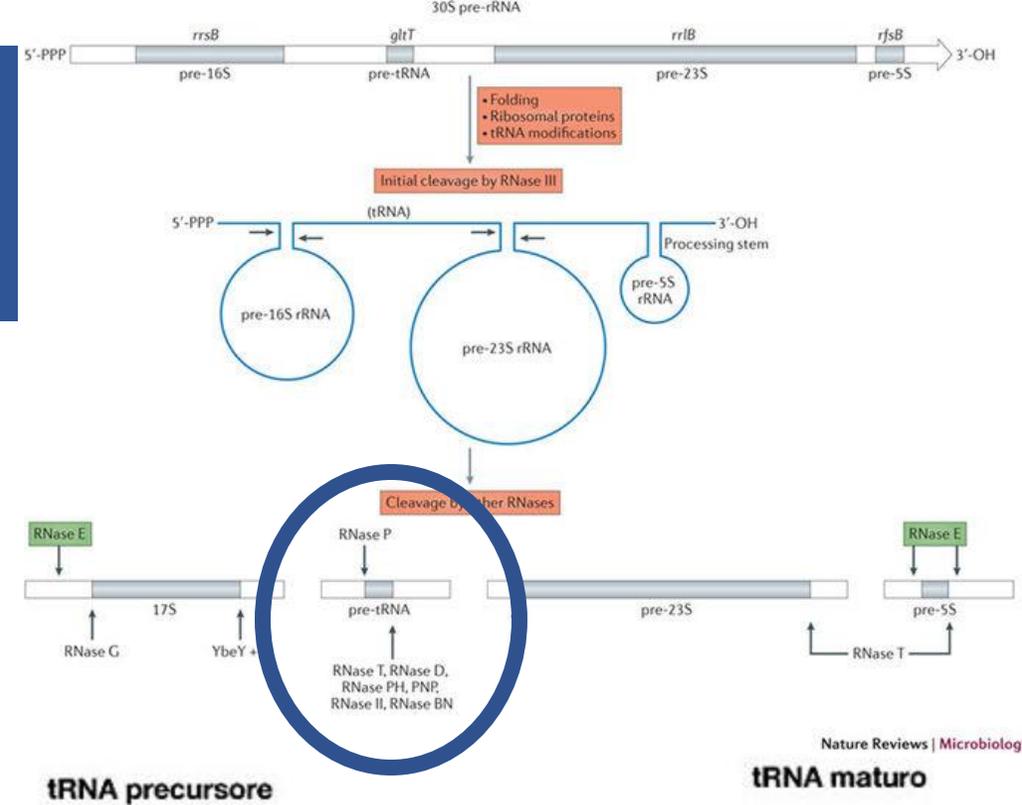
- Originate from the nucleolus, snoRNAs are mainly encoded in the intron region of the gene transcribed by RNA polymerase II.
- SnoRNAs form functional snoRNPs (small nucleolar ribonucleoproteins) through binding to core proteins.
- SnoRNAs stabilize the structure of rRNA through modifying rRNA with 2'-O-methylation and pseudouridylation.



Processamento tRNA

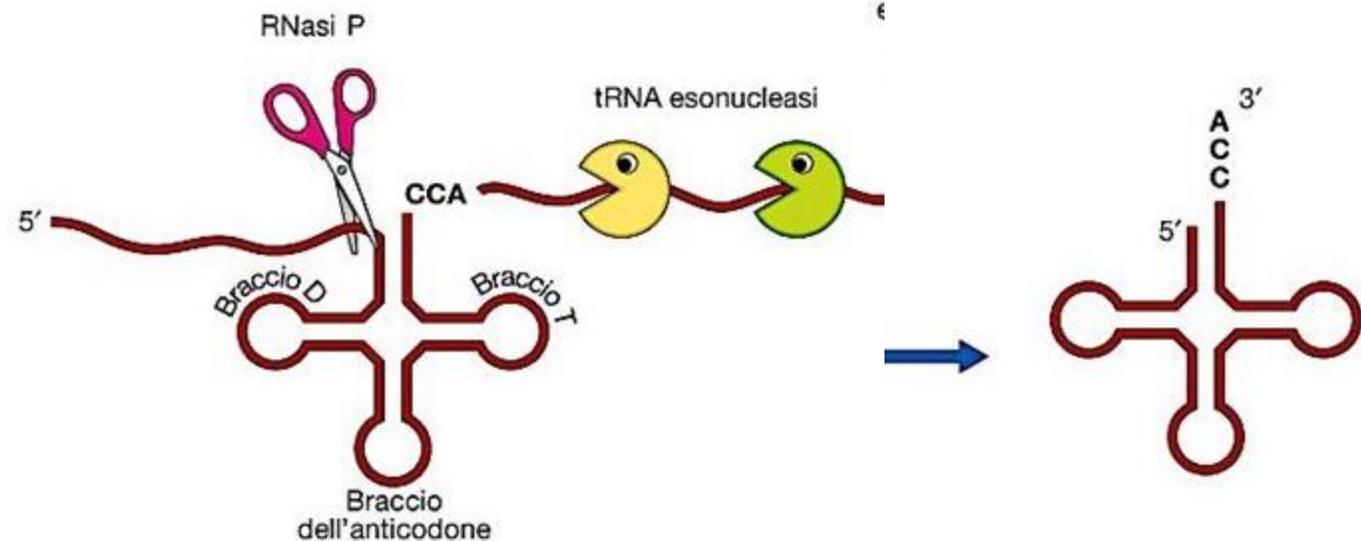
Procarioni

1. L'RNA precursore policistronico viene tagliato dalla RNasi III in molecole di RNA monocistroniche
2. Endonucleasi ed esonucleasi tagliano l'estremità 5' e 3' in eccesso.



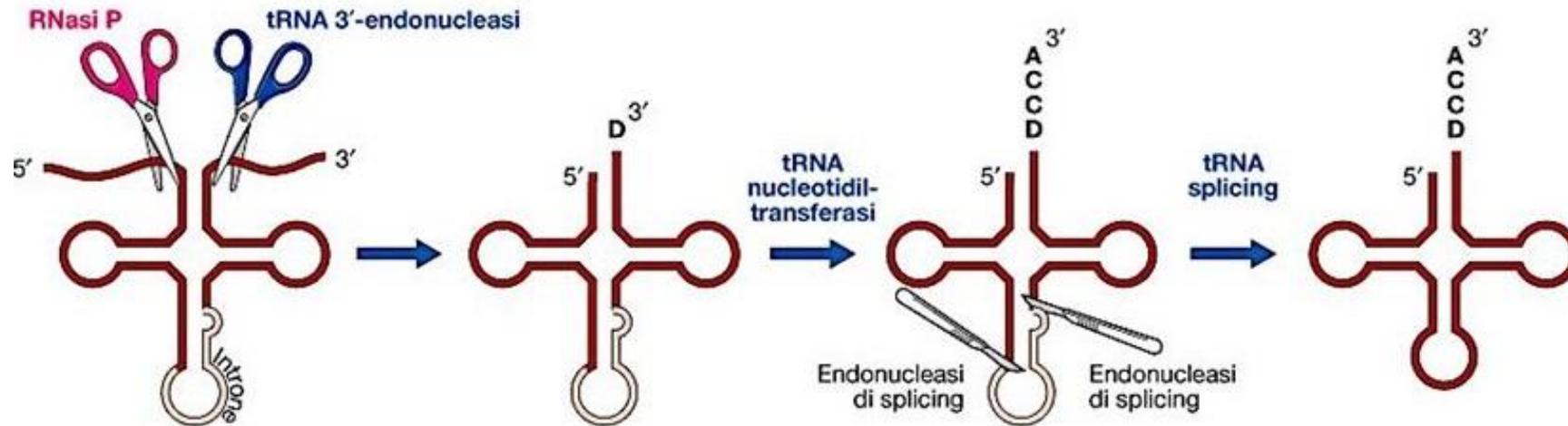
L'estremità 5' è tagliata dalla endonucleasi RNasi P.

L'estremità 3', in batteri, richiede un taglio endonucleolitico *a valle* della tripletta CCA presente nel precursore seguita dalla azione di esonucleasi



Processamento tRNA

Eucarioti



L'RNA precursore è **monocistronico** e la sua maturazione comporta **l'eliminazione delle estremità 3' e 5'**

L'estremità 3' è tagliata da una **endonucleasi** specifica, per dopo procedere alla **aggiunta della tripletta CCA** che negli eucarioti non è presente a livello del RNA precursore. Questo evento è mediato dalla **tRNA nucleotidil-transferasi**.

Successivamente, se il tRNA ha intron questi saranno rimossi da una specifica endonucleasi.

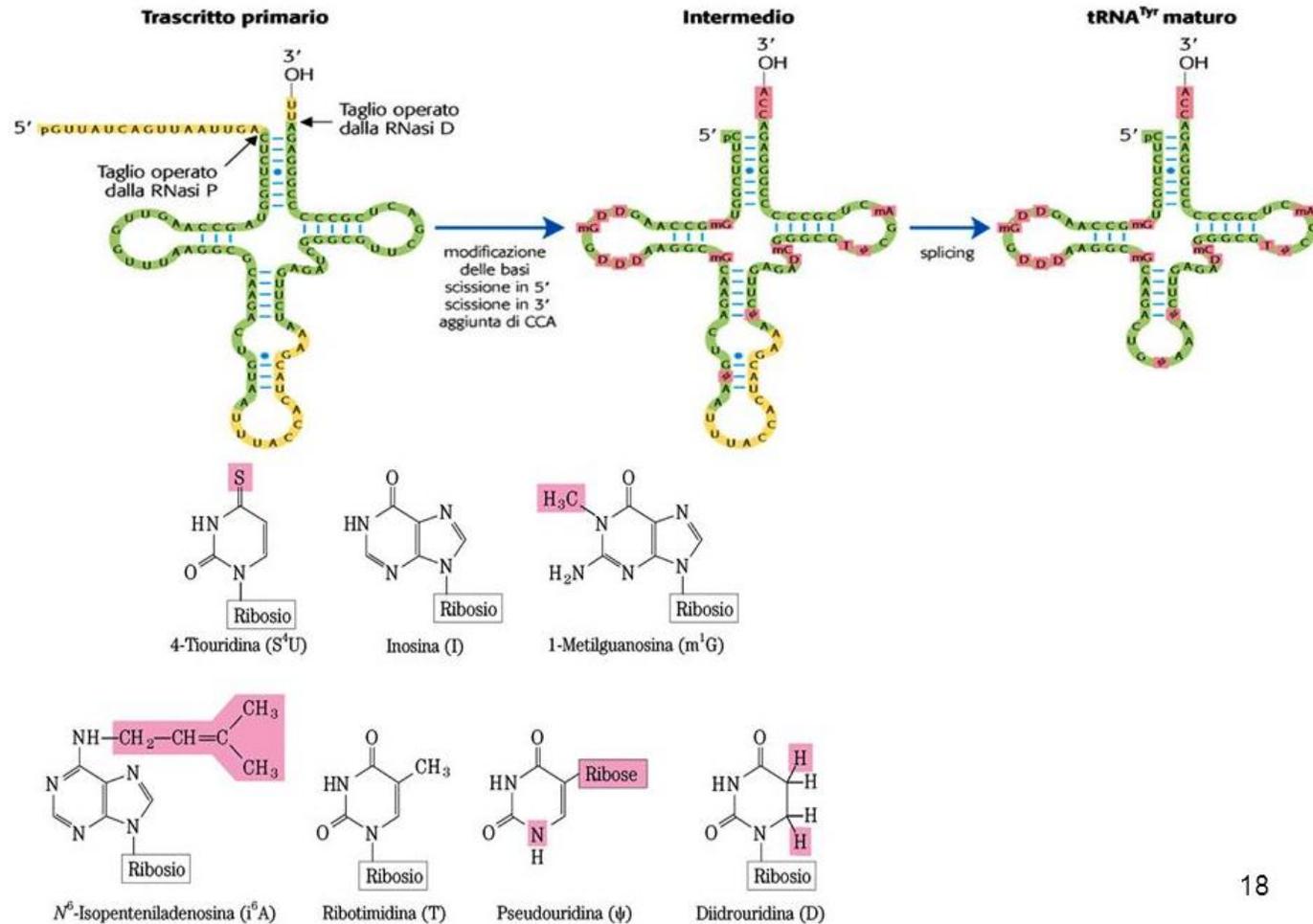
La maturazione si completa con **modificazioni chimiche a livello dei nucleotidi del tRNA**.

Processamento tRNA

Modificazioni chimiche degli tRNA

Si trovano un **alto numero di ribonucleosidi modificati** in posizioni specifiche. Non è ancora chiaro il ruolo di molte di queste modificazioni, così come non sono stati caratterizzati gli enzimi implicati in tale processo.

- Modificazioni nell'ansa dell'anticodone regolano l'efficienza della traduzione
- Modificazioni nel corpo centrale regolano la struttura secondaria e terziaria, e la sua stabilità. L'assenza di alcune modificazioni può attivare la sua degradazione.
- Modificazioni specifiche sono necessarie per determinare l'identità e specificità del tRNA.



Processamento siRNA & miRNA

Ribozimi: RNAs con attività catalitica

- Twenty years ago, it became clear that **ribonucleic acids, or RNAs**, are used as **catalysts in living cells**, in addition to their known roles in information storage and as molecular architectural frameworks.
- This idea was so profoundly contrary to the central dogma of molecular biology that it resulted in the award of a **Nobel prize** to two of the early proponents, Thomas Cech and Sidney Altman. It has inspired what is now itself the dogmatic view of pre-biotic macromolecules, **the 'RNA World' hypothesis** (Gesteland et al., 1999).

Ribozimi: RNAs con attività catalitica

Some natural ribozymes:

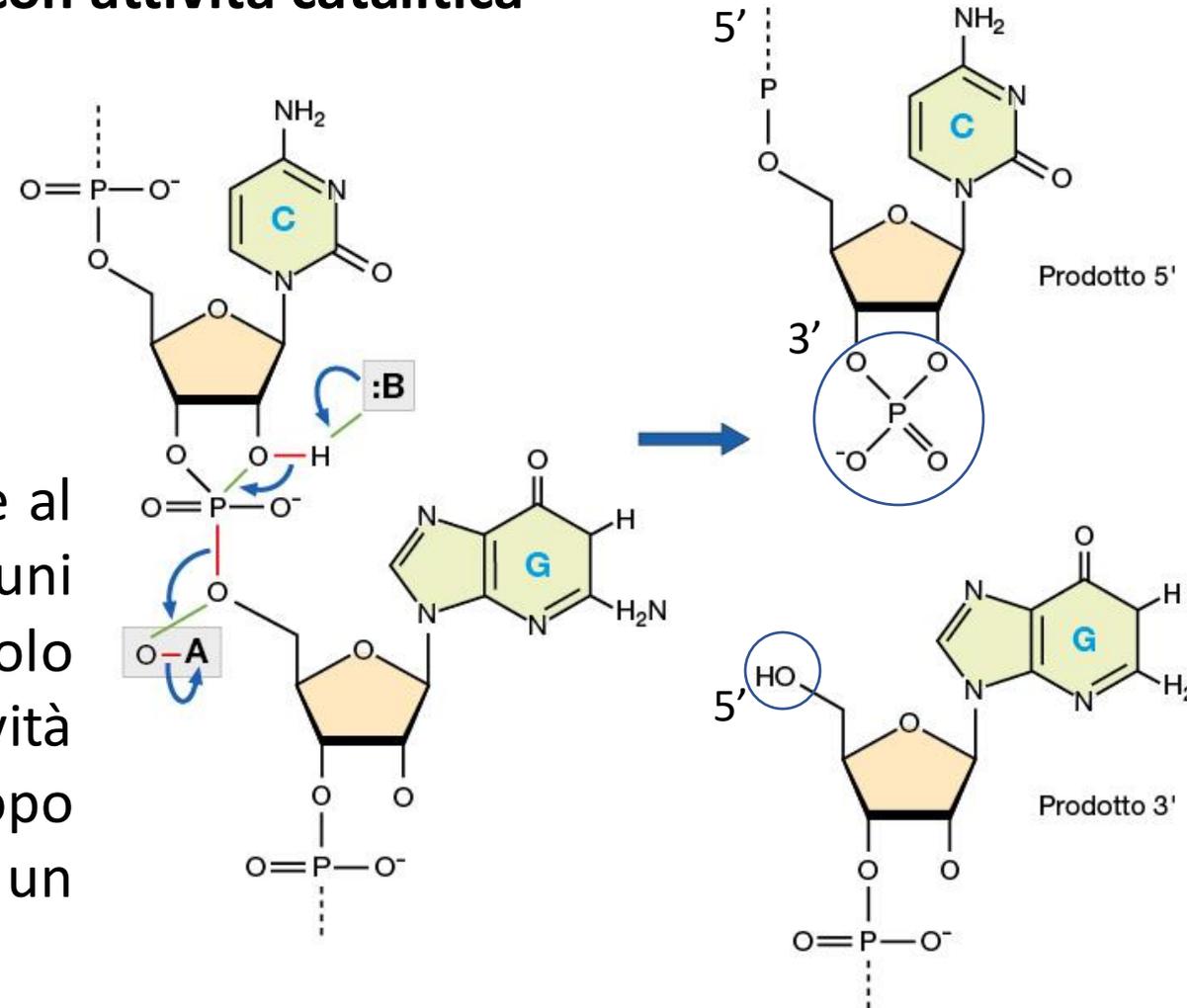
Group I introns	>1000	Eukaryotes (nucleus and mitochondria), prokaryotes, bacteriophages	Self-splicing transesterification (3'-OH)
Group II introns	>700	Eukaryotes (organelles), prokaryotes	Self-splicing transesterification (3'-OH)
Group-I intron like	6	<i>Didymium, Naeglaria</i>	Hydrolysis (3'-OH)
RNase P RNA	>300	Eukaryotes (nucleus and organelles), prokaryotes	Hydrolysis (3'-OH)
Hammerhead ribozyme	11	Plant viroids and satellite RNAs, newt	Self-cleaving transesterification (2',3'-cyclic phosphate)

But there are more....

Ribozimi «*Hammerhead*» o «a testa di martello»

Sono **piccole molecola di RNA con attività catalitica**

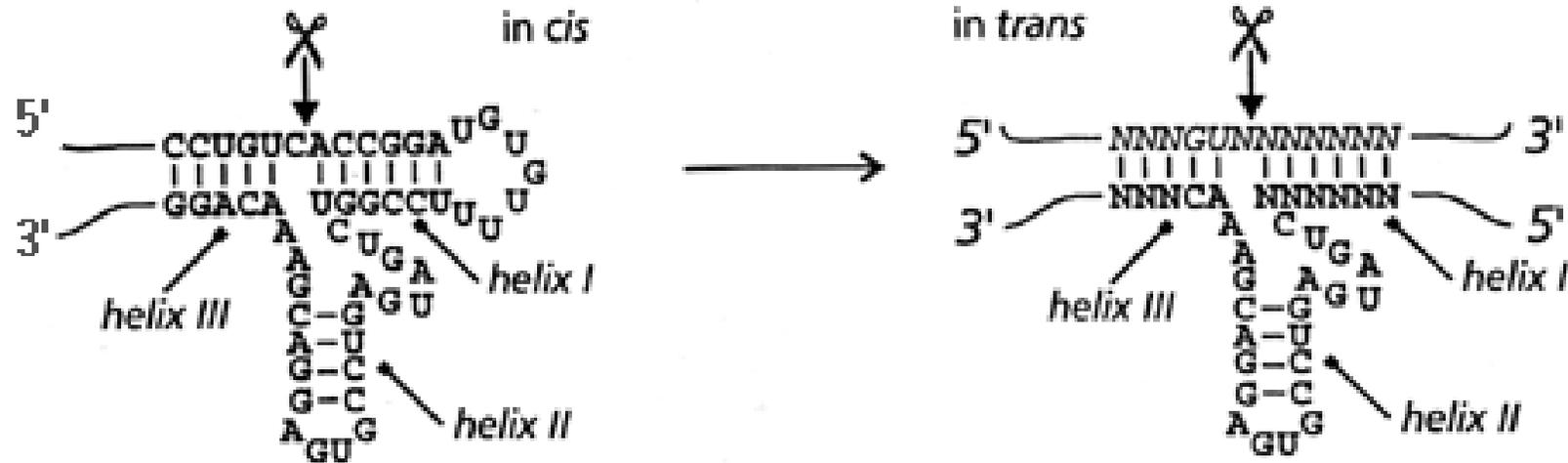
- Effettuano tagli in sequenze di RNA mediante idrolisi di legami fosfodiesteri, creando
 - un fosfato ciclico 2'-3' all'estremità 3'
 - un ossidrile all'estremità 5'
- I ribozimi a testa di martello partecipano anche al **processing di piccoli genomi di RNA** di alcuni Viroidi delle piante (con RNA circolare a singolo filamento). Questi inducono la loro attività patogena attraverso il silenziamento genico dopo l'interazione complementare del RNA con un mRNA bersaglio.



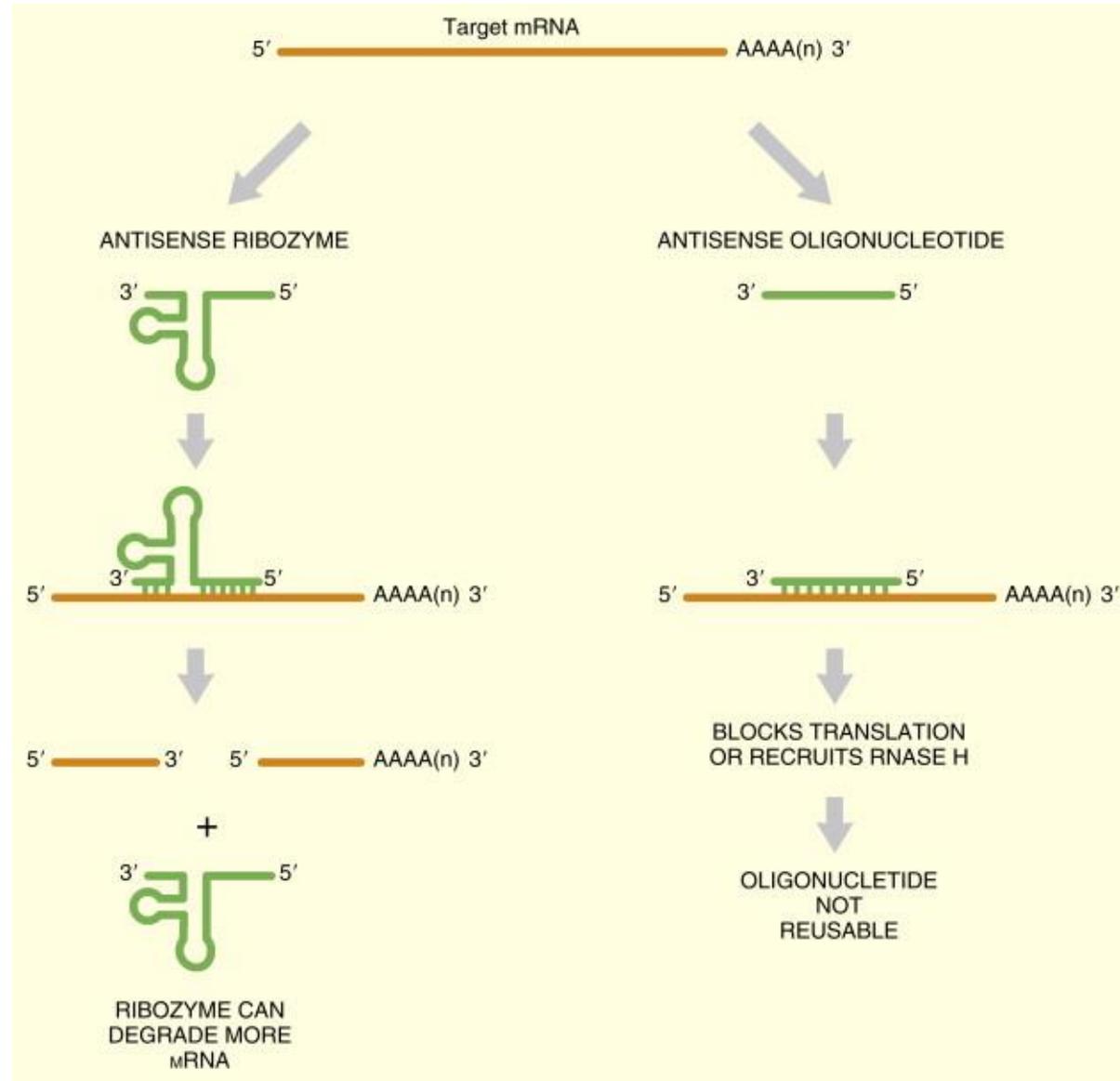
Ribozimi «*Hammerhead*» o «a testa di martello»: siRNA

I ribozimi hammerhead sono caratterizzati da una struttura secondaria che consiste in tre forcine (I, II, III) che racchiudono una giunzione che contiene il core catalitico determinato dalla presenza di specifici nucleotidi

hammerhead ribozyme

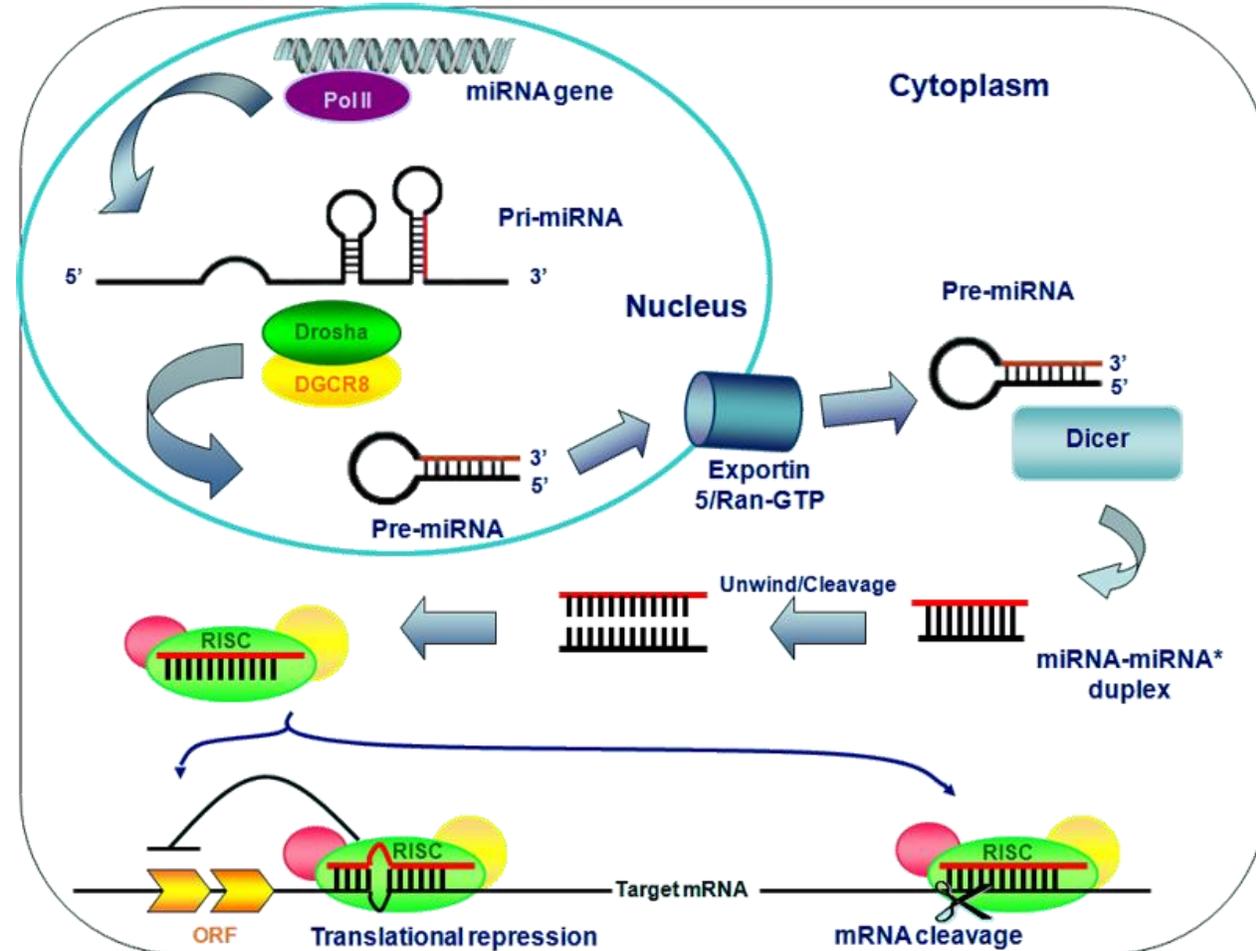


Ribozymes, miRNA and siRNA to silence protein expression



microRNA (miRNA)

- Sono delle molecole di RNA (20-25nt) trascritte dalla **Pol II** a partire da **regioni non codificanti (ncRNAs, no coding RNAs)** che legandosi a sequenze di mRNA complementare regolano negativamente la traduzione o inducono la degradazione.
- Un primo RNA chiamato **miRNA primario (pri-miRNA)** viene generato da regioni specifiche per uno o più miRNA o da regioni introniche di geni codificanti per proteine.



microRNA (miRNA)

I pri-miRNA (lunghi precursori, conformazione a forcina, double stranded) soffrono un processo di maturazione nucleare o «**cropping**», e un processo di maturazione citoplasmatico o «**dicing**»

➤ Cropping:

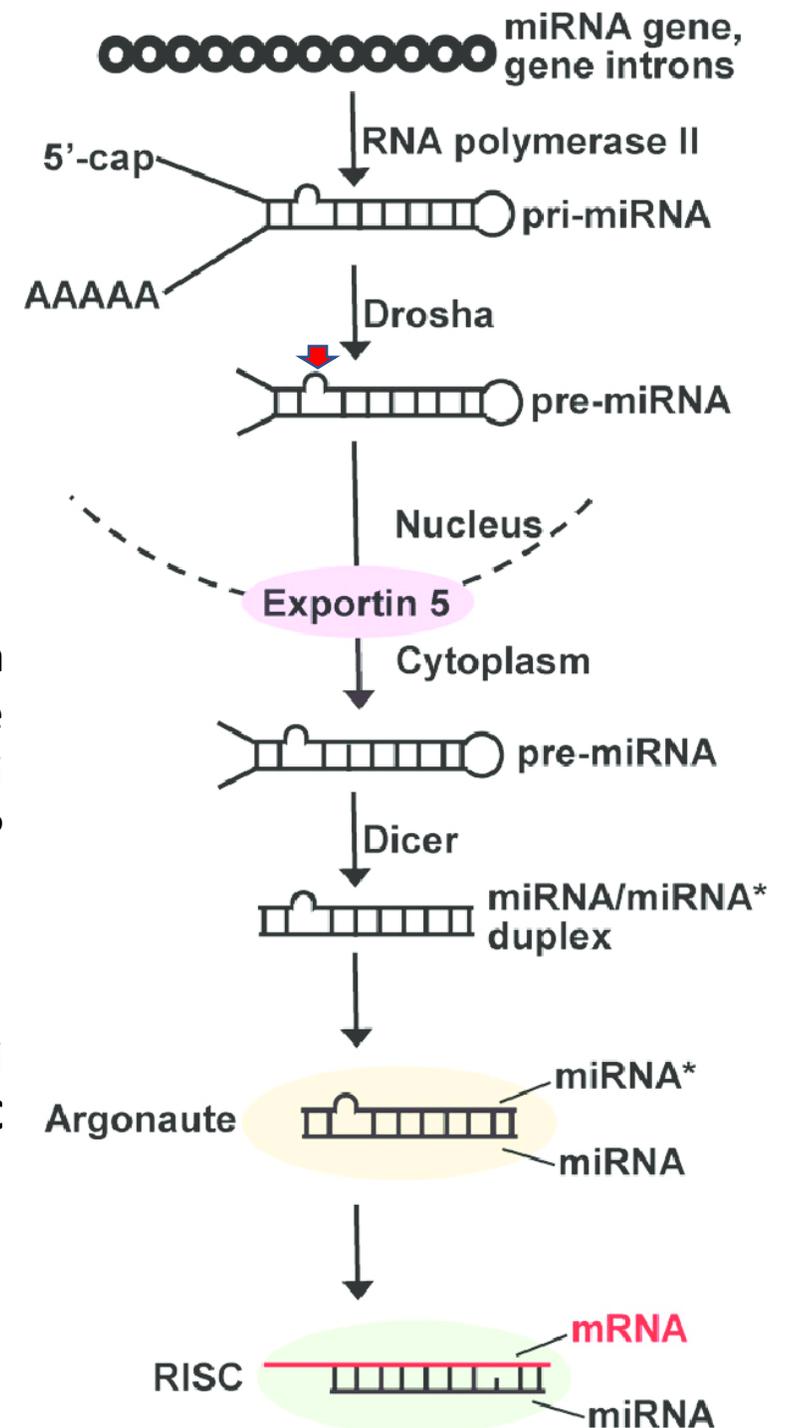
La RNAsi III Droscha rimuove frammenti dalle estremità 5' e 3'. Si forma una **struttura a forcina di 60-100 nt** che prende il nome di **pre-miRNA** che è caratterizzata da una sporgenza formata da una coppia di basi. Il pre-miRNA si esporta dal nucleo al citoplasma mediante il sistema **Esportina/Ran GTP** attraverso il **poro nucleare**, dove avviene il «dicing»

➤ Dicing:

Il loop del pre-miRNA è eliminato dalla **Rnase III Dicer** e uno dei 2 filamenti viene selezionato come miRNA attivo che verrà **incorporato al complesso RISC** (RNA induced silencing complex) per interagire con l'mRNA.

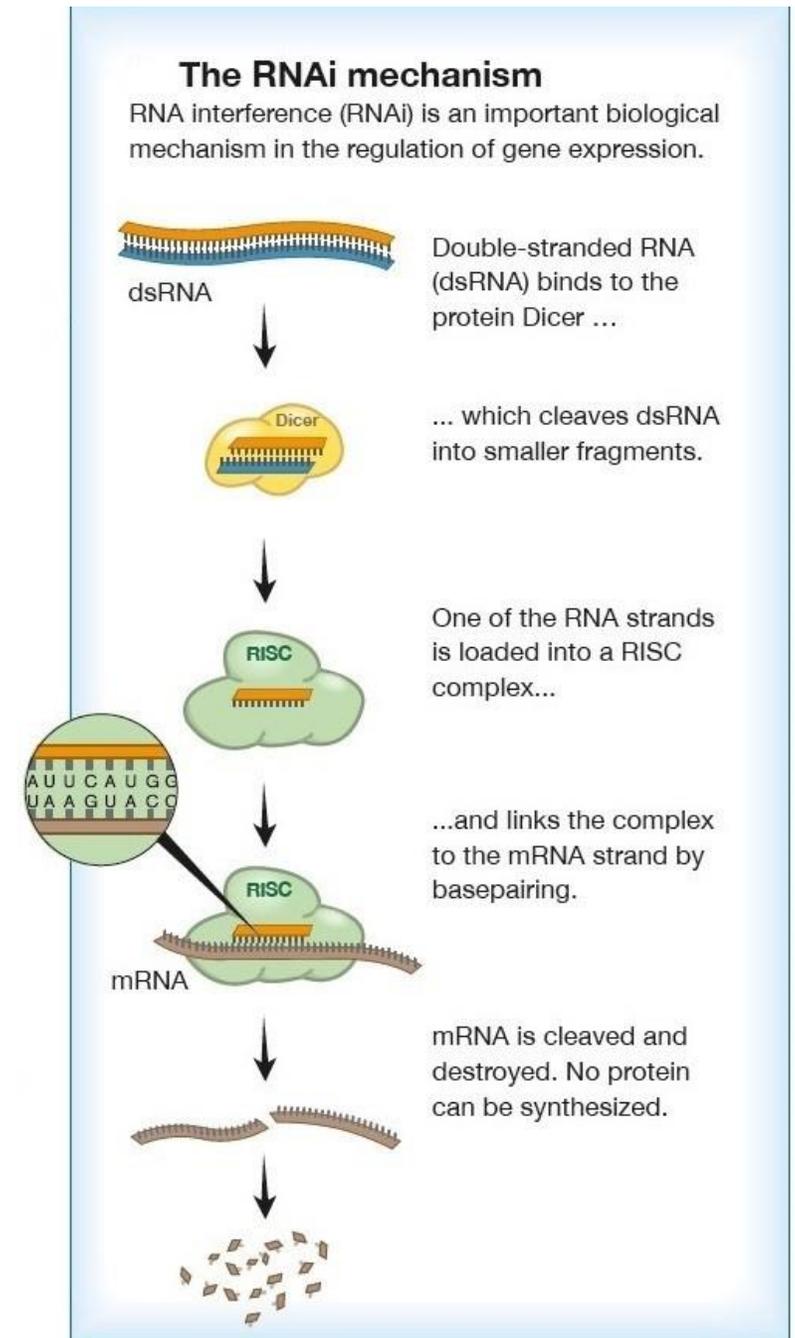
Come conseguenza la traduzione si blocca o l'mRNA è degradato

<https://www.youtube.com/watch?v=t5jroSCBBwk>



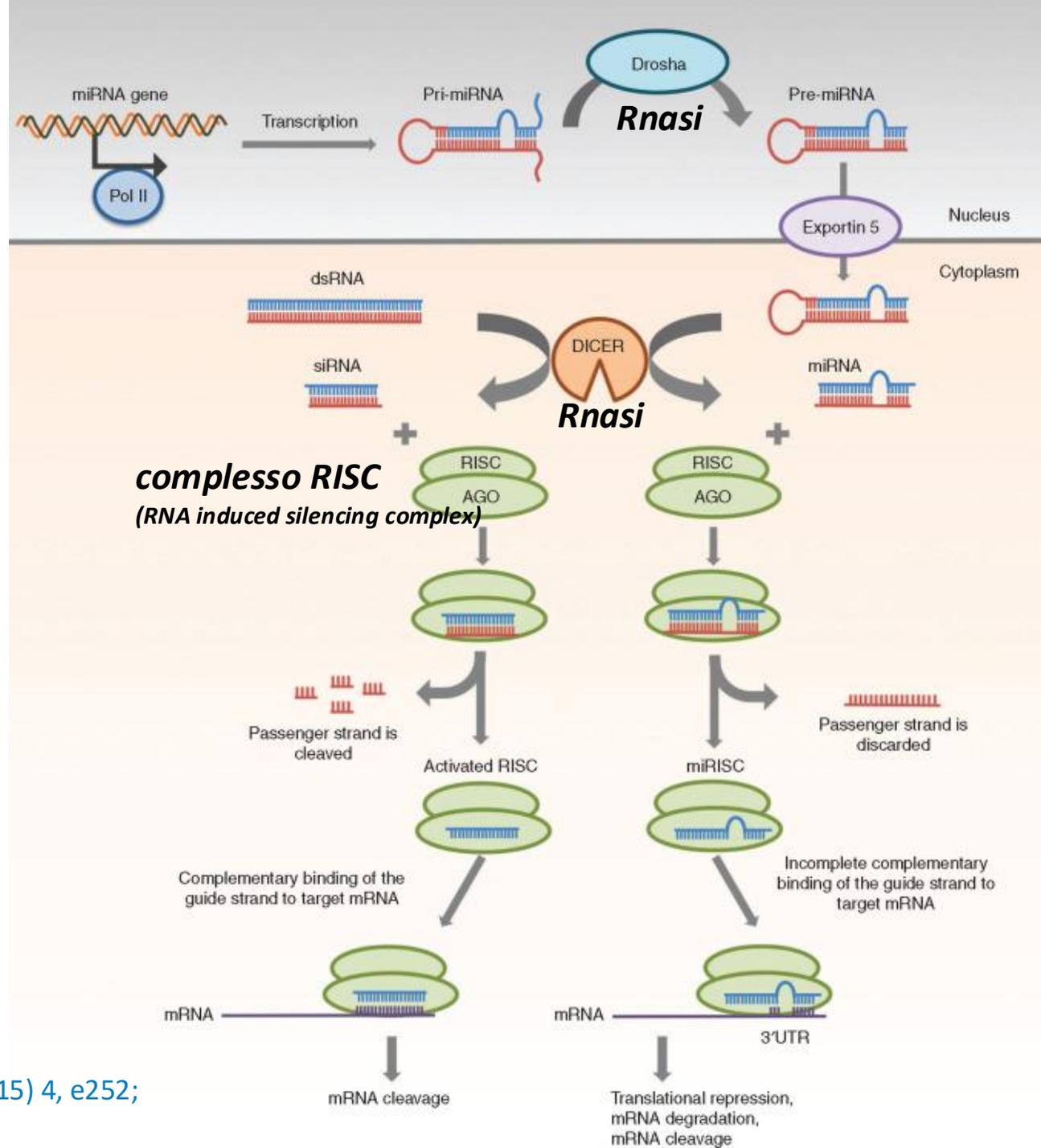
siRNA

Le **molecole di RNA a doppio filamento** sono substrato di enzimi chiamati DICER (dove vengono tagliati in frammenti più piccoli) che lo processano per formare **siRNA (small interference RNA, single strand)**. Una volta sul complesso **RISC (RNA-Induced silencing complex)** possono silenziare sequenze complementari inducendo il taglio e degradazione della molecola bersaglio.



siRNA vs. miRNA

- siRNAs and miRNAs share many similarities, both are short duplex RNA molecules that exert gene silencing effects at the post-transcriptional level by targeting messenger RNA (mRNA)
- The major difference between siRNAs and miRNAs is that the former are highly specific with only one mRNA target, whereas the latter have multiple targets.
- Both are short RNA duplexes that target mRNA(s) to produce a gene silencing effect, yet their mechanisms of action are distinct.

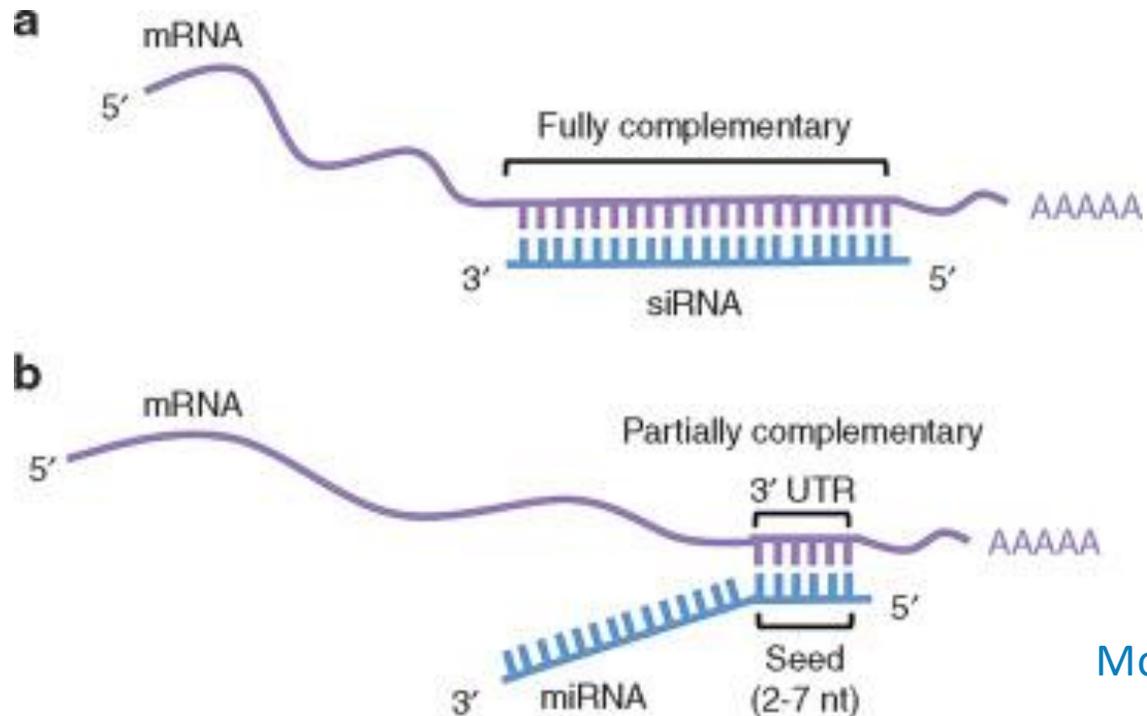


Passenger strand

Guide strand

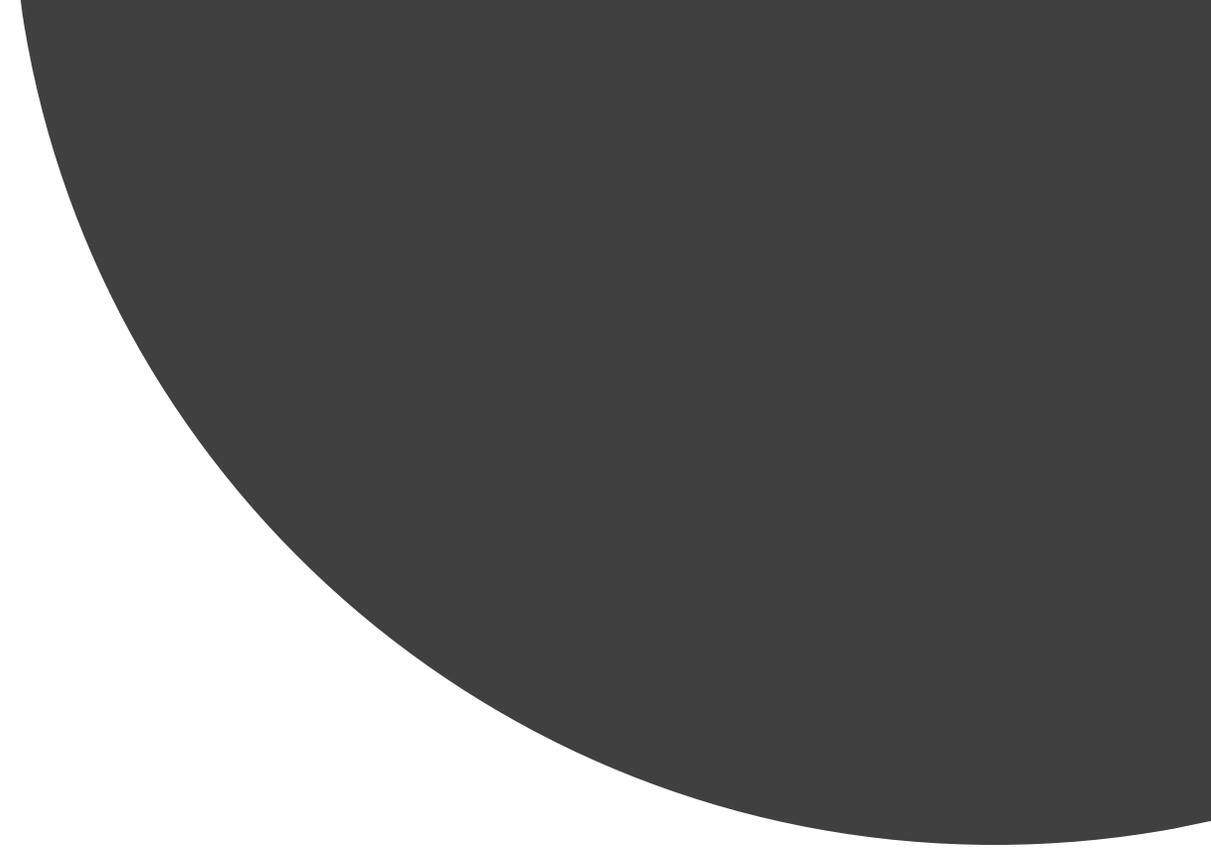
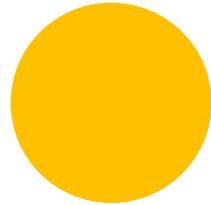
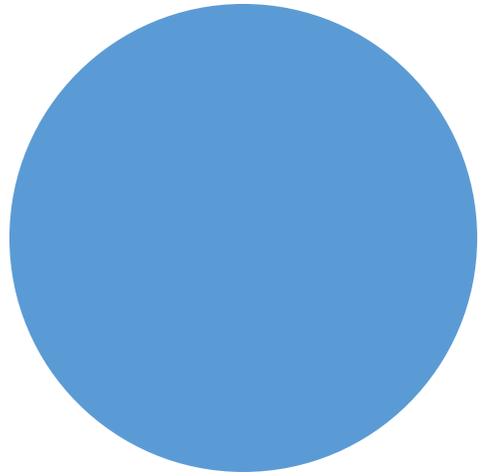
Molecular Therapy—Nucleic Acids (2015) 4, e252;

	siRNA	miRNA
Prior to Dicer processing	Double-stranded RNA that contains 30 to over 100 nucleotides	Precursor miRNA (pre-miRNA) that contains 70-100 nucleotides with interspersed mismatches and hairpin structure
Structure	21-23 nucleotide RNA duplex with 2 nucleotides 3'overhang	19-25 nucleotide RNA duplex with 2 nucleotides 3'overhang
Complementary	Fully complementary to mRNA	Partially complementary to mRNA, typically targeting the 3' untranslated region of mRNA
mRNA target	One	Multiple (could be over 100 at the same time)
Mechanism of gene regulation	Endonucleolytic cleavage of mRNA	Translational repression; Degradation of mRNA; Endonucleolytic cleavage of mRNA (rare, only when there is a high level of complementary between miRNA and mRNA)
Clinical applications	Therapeutic agent	Drug target Therapeutic agent Diagnostic and biomarker tool



siRNA is usually fully complementary to the coding region of its target mRNA; miRNA is partially complementary to its target mRNA. Complementary binding usually occurs at the seed region (nucleotides (nt) 2–7 of the 5' end) of miRNA and the 3' UTR of the target mRNA.

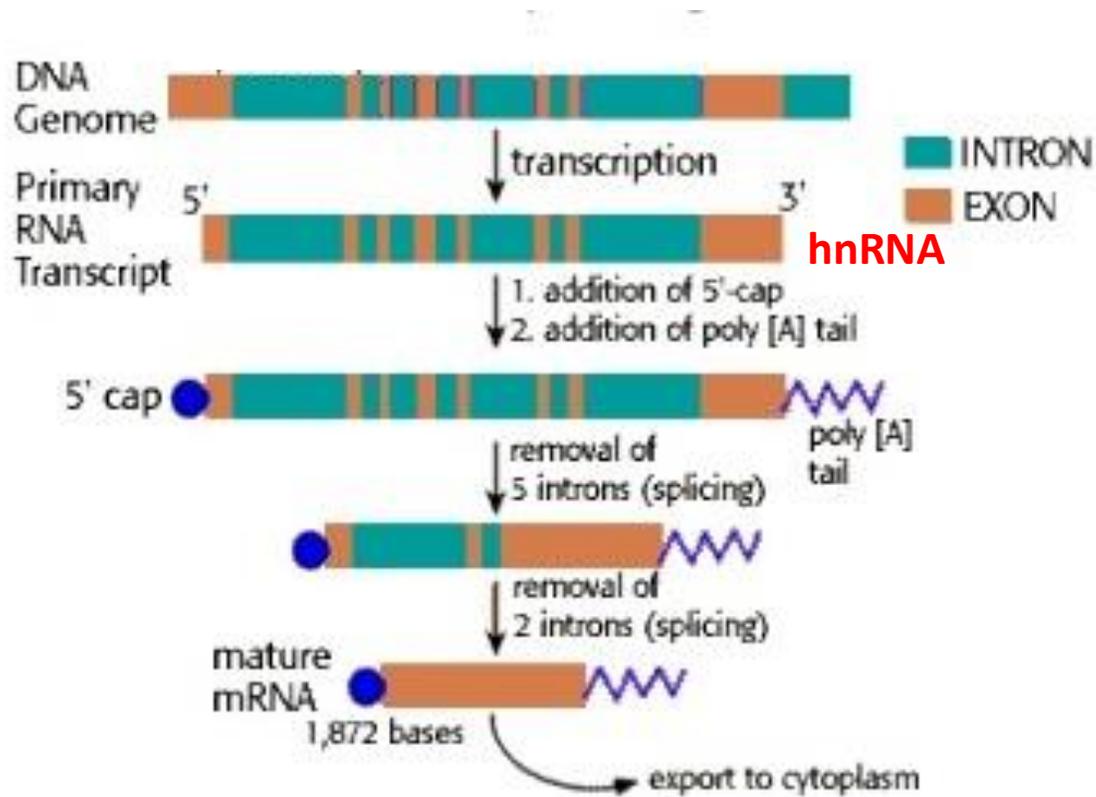
[Molecular Therapy—Nucleic Acids \(2015\) 4, e252;](#)



*Processamento e
maturazione mRNA*



Processamento e modificazioni degli mRNA



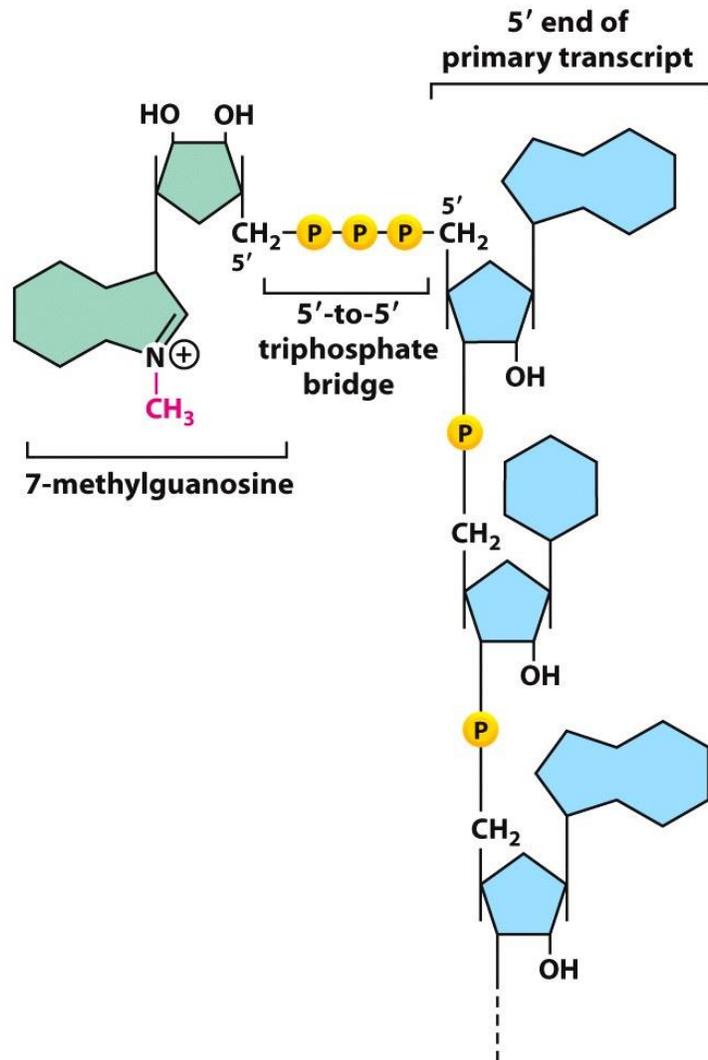
hnRNA: heterogeneous nuclear RNA

- La maturazione del mRNA nel **nucleo** prevede:
1. Creazione di un «cap» nell'estremità 5' («capping»)
 2. Aggiunta di una coda poli-A 3'
 3. Eliminazione degli introni («splicing»)
 4. Altre modificazioni post-trascrizionali («editing»)



Dopo si trasferisce **al citoplasma** per continuare con il processo di traduzione

«Capping»: aggiunta del cap al 5'

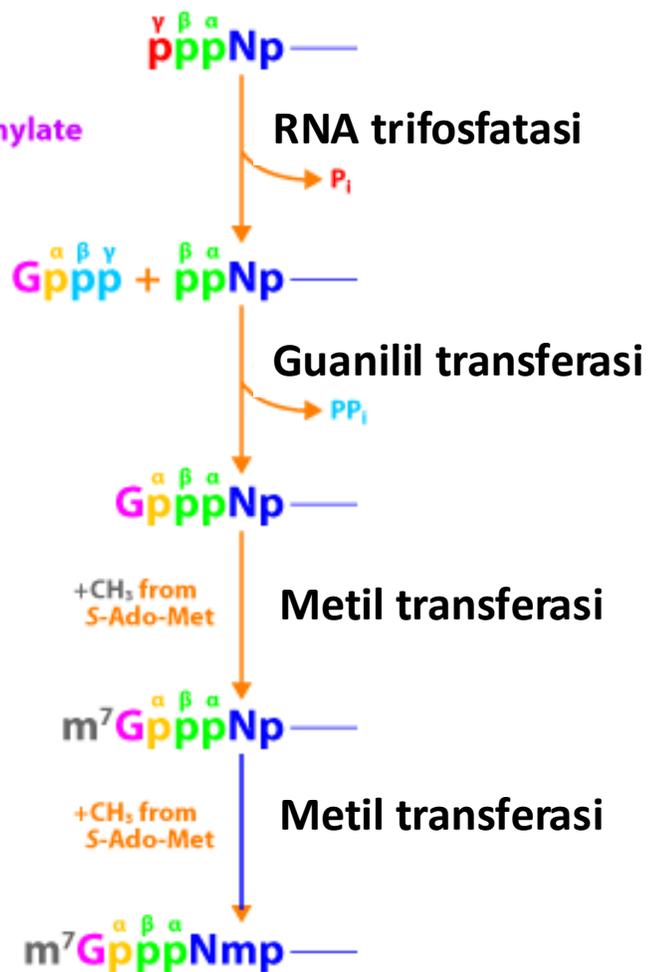
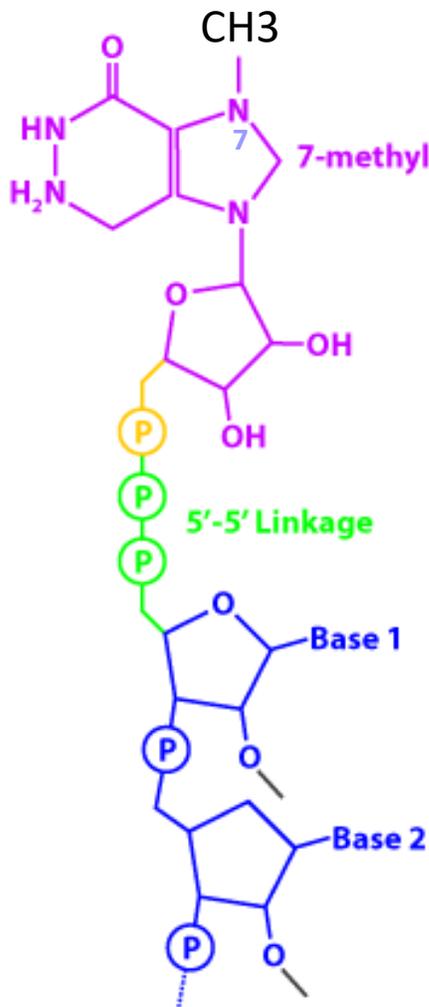


Il capping consiste nella aggiunta di uno specifico nucleotide, la **7-metilguanossina (m7G)** all'estremità 5' attraverso un **legame trifosfato 5'-5'**.

Questo legame è resistente all'azione delle 5' esoribonucleasi, aumentando la stabilità (protezione)

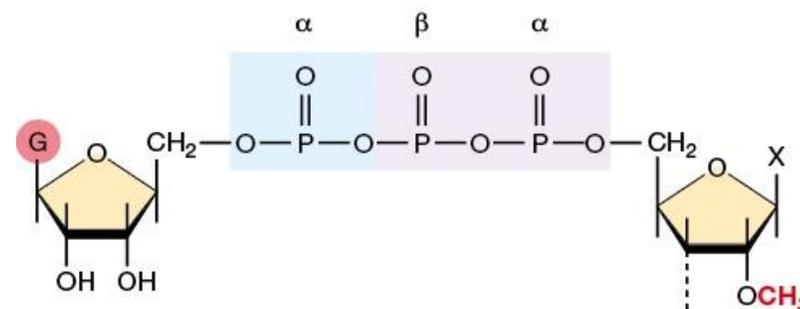
- proteggere e riconosce l'estremo 5' del hnRNA.
- aumenta l'efficienza di splicing e traduzione.
- facilita il trasporto del mRNA al citoplasma

«Capping»: aggiunta del cap al 5'



L'aggiunta del cap prevede **4 step enzimatici**:

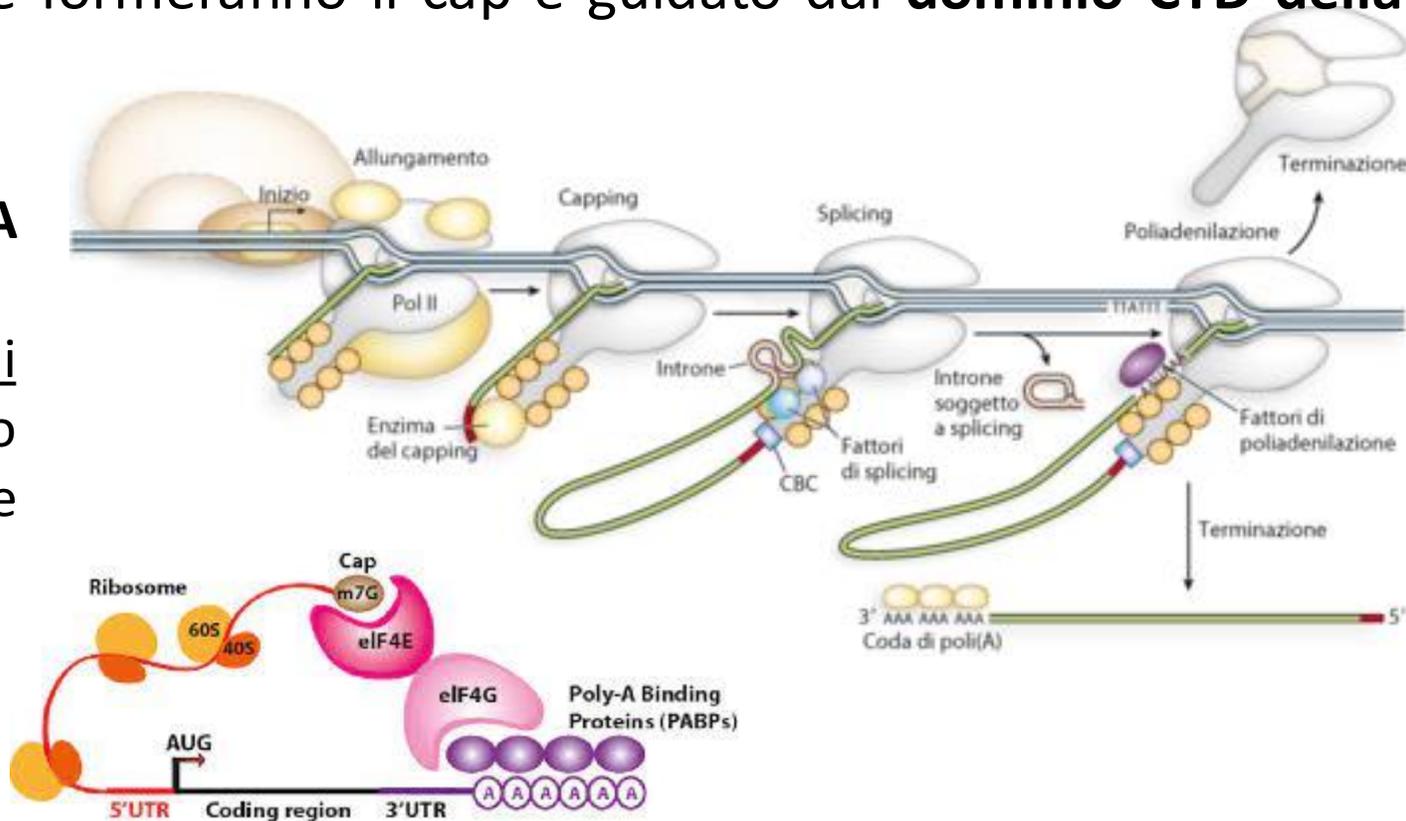
1. Una **RNase trifosfatasi** rimuove il γ -fosfato della estremità 5' del trascritto nascente
2. Una **guanilil transferasi** aggiunge un GMP (che deriva da **GTP**) al difosfato rimasto formando un legame 5'-5'
3. Una **metil transferasi** trasferisce un gruppo metilico (CH₃) dalla S-adenosil-metionina all'azoto in posizione 7 della guanosina aggiunta nella reazione 2 (come GMP)
4. Un'altra **metil transferasi** aggiunge un altro gruppo metilico in **posizione 2'-OH del primo nucleotide del trascritto**



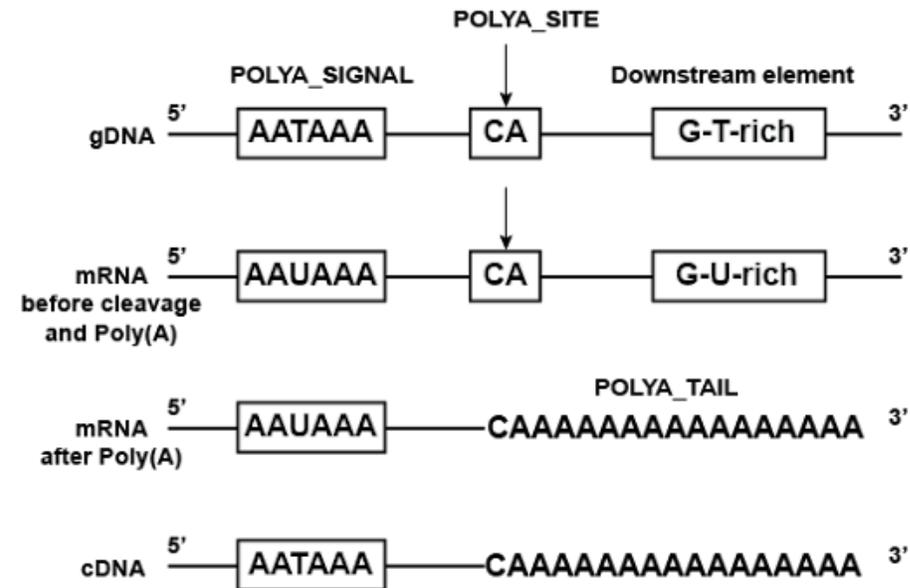
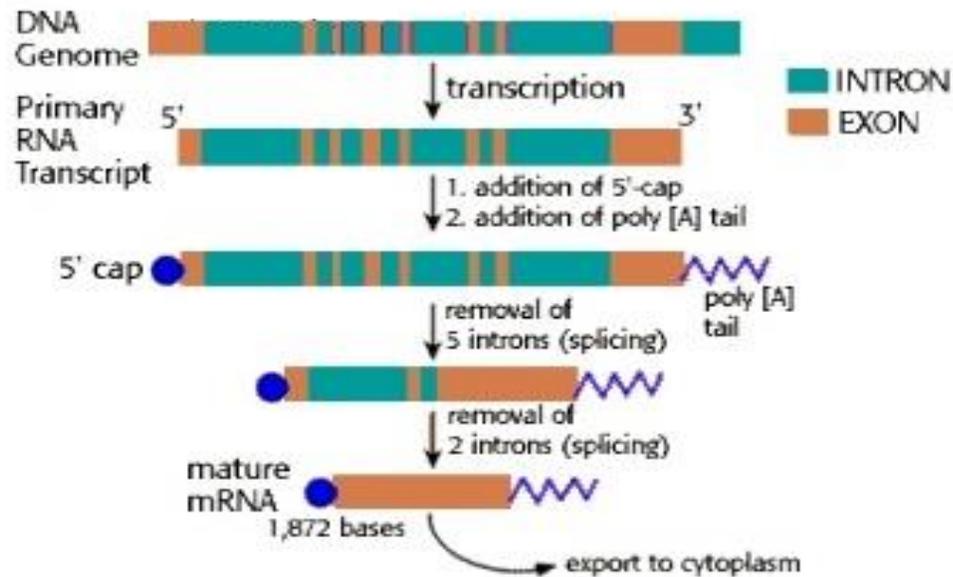
«Capping»: aggiunta del cap al 5'

- L'aggiunta del cap avviene nelle prime fasi della trascrizione quando il trascritto raggiunge 20-40 nt. Avviene prima dell'aggiunta del poliA e lo splicing.
- L'assemblaggio dei componenti che formeranno il cap è guidato dal dominio CTD della pol II dopo che è stato fosforilato

- Il cap facilita il trasporto dell'mRNA maturo al citoplasma
- Il cap aumenta l'efficienza di traduzione attraverso il reclutamento di un fattore chiamato eIF4E che legandosi al CAP recluta il ribosoma



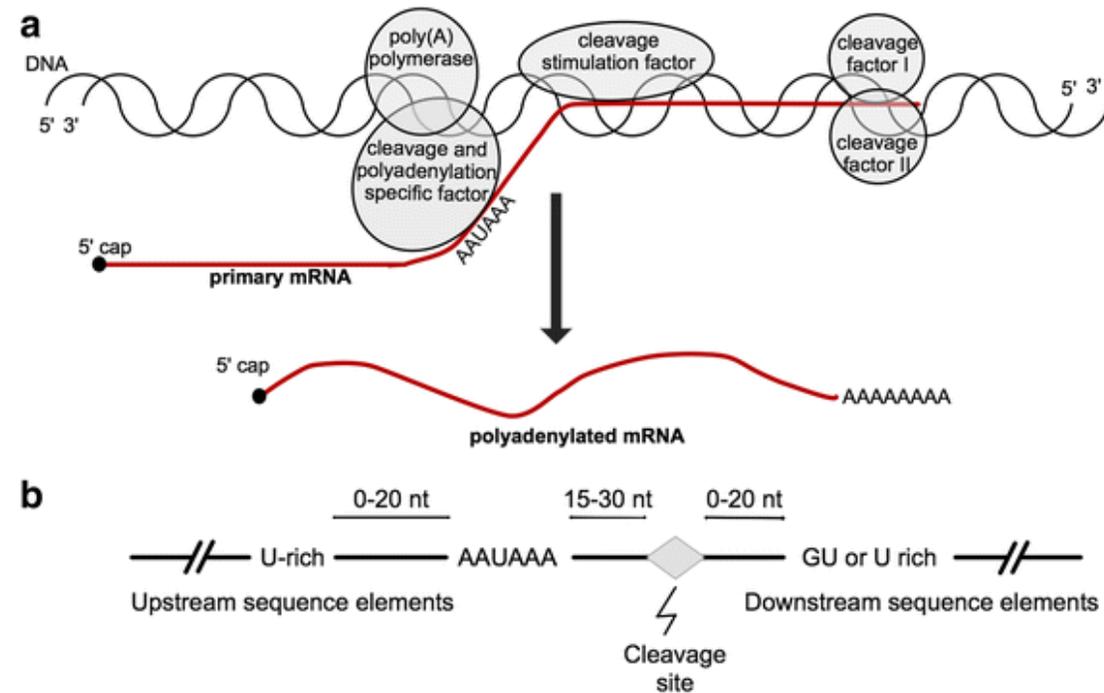
«Poli-adenilazione»: aggiunta del poli-A al 3'



- Alla fine della trascrizione la Pol II trova la sequenza chiamata «**segnale di poliadenilazione**».
- E' costituita da una sequenza di **6 nt AAUAAA**, **5-30 nt a monte del sito di taglio e poliadenilazione del mRNA**, eventi che determinano la terminazione della trascrizione.

«Poliadenilazione»: aggiunta del poli-A al 3'

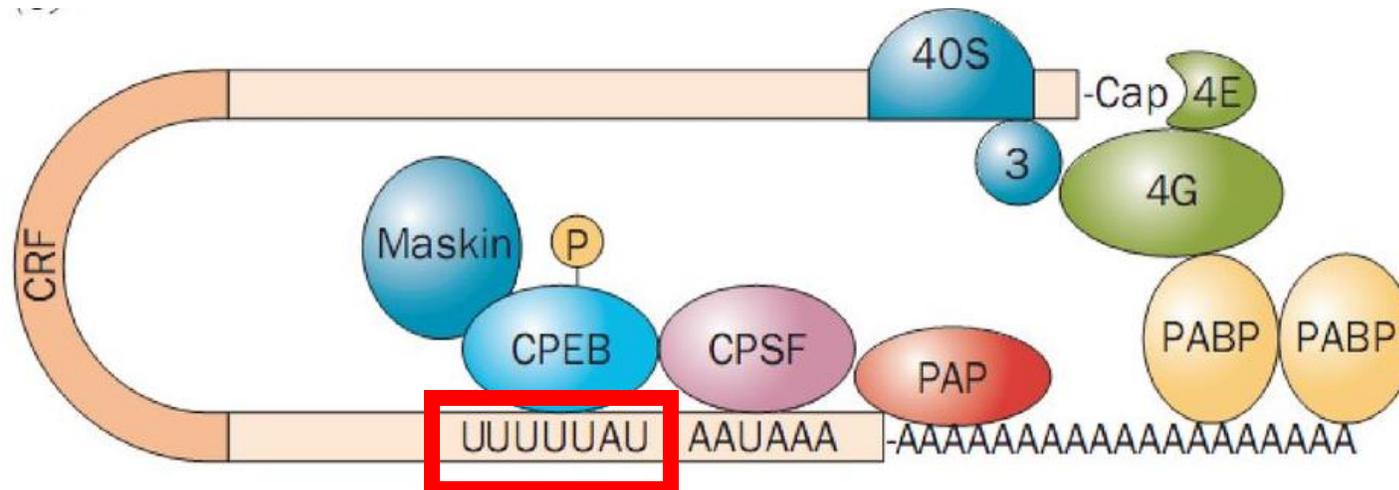
- Quando la **Pol II** arriva al segnale di poliadenilazione, il suo **dominio CTD** recluta due complessi proteici:
 - CPSF** (*Cleavage and Poly(A)denylation Specificity Factor*). Questo si lega al segnale di poliadenilazione **AAUAAA**
 - CstF** (*Cleavage Stimulation Factor*). Si lega ad una sequenza **20-30 nt a valle** del sito di poliadenilazione ricca in **GU o in U**. Questo legame è necessario per il processo e aumenta l'efficienza della poliadenilazione



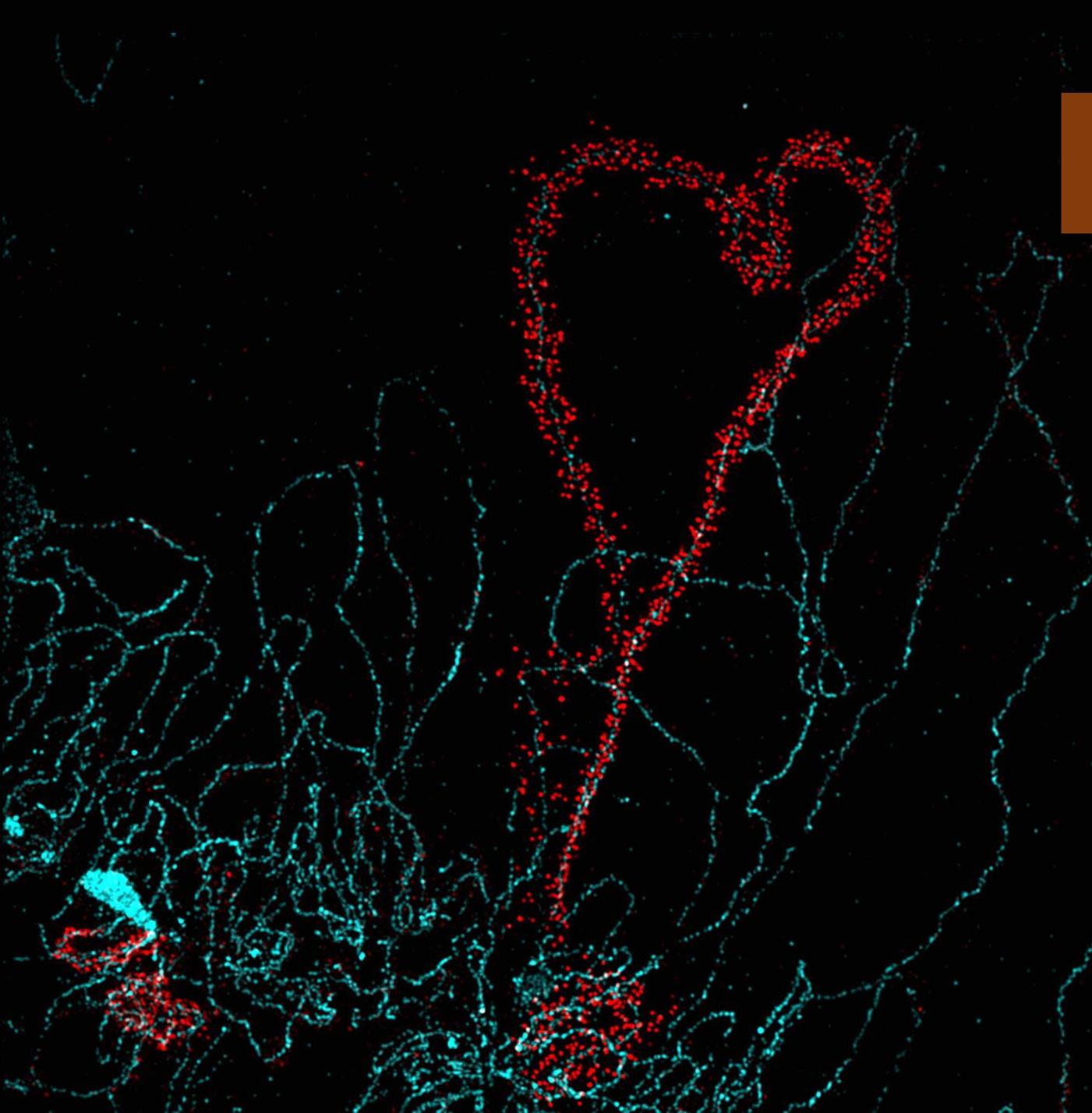
CPSF e CstF agiscono in modo cooperativo insieme ai fattori di taglio **CFI** e **CFII**, e alla **poli(A) polimerasi** che catalizza l'aggiunta delle A. Il **CTD della RNA pol II** sembra essere necessario per la poliadenilazione.

Poliadenilazione e turnover della coda poli(A)

- Una volta **nel citoplasma** la coda di **poli-A** si **accorcia** per l'azione di Rnasi e si **allunga** per l'azione di una poli(A) polimerasi citosolica.
- La tendenza è l'accorciamento della coda
- L'attività della poli(A) polimerasi (PABP) citoplasmatica è determinata dalla presenza di un **segnale di poliadenilazione *a monte* chiamato CPE** (Cytoplasmic Poly(A) Element) che è costituito dalla sequenza: **UUUUUAU**



«Splicing»



Newt chromosome

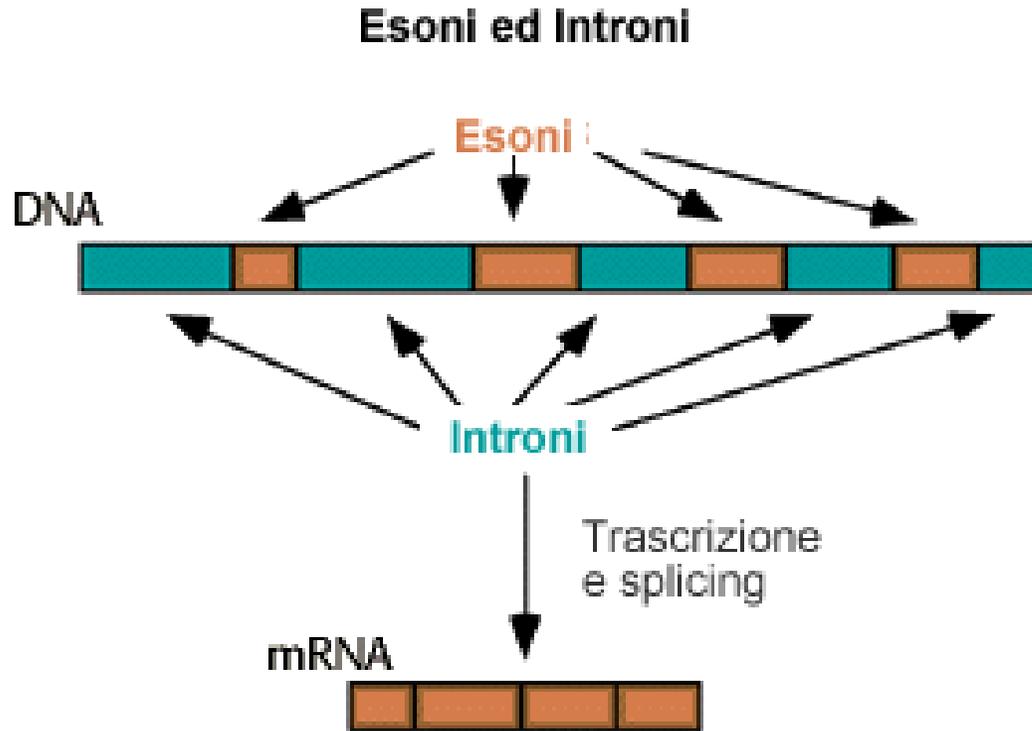
RNA splicing factor, Polymerase II.

The "heart" is a single gene or transcription unit. The beginning of the gene is at the bottom. As RNA transcripts are made going up and around the heart you can see the **splicing factor** gets farther away from the **DNA strand** indicating the lengthening RNA strand.

Joe Gall (Carnegie Institute)

Jim Powers, Light Microscopy Imaging Center

«Splicing»



I geni eucarioti sono **discontinui**, formati da **introni ed esoni**



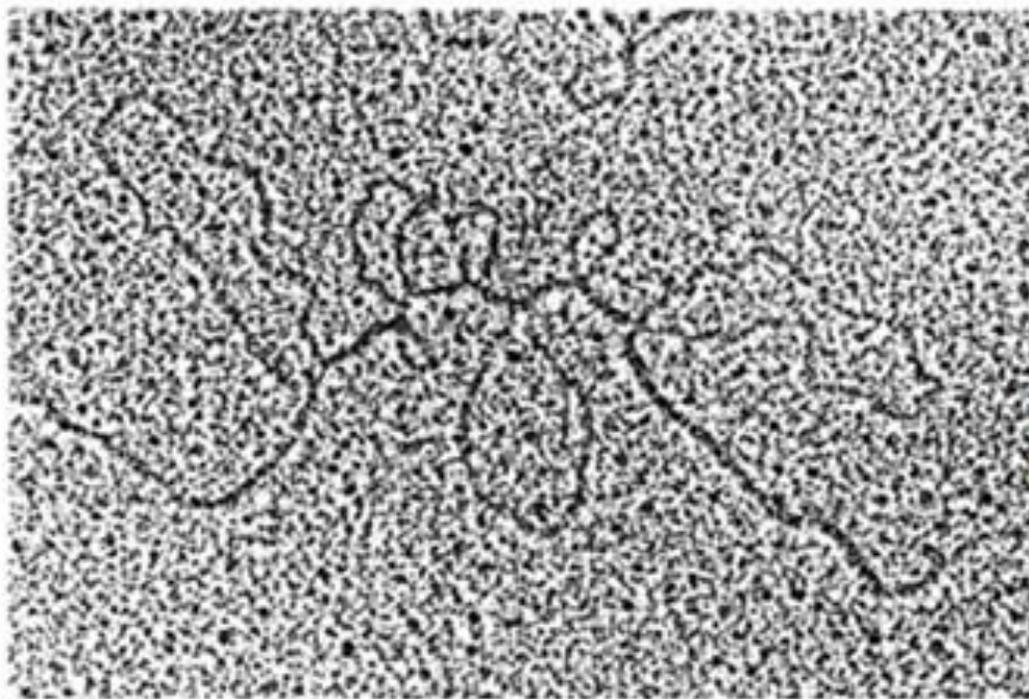
L'esistenza degli introni fu dimostrata da **P.A. Sharp** e **R.J. Roberts** in 1977, mediante una tecnica chiamata **R-looping** nella quale si ibridano una molecola di mRNA maturo a singolo filamento e il suo stampo di DNA.



Premio Nobel Medicina 1993

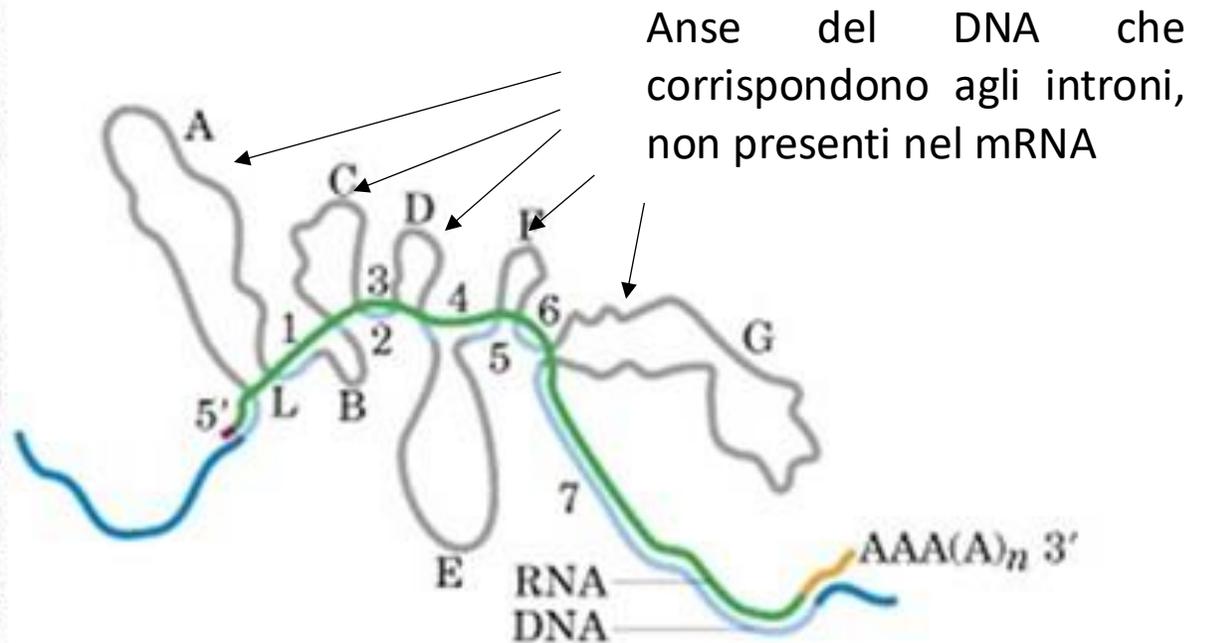
«Splicing»

Molecole ibride DNA-RNA



(a)

Microscopio elettronico



Anse del DNA che corrispondono agli introni, non presenti nel mRNA

(b)

Interpretazione dell'immagine

«Splicing»

- Il **numero di introni** all'interno dei geni è **variabile nei diversi geni ed organismi**:
 - lievito pochi geni con introni;
 - umani da uno a centinaia all'interno di un gene (mediamente 11-12 introni per gene)
- Gli **introni sono più lunghi degli esoni** che occupano un 5% dello spazio occupato dagli introni
- Sono **presenti principalmente negli mRNA**, ma anche nei geni per rRNA e tRNA

«Splicing»

Tabella 14.1 Introni nei geni di alcuni organismi eucariotici. Le statistiche sono calcolate considerando un solo trascritto per gene, scegliendo quello di lunghezza maggiore. I dati sono tratti dalle relative banche dati di riferimento (Uomo, Topo, Drosophila, C. elegans da www.ncbi.nih.gov; Fugu da www.ensembl.org; Arabidopsis da www.arabidopsis.org; S. cerevisiae da www.yeastgenome.org).

Organismo	Numero di geni con almeno 1 introne	% geni con introni	Numero medio di esoni/gene	Lunghezza media mRNA (nt)	Lunghezza media totale degli introni	% regioni esoniche nel trascritto precursore
Uomo	17755	85	11	3273	60555	5
Topo	18311	79	10	2895	47718	6
Fugu	17876	97	12	1670	6058	22
Drosophila	11630	83	4	2173	4558	36
C. elegans	19558	95	6	1265	1705	43
Arabidopsis	22039	70	5	1580	911	71
S. cerevisiae	329	5	1	1352	340	99

Ipotesi sul meccanismo di splicing

- Processo discontinuo

L'RNA pol II trascrive e quando trova un introne salta all'esone successivo

- Processo continuo

L'RNA pol II trascrive un **RNA precursore** che includeva gli introni che dovevano essere posteriormente eliminati seguendo un meccanismo di «taglia e cucci»



Ipotesi supportata per la **esistenza degli hnRNA (heterogeneous nuclear RNA)** che si trovano all'interno del nucleo e che contengono ancora le sequenze introniche

Meccanismi di splicing

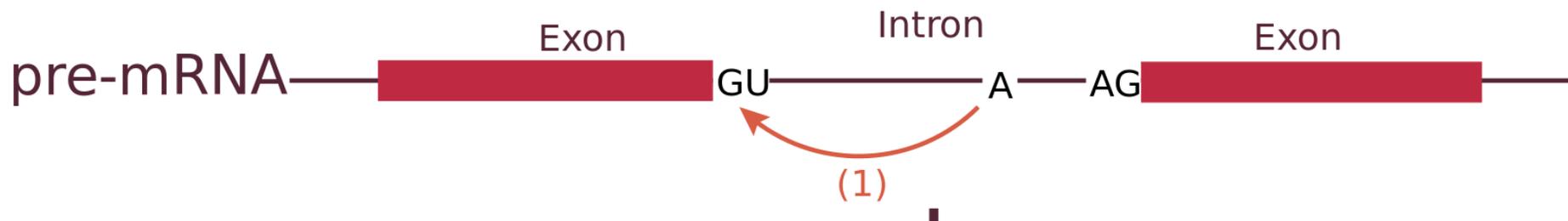
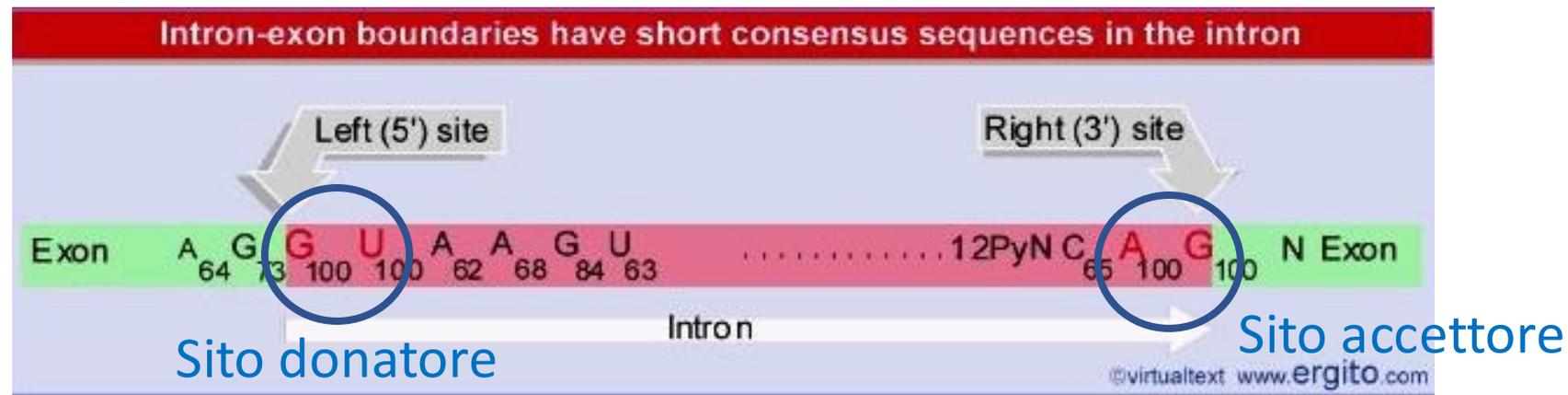
1. Splicing Nucleare
2. Autosplicing:
 - a. Introni di gruppo I
 - b. Introni di gruppo II
3. Splicing mediato da endonucleasi e ligasi



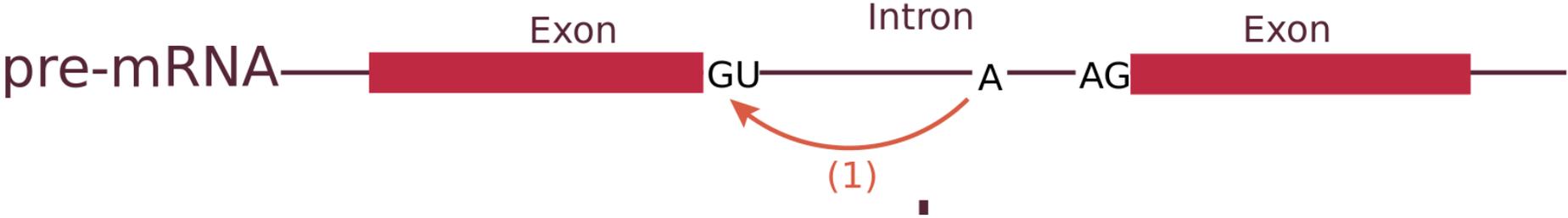
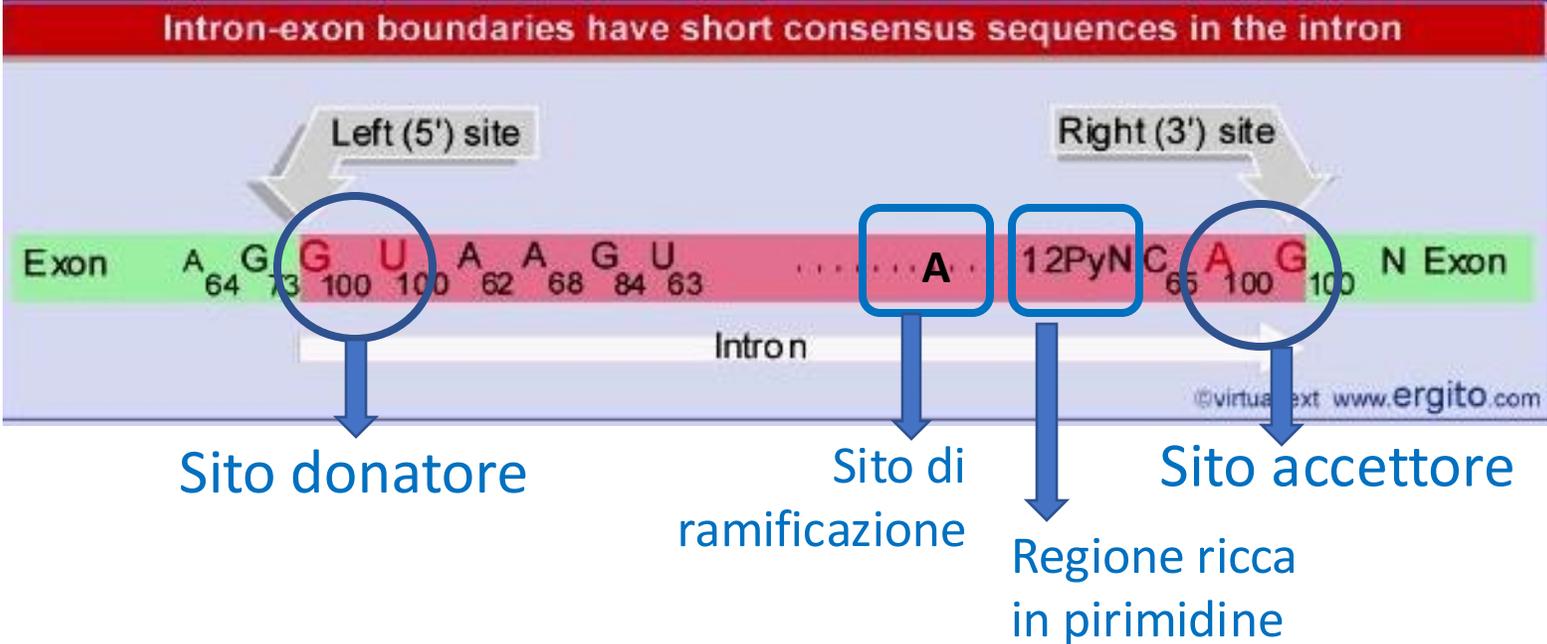
Splicing Nucleare

Meccanismi di splicing: Splicing NUCLEARE

- Il sito di splicing degli introni è segnato dalla presenza del **dinucleotide GU all'inizio** del introne e del **dinucleotide AG alla fine** del'introne.

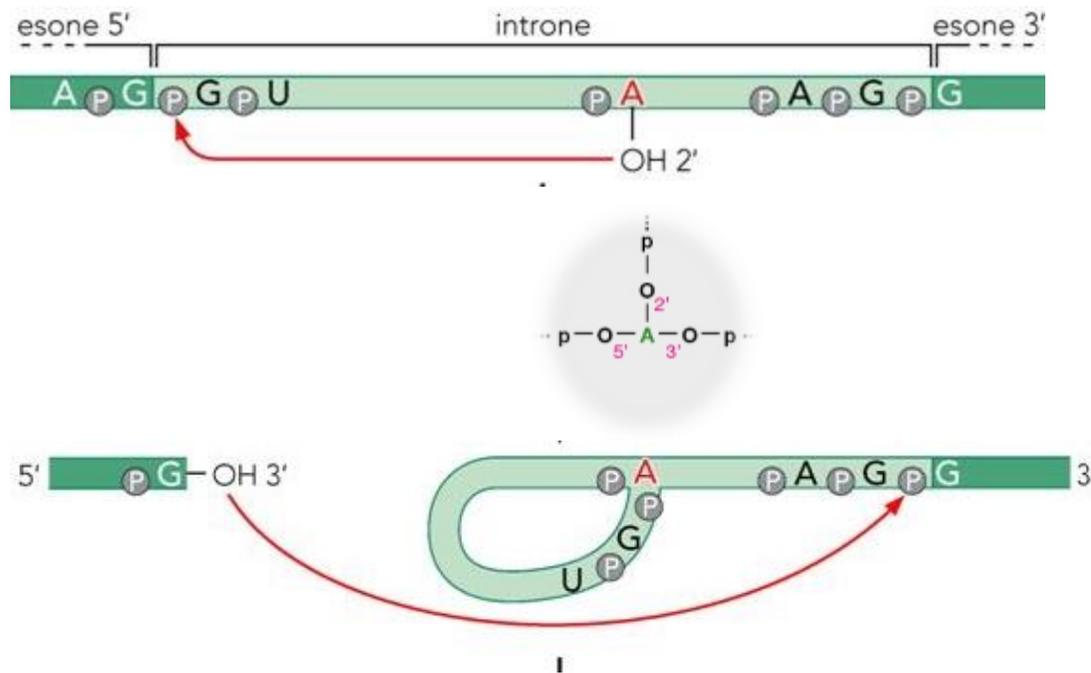


Meccanismi di splicing: Splicing NUCLEARE



Meccanismi di splicing: Splicing NUCLEARE

- Due successive reazioni di TRANS-ESTERIFICAZIONE



Prima Reazione Trans-esterificazione:

Attacco nucleofilo del **2'OH della A** presente nel **sito di ramificazione al fosfato in posizione 5' del dinucleotide GU**.

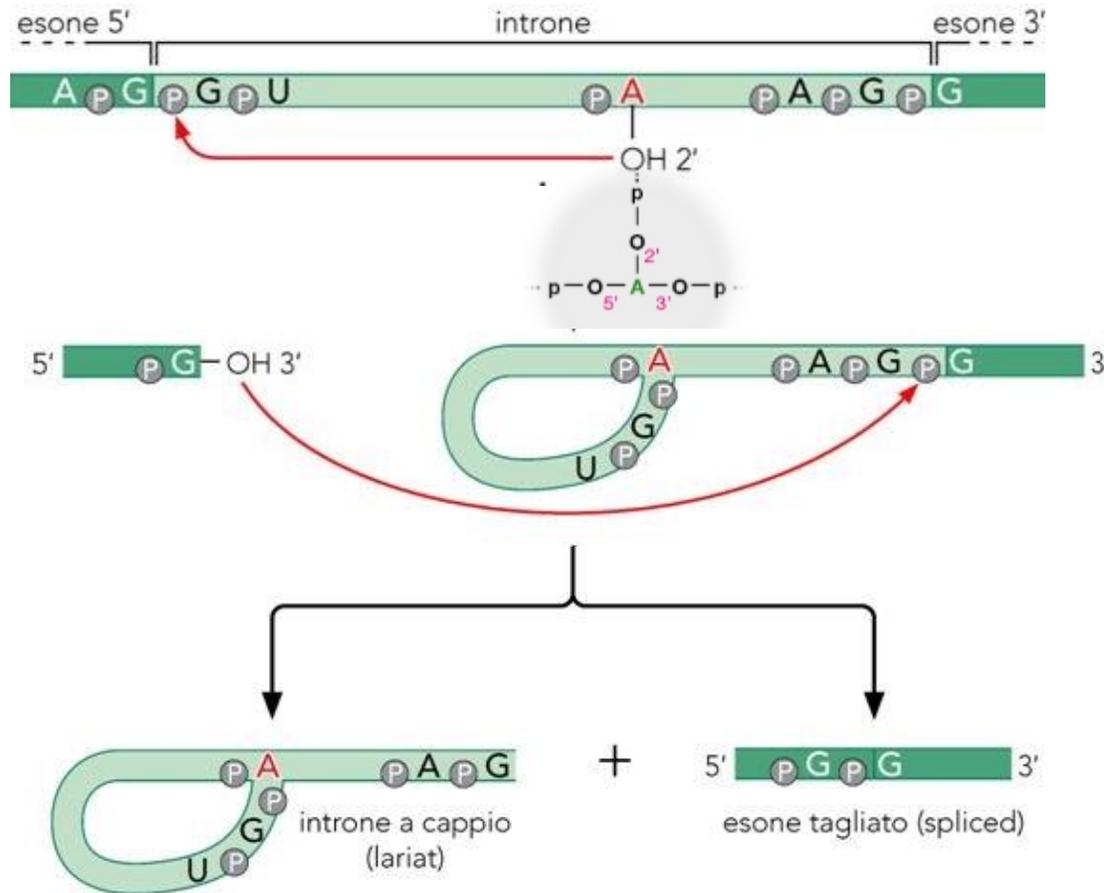
L'adenina è così impegnata nella formazione di **3 legami fosfodiesterici** ed è per questo che si chiama sito di ramificazione.

L'introne, legato all'esone successivo, assume forma di cappio

Contemporaneamente si crea **un taglio al 5' dell'introne** che lascia libero un **3'OH** nella estremità del esone a monte.

Meccanismi di splicing: Splicing NUCLEARE

- Due successive reazioni di TRANS-ESTERIFICAZIONE



Seconda Reazione Trans-esterificazione:

Attacco nucleofilo del **3'OH del esone *a monte*** sul **5'P dell'esone *a valle***. Questa reazione porta alla concatenazione dei due esoni e rilascio dell'introne a cappio

L'introne verrà poi linearizzato da un enzima di de-ramificazione e degradato

Meccanismi di splicing: Splicing NUCLEARE

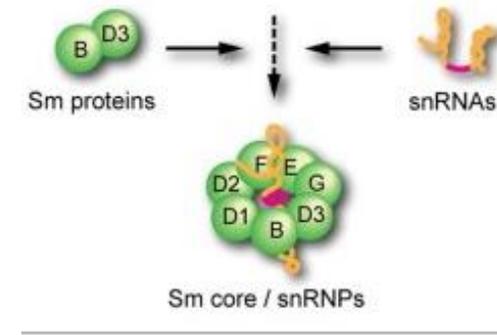
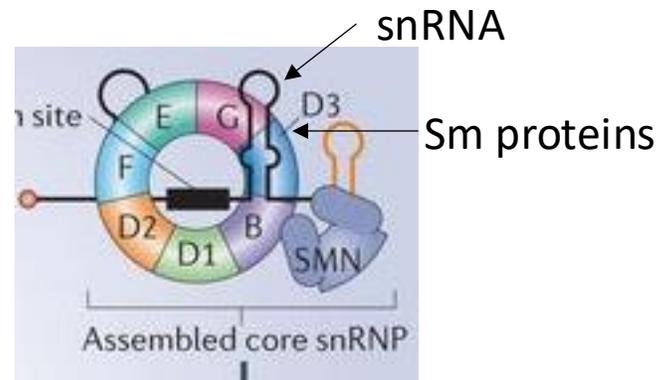
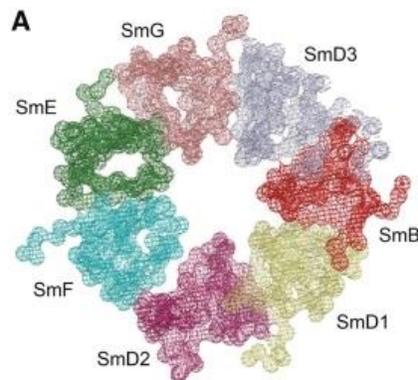
- Il meccanismo di splicing è mediato da un complesso chiamato **spliceosoma**
- Le reazioni enzimatiche coinvolte in questo **processo di splicing non consumano e non forniscono energia.**
- La **energia consumata (ATP)** durante lo splicing viene **dall'assemblaggio del SPLICEOSOMA e dalla specificità del riconoscimento delle sequenze introniche**

Meccanismi di splicing: Splicing NUCLEARE

Spliceosoma (maggiore)

Complesso responsabile del processo di splicing:
200 proteine + 5 RNA

snRNA (small nuclear RNA)
U1, U2, U4, U5 e U6



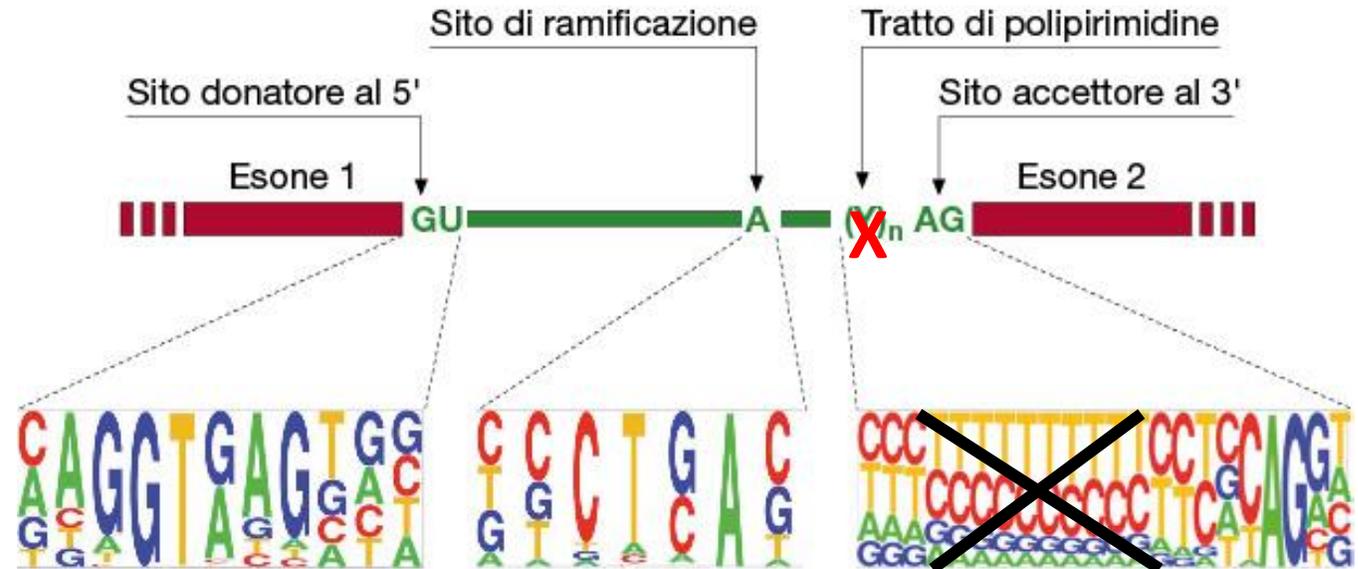
Si trovano associati a proteine formando complessi ribonucleoproteici : **snRNP** (small nuclear RiboNucleoProtein, «snurp»), che contengono **1-2 snRNA** e **7 proteine Sm** che si legano ad un sito conservato negli snRNA (5'-AAUUUGUGG-3')

Meccanismi di splicing: Splicing NUCLEARE

Spliceosoma minore o U12

proteine + **5 snRNA** :U11, U12, U4atac, U5 e U6atac

- Rimuove un numero piccolo di introni (circa 1000 nell'uomo)
- **Riconosce siti canonici GU/AG e non canonici (AU/AC)**
- L'introni rimossi dallo spliceosoma minore non contengono la sequenza di polipirimidine



Meccanismi di splicing: Splicing NUCLEARE

Spliceosoma

- La **composizione del spliceosoma cambia** in funzione della **fase di splicing attiva**
- La funzione dello spliceosoma è:
 - Riconoscimento dei siti di splicing
 - Avvicinare i siti dove dovranno avvenire le reazioni di transesterificazione nel sito attivo

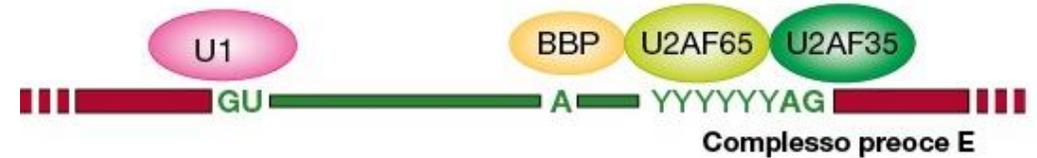
https://www.youtube.com/watch?v=FVuAwBGw_pQ

<https://www.youtube.com/watch?v=aVgwr0QpYNE>

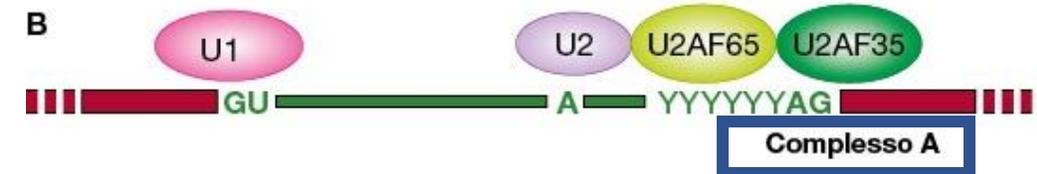
Ciclo d'assemblaggio e funzionamento del spliceosoma

1. **snRNP U1** si appaia attraverso la sua estremità 5' al sito di splicing 5' del introne
1. Proteina **BBP** si lega al sito di ramificazione e le 2 subunità del **U2AF** si legano una al tratto poli-pirimidinico e l'altra al sito di splicing 3'.
3. **snRNP U2** sostituisce BBP spostandolo in modo ATP-dipendente e formando una interazione complementare con la regione del sito di ramificazione, ma senza usare la A implicata nella prima reazione di transesterificazione

Complesso E
riconosce l'introne da rimuovere

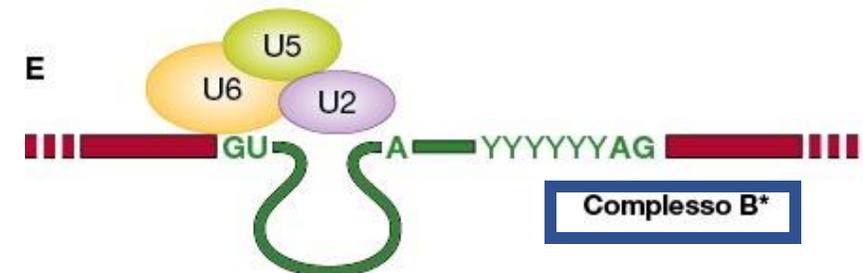
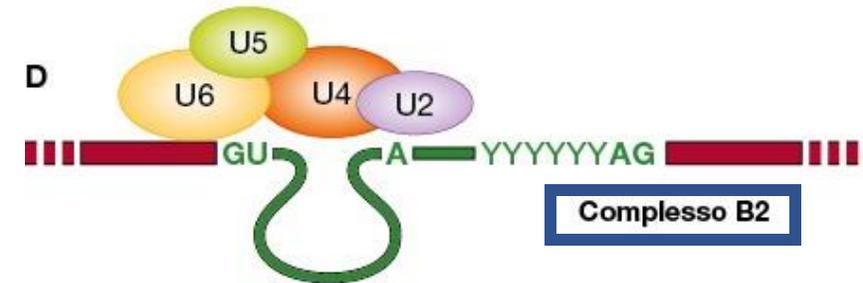
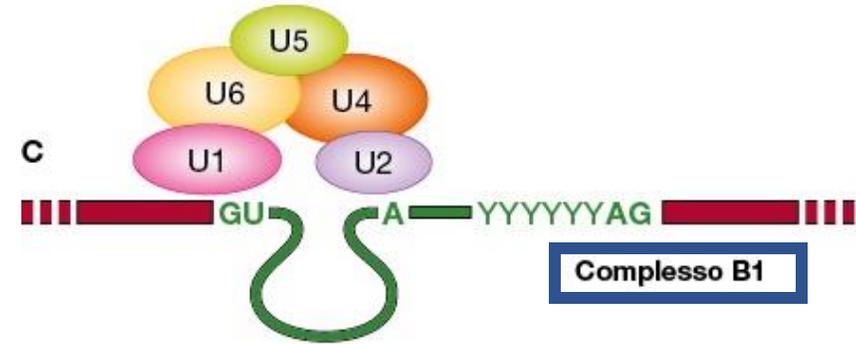


Complesso A
o pre-spliceosoma

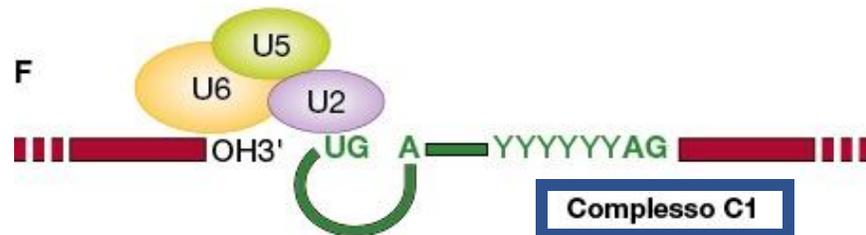
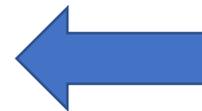


Ciclo d'assemblaggio e funzionamento del spliceosoma

4. La tri-snRNP composta da **snRNP U4/U6 e U5** si assembla sul **Complesso A** inducendo l'avvicinamento tra il sito di splicing al 5' e il sito di ramificazione. Anche il sito di splicing 3' a valle viene avvicinato. Questo complesso, ancora inattivo, si chiama **B1** e contiene **tutte le snRNP**
5. La **snRNP U1** viene rilasciata e rimpiazzata della **snRNP U6** nel sito di splicing al 5', formando il **complesso B2**. Dopo, anche la U4 viene rilasciata permettendo l'interazione U6 e U2 che interagiscono attraverso i rispettivi snRNA. Questo attiva il **complesso B*** (lo spliceosoma) inducendo la prima reazione di transesterificazione, con formazione del **complesso C1**

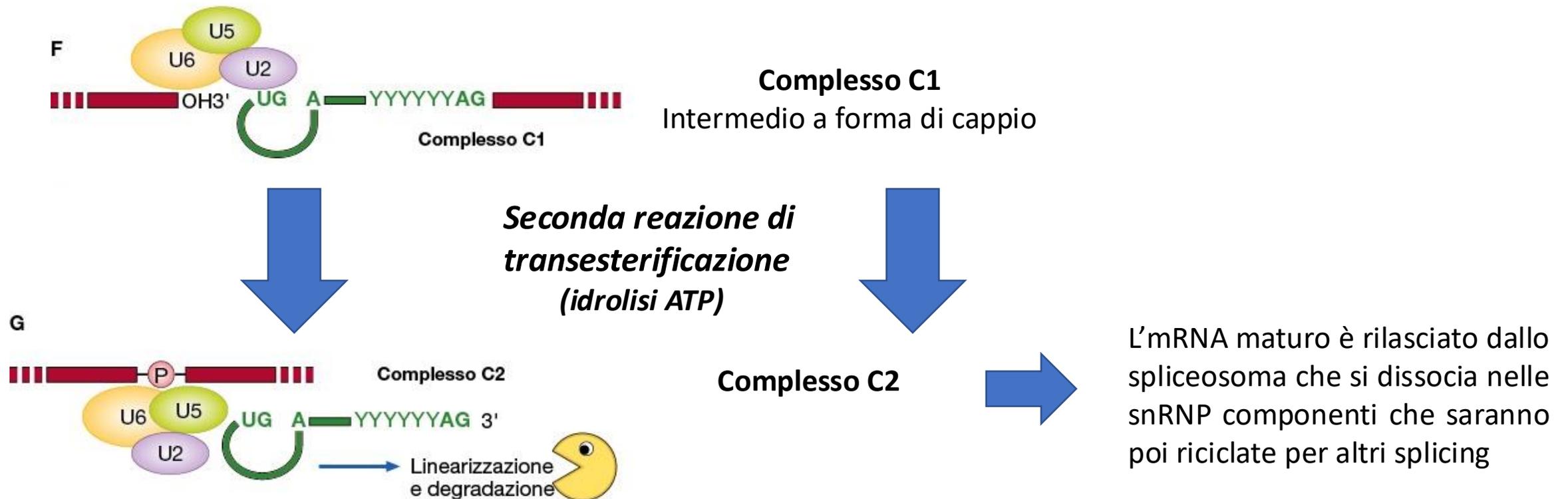


Prima reazione di transesterificazione



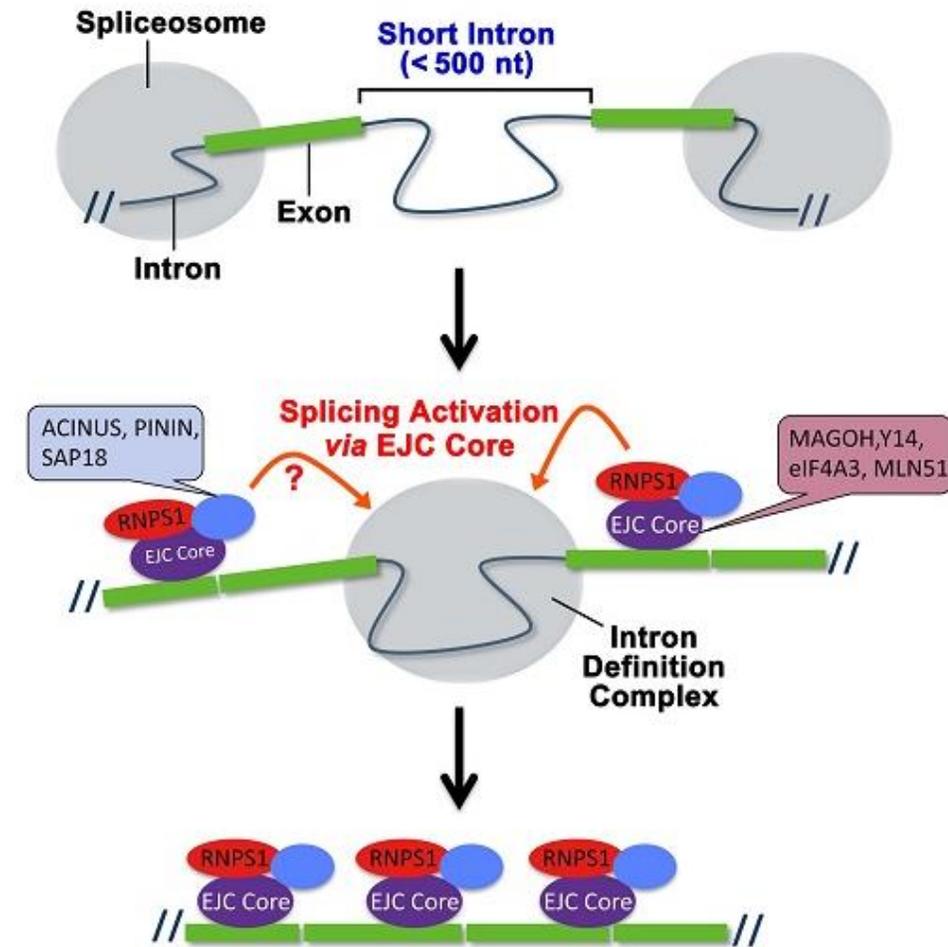
Ciclo d'assemblaggio e funzionamento del spliceosoma

- Si pensa che in questo complesso C1 sia la componente di snRNA che conferisce l'attività catalitica e che porta allo splicing



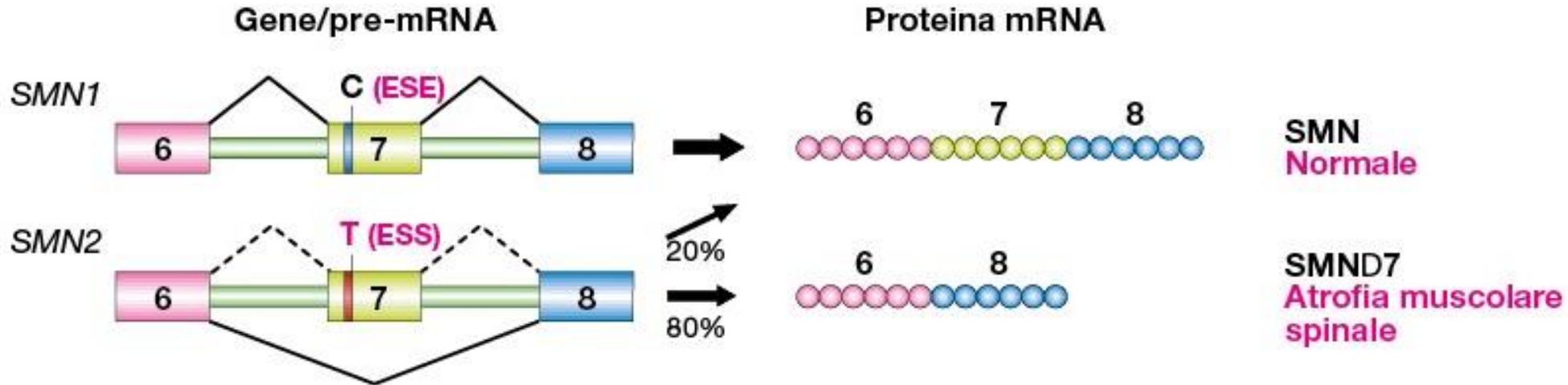
mRNA maturo è associato a mRNP

- L'**mRNA maturo** è associato a proteine chiamate **mRNP** (*messenger ribonucleoproteins*) che controllano l'accuratezza dello splicing, trasporto al citoplasma e l'efficienza di traduzione.
- Un **esempio di mRNP** sono il complesso **EJC** (exon junction complex) che marcano i siti di splicing 24 nt *a monte* delle giunzioni esone-esone
- Alterazioni nel processo di splicing possono portare all'insorgenza di patologie: maggiore è il numero di introni e complesso il macchinario di splicing, più probabilità ci sono di alterazioni nel processo.



Patologie associate allo splicing

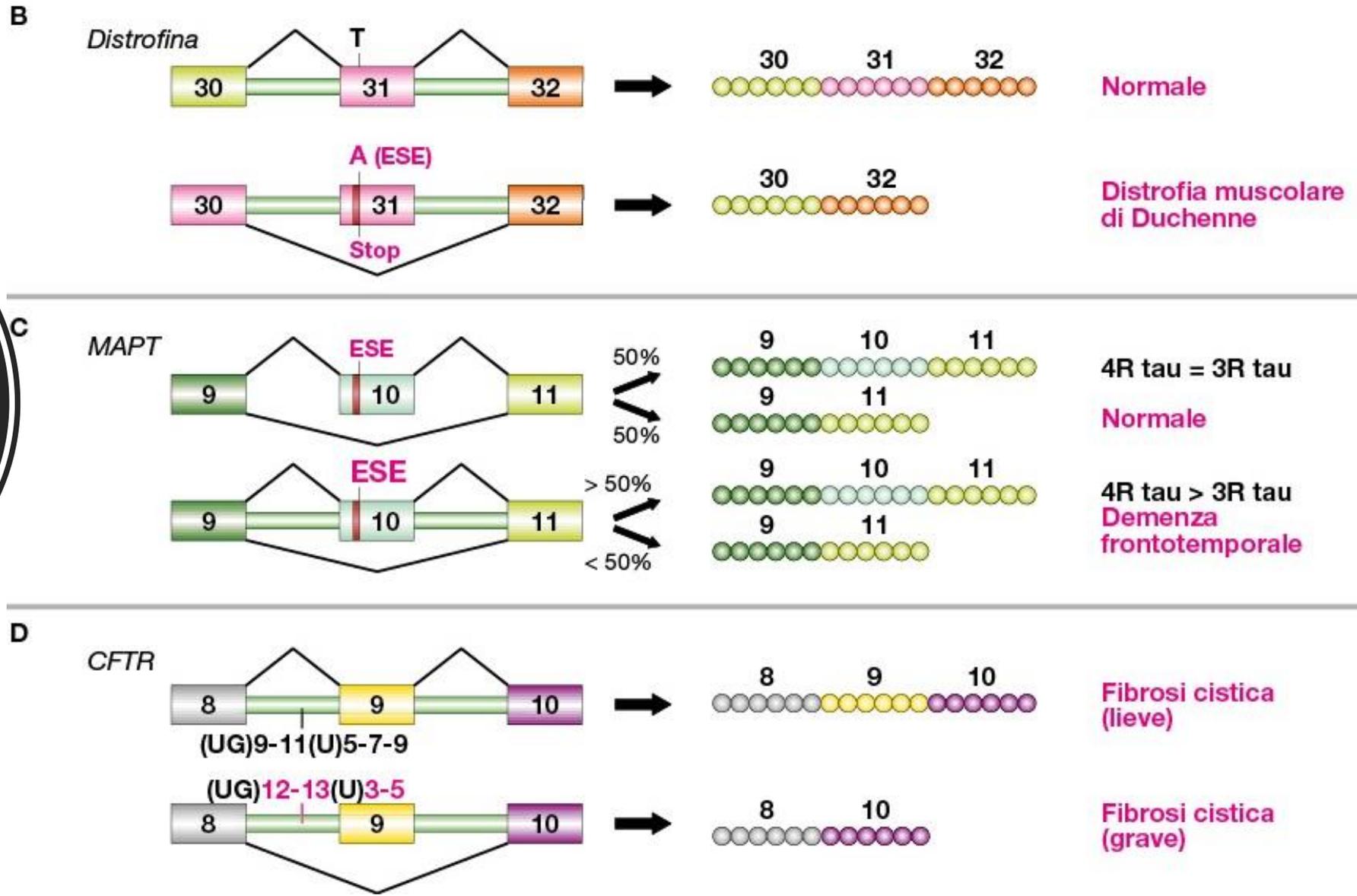
SMA : Spinal Muscular Atrophy

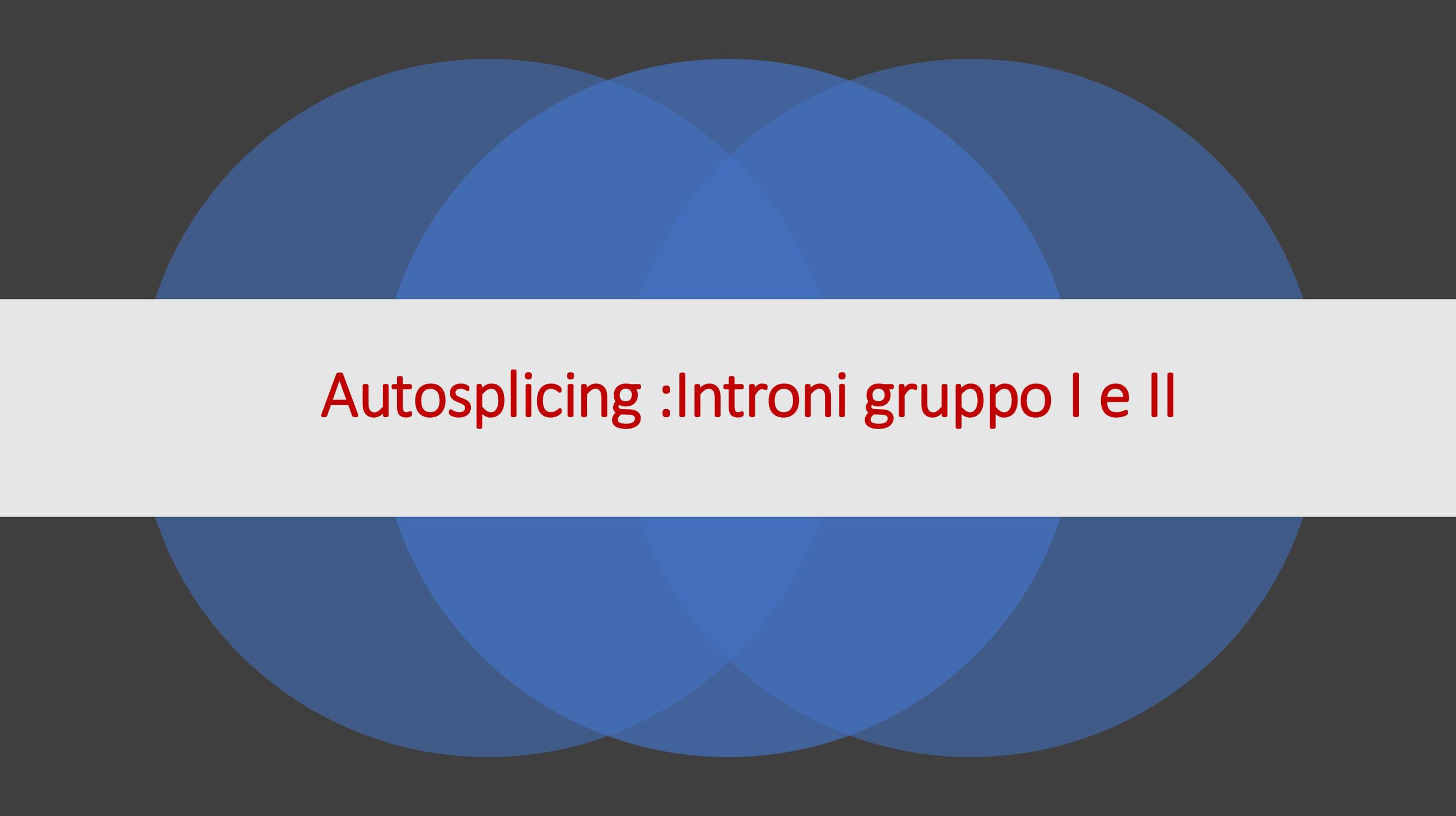


SMN: Survival Motor Neuron

Esistono 2 geni quasi uguali nell'uomo, SMN1 e SMN2, che si differenziano solo in un nt nel esone 7 che fa che nel mRNA maturo SMN2 questo esone non sia presente. Il nt che cambia è fondamentale nel processo di splicing. Mutazioni in SMN1 portano alla perdita del esone 7 per un'alterazione nel processo di splicing.

Patologie associate allo splicing



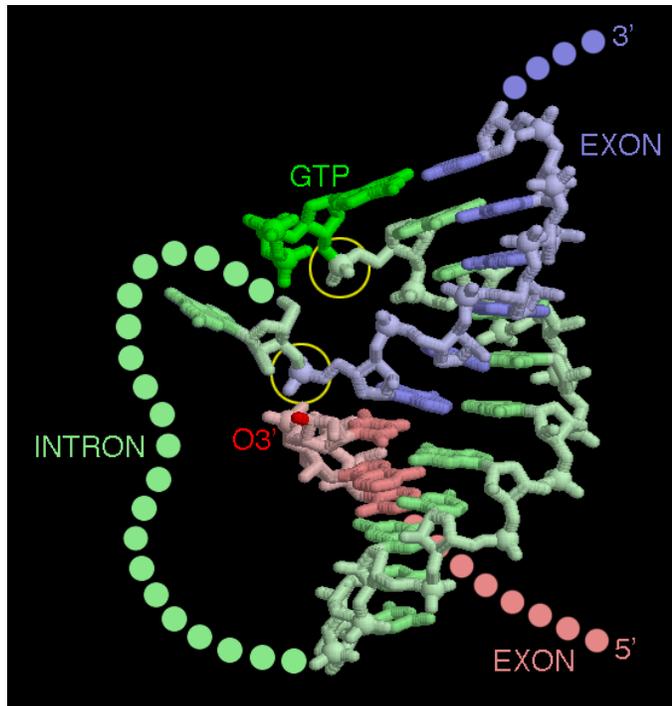


Autosplicing :Introni gruppo I e II

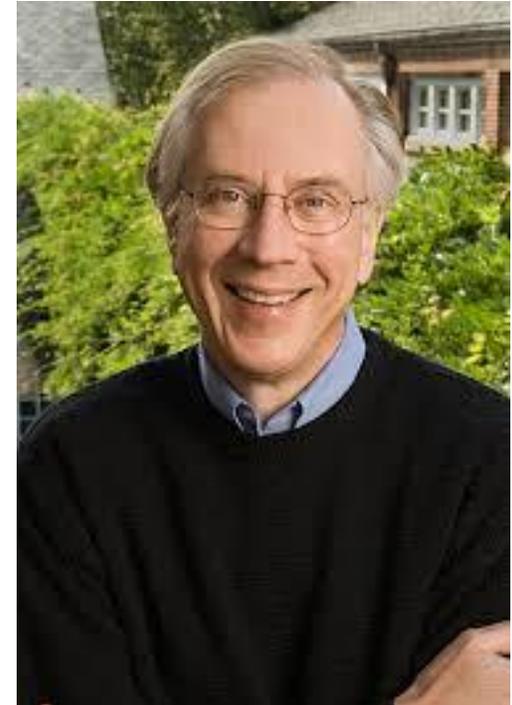
Capacità di Autosplicing del RNA

- Thomas R. Cech (1982)

Clonò il **gene** della subunità grande **26S del ribosoma** di *Tetrahymena thermophila* contenente un introne. **Indusse la trascrizione del gene** mediante l'aggiunta di una RNA pol batterica e **osservò che il trascritto era in grado di effettuare autosplicing**



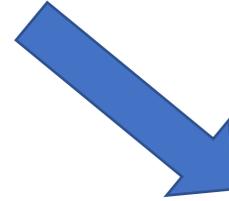
Premio Nobel per la Chimica
1989



Introni autocatalitici



Tipo I



Tipo II

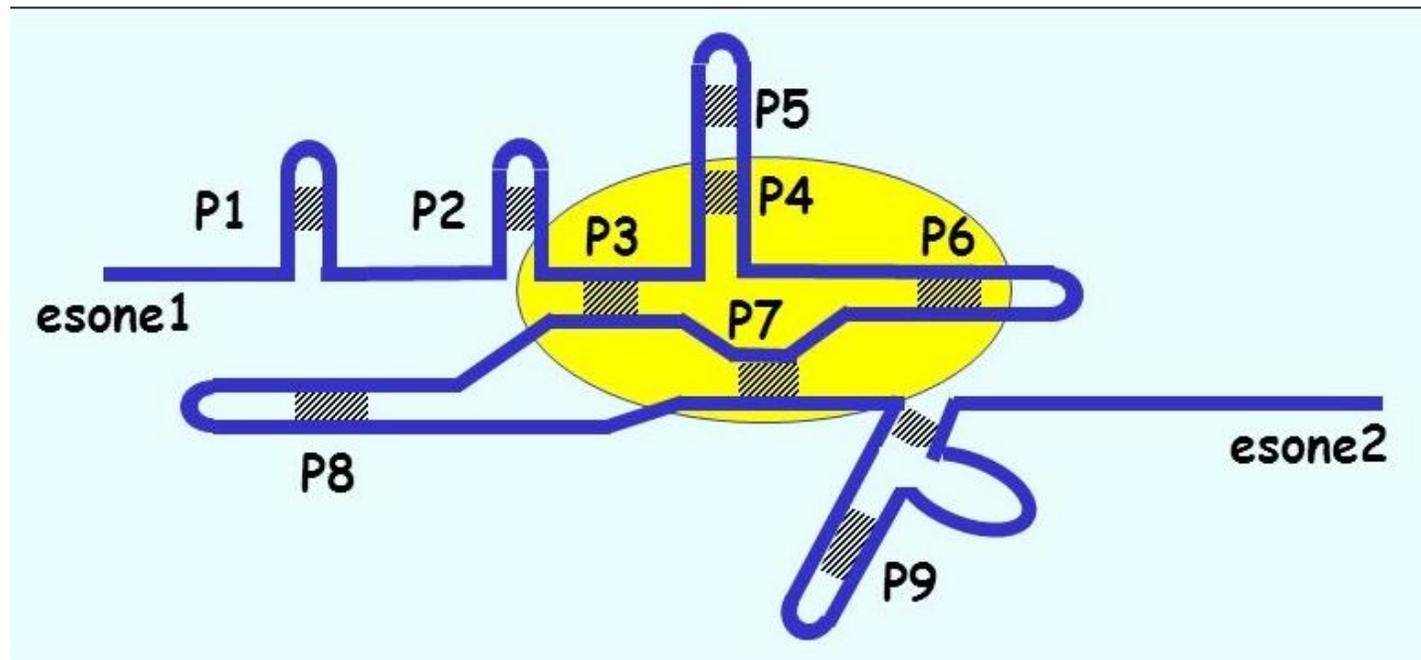
- Possiedono capacità autocatalitica senza necessità di enzimi o cofattori ad alta energia.
- Se differenziano nel meccanismo di transesterificazione

Si considerano elementi genici mobili in quanto possono diffondersi nello stesso genoma o quello d'altri organismi attraverso un processo di splicing e retro-trascrizione:

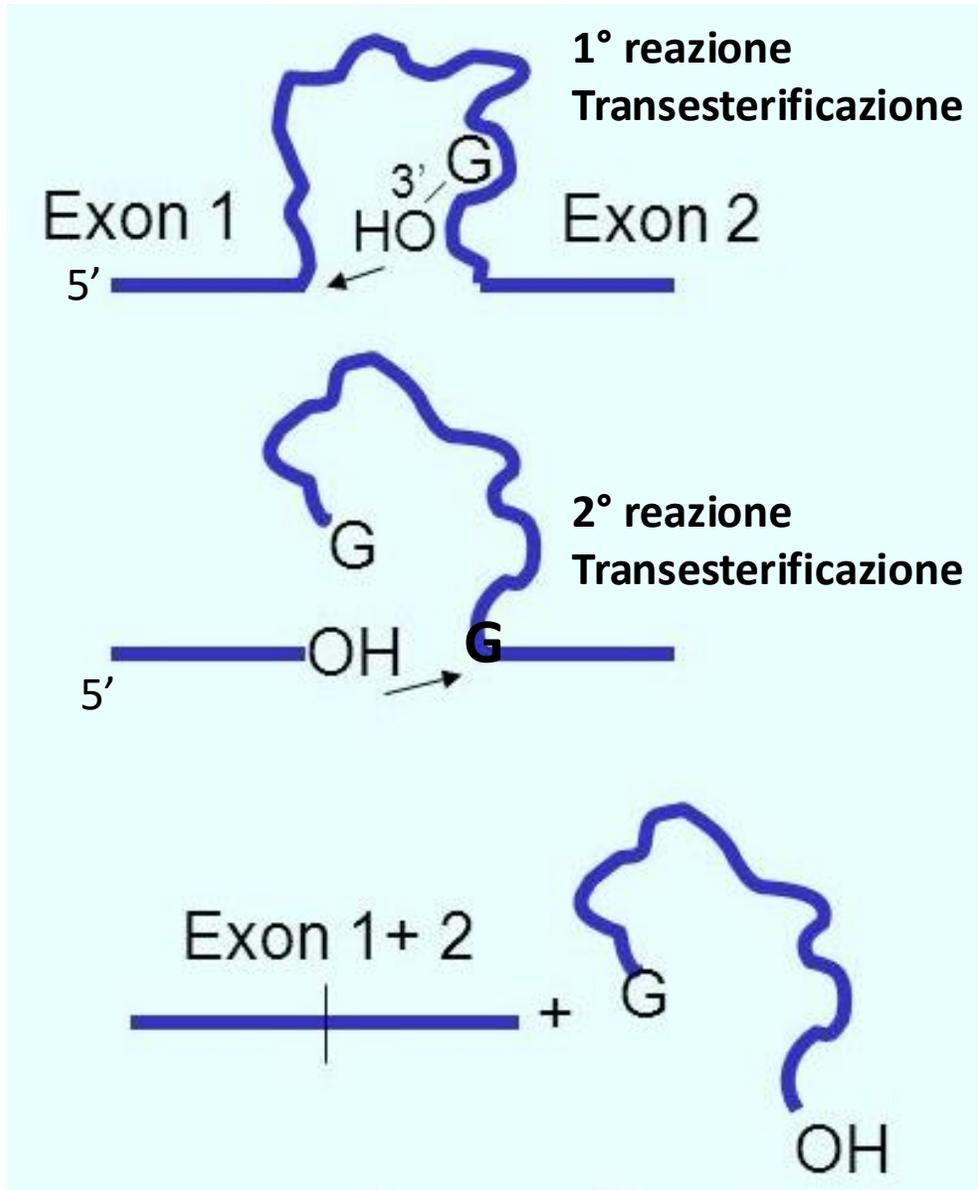
SPLICING INVERSO

Introni Tipo I

- 250-500 nt, con dei **domini** numerati da **P1 a P9**
- Presenti in gran varietà di **geni eucariotici nucleari, mitocondriali e plastidici**, ma anche in **batteri e batteriofagi**
- Possiedono una **struttura terziaria** che permette l'**avvicinamento dei siti di splicing 5' e 3'** e la sua attività catalitica è necessaria per le reazioni di transesterificazioni.

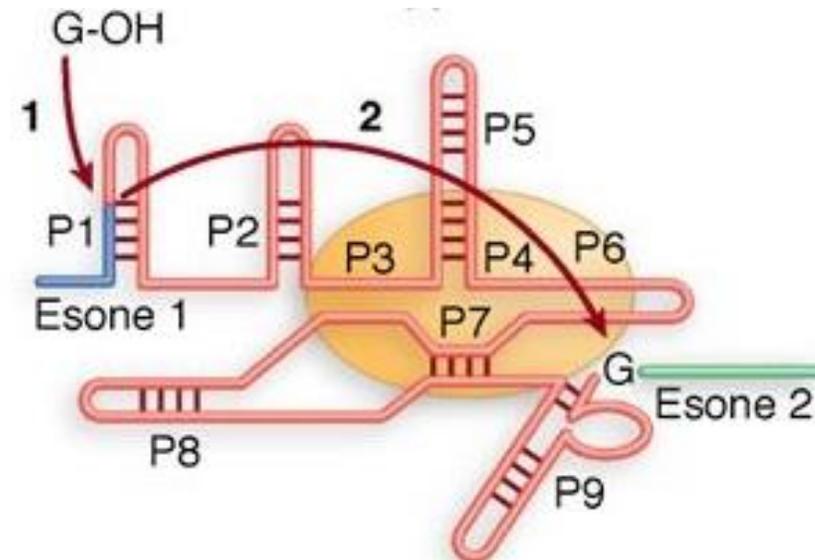


Introni Tipo I



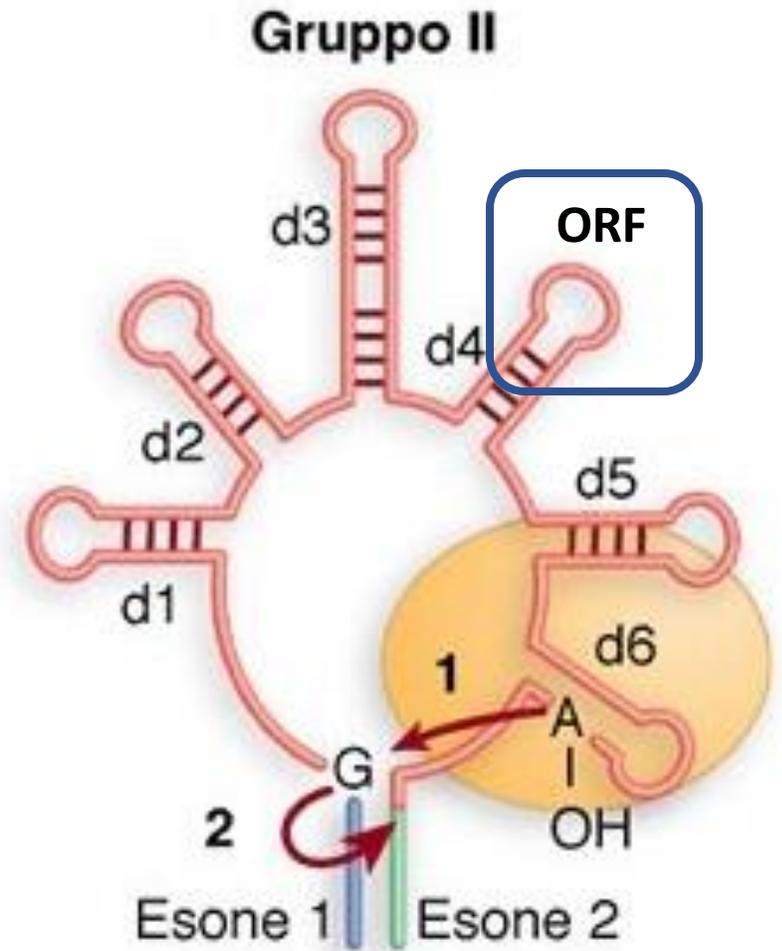
Il **3'OH** di una **Guanosina esogena** induce un attacco nucleofilo al **fosfato in posizione 5' dell'introne**

Si espone un **3'OH del esone a monte** che adesso induce un secondo attacco nucleofilo sul **fosfato della guanina che si trova sull'estremità 3' dell'introne** e provocandone il rilascio dell'introne e concatenazione degli esoni.

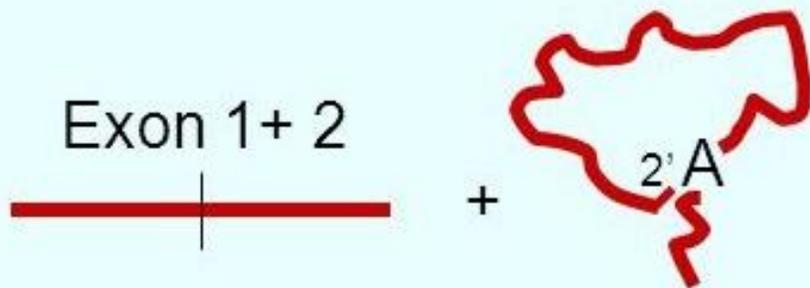
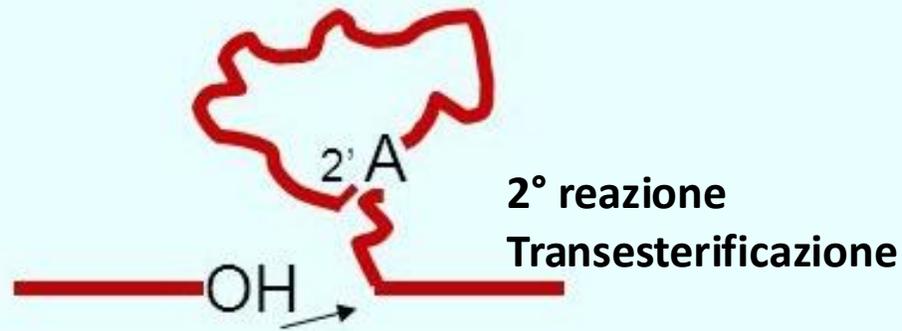
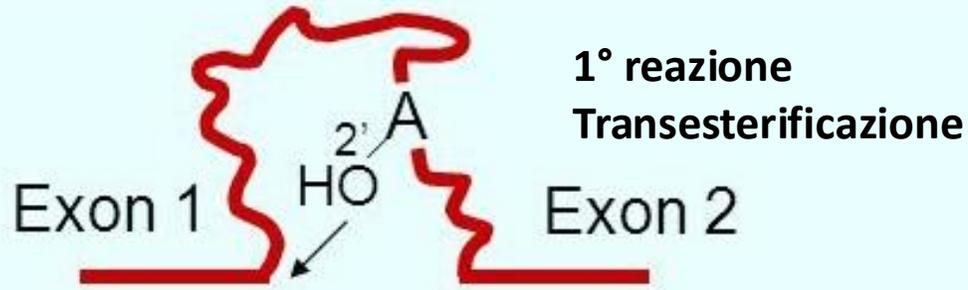


Introni Tipo II

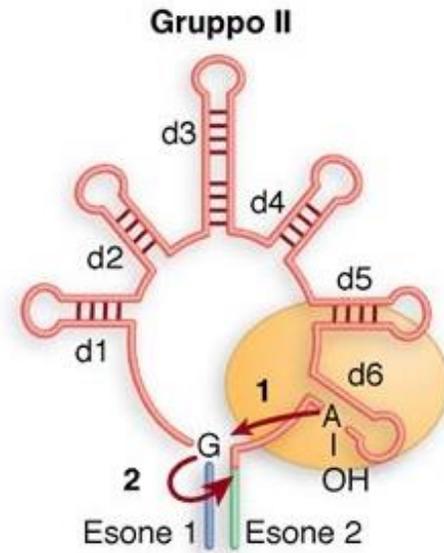
- 400-800 nt,
- Organizzato in 6 domini: D1-D6, che emergono da una «ruota» centrale, formando una struttura terziaria che avvicina regioni lontane fra di loro.
- Nei geni mitocondriali e plastidici, e anche nei batteri
- Due componenti principali: **un ribozima** caratterizzata dalla presenza di 6 strutture stem-loop (D1-D6) e una **ORF codificante** per una trascrittasi inversa che stabilizza la struttura e può convertire l'RNA in DNA per la sua integrazione nel genoma (elementi mobili)



Introni Tipo II



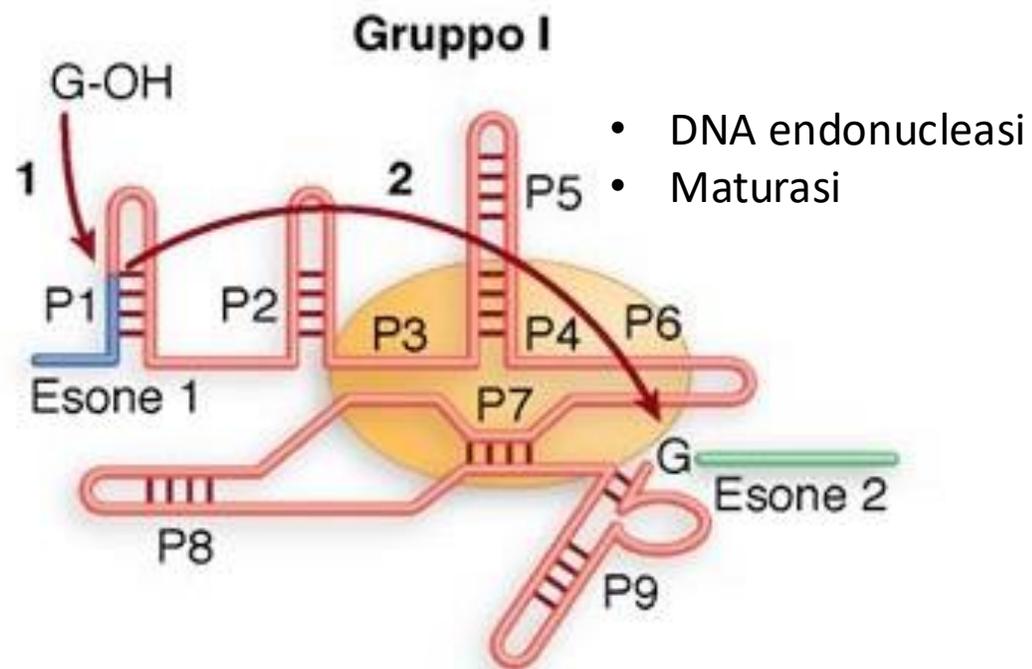
Attacco nucleofilo di una **A (2'OH)** nella regione **D6** dell'introne sulla sua estremità 5'



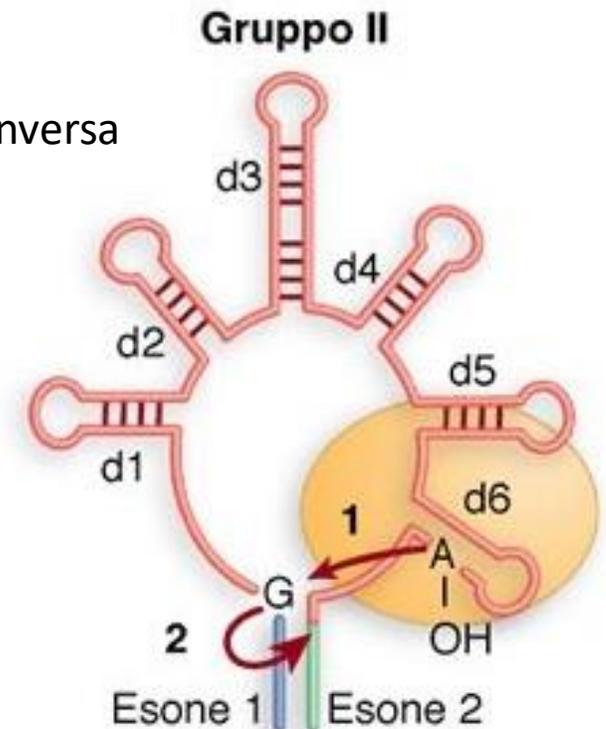
L'estremità **3'OH del esone a monte** induce un secondo attacco nucleofilo al 5' fosfato dell'esone a valle, con la concatenazione degli esoni e formazione del intermediario a forma di cappio

Proteine accessorie nel processo di autosplicing

Le regioni non appaiate ad ansa o loop possono contenere delle ORF che codificano per proteine che regolano l'efficienza di splicing



- Transcriptasi inversa
- Maturasi

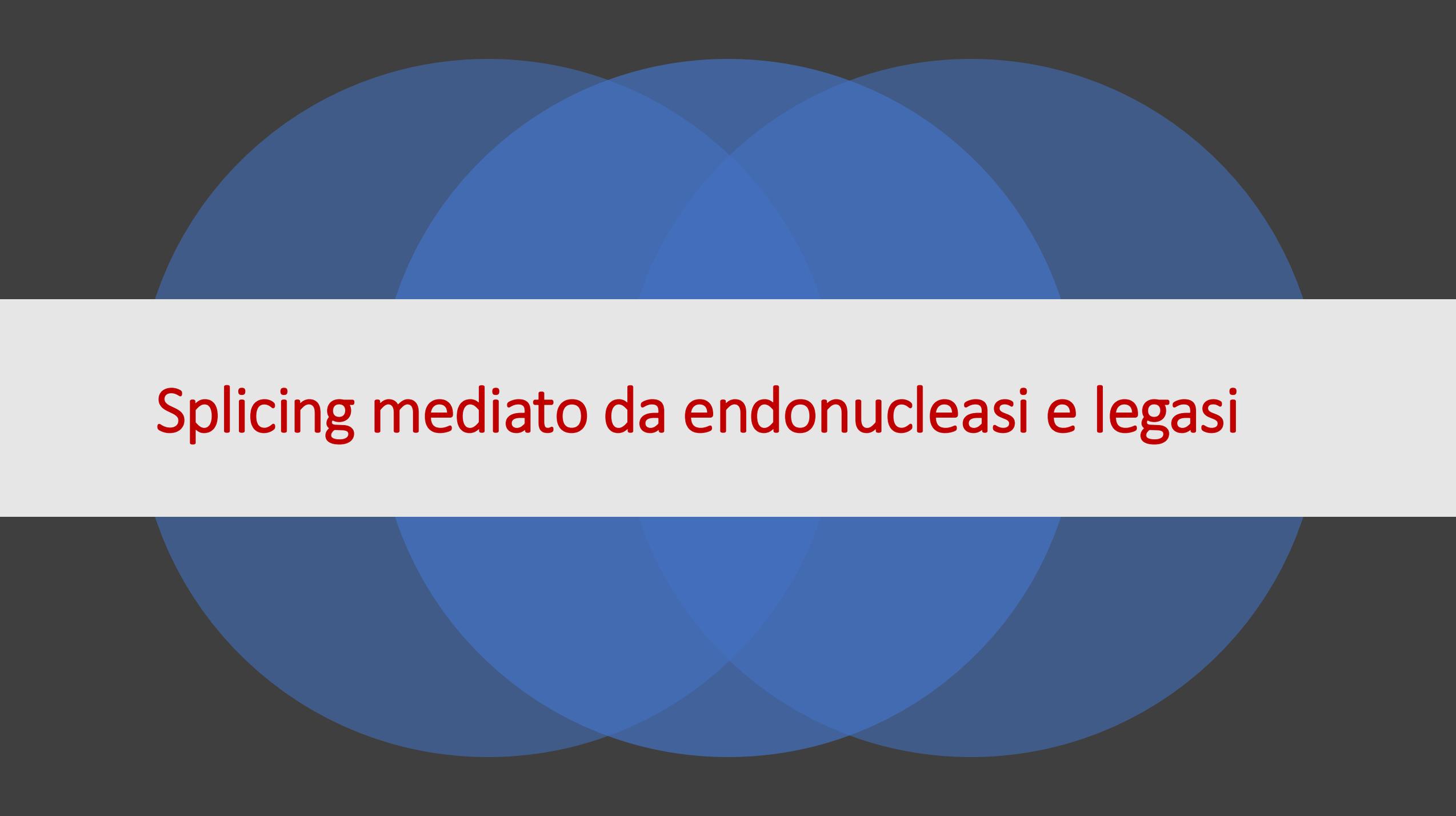


MONDO a RNA

- La scoperta dell'attività autocatalitica del RNA ha portato a proporre l'RNA come molecola all'origine della vita: capace di autoreplicarsi e con capacità catalitica

Walter Gilbert nel 1986 : L'ipotesi del mondo a RNA senza DNA.
La vita sulla Terra si sarebbe formata a partire di RNA che avrebbe la funzione di immagazzinare informazione genetica e sarebbe anche effetto della sua espressione

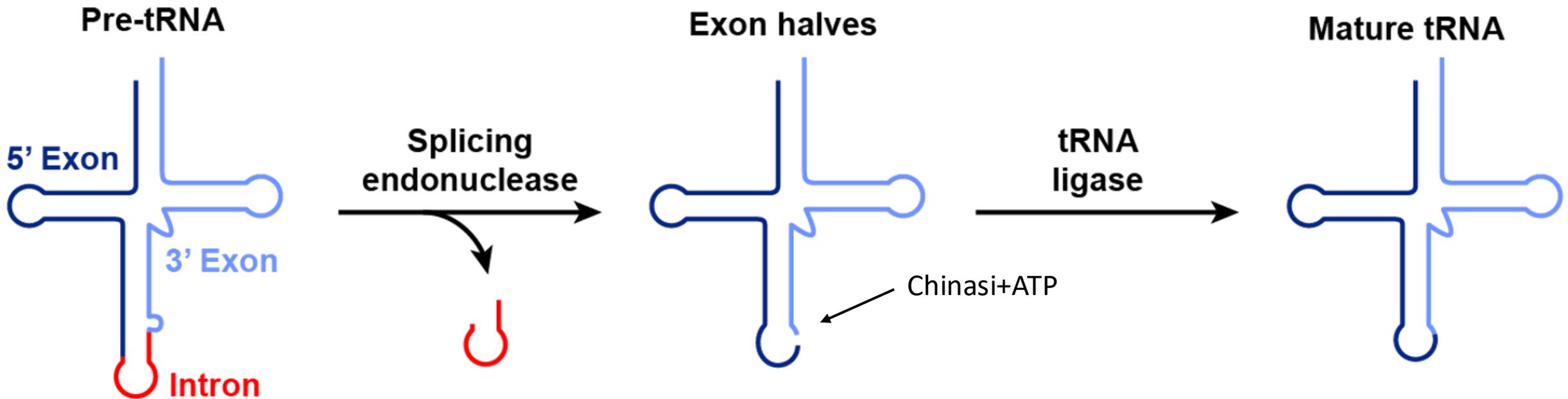




Splicing mediato da endonucleasi e legasi

Splicing del tRNA

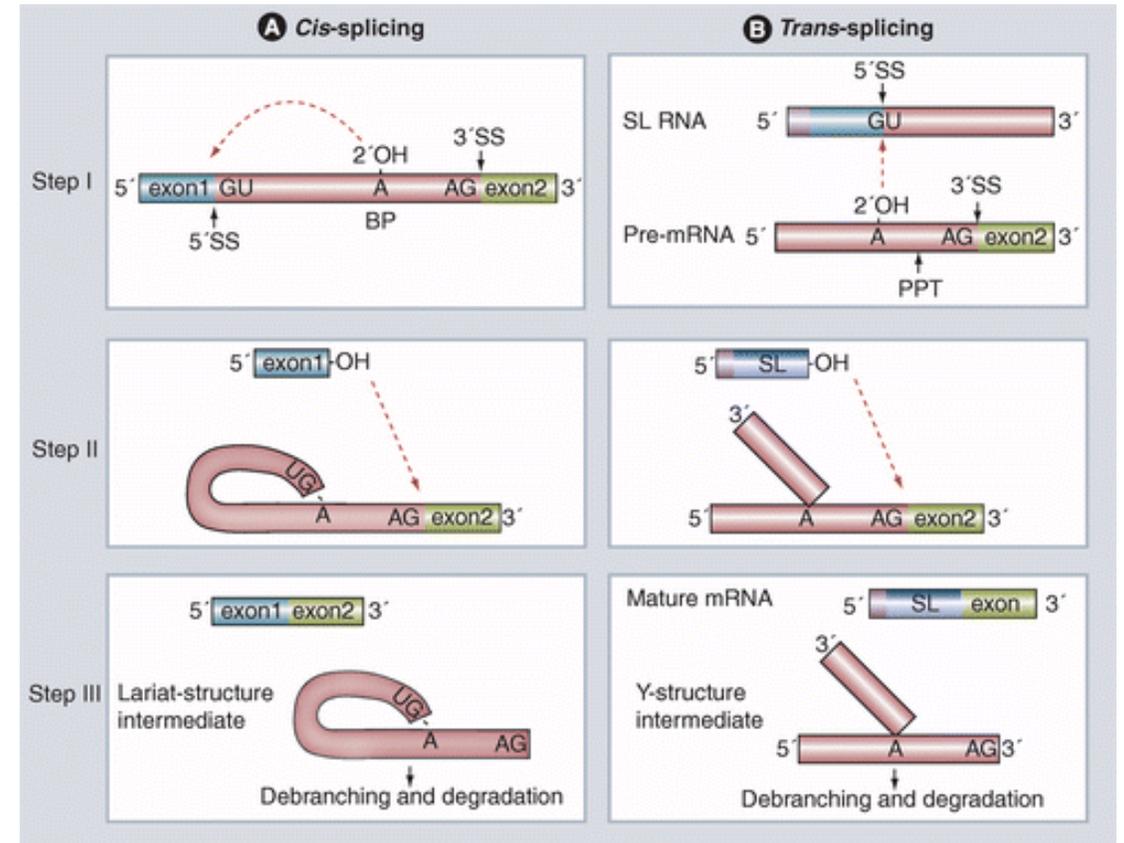
Avviene attraverso **endonucleasi e ligasi** che operano in **2 fasi in modo ATP-dipendente**, e non prevede nessuna reazione di transesterificazione



introns are 14–60 nucleotides in length and interrupt the anticodon loop immediately 3' to the anticodon.

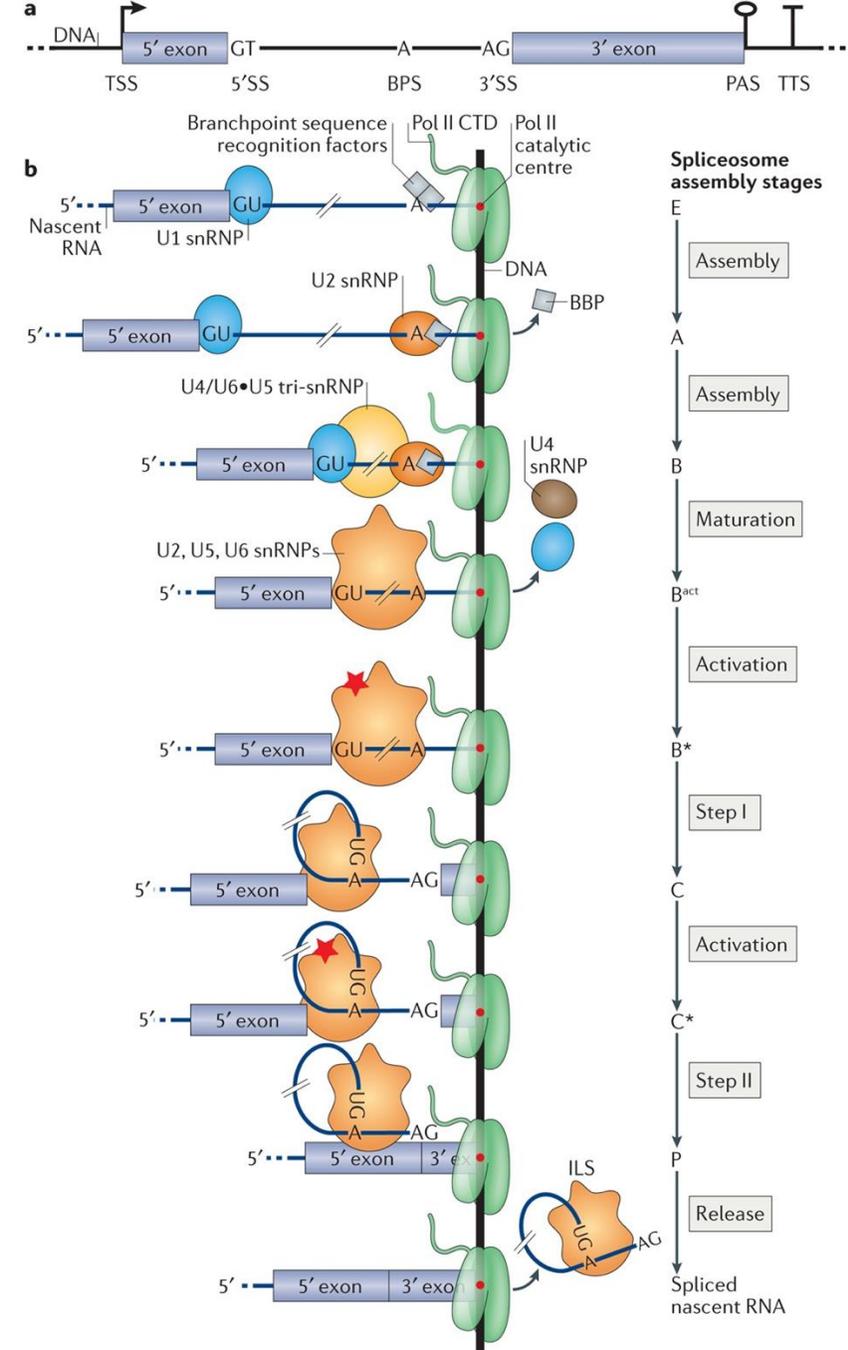
Cis- o Trans-splicing

- **Cis-splicing:** reazioni intramolecolari che portano alla concatenazione di 2 esoni presenti nella stessa molecola di DNA
- **Trans-splicing:** reazioni intermolecolari di transesterificazione che portano alla concatenazione di esoni provenienti da diverse molecole di RNA.



Accoppiamento Splicing -Trascrizione

- Lo splicing avviene co-trascrizionalmente durante la fase di allungamento



SPLICING ALTERNATIVO

Processo per il quale uno stesso **pre-mRNA** può subire eventi di splicing diversi, con differenti combinazioni di esoni, che portano alla generazione di diversi mRNA che a loro volta codificano per proteine diverse



Splicing alternativo

- Lo splicing alternativo spiega il **paradosso** di come organismi con un livello di complessità molto diverso abbiano un numero di geni relativamente simile

Genoma	Dimensioni		Numero di geni codificanti proteine
	Mpb	Lunghezza (cm)	
ΦX174 (piccolo fago)	0,005	0,00016	11
T7 (grande fago)	0,08	0,00259	150
Mimivirus (virus gigante)	1,2	0,03886	1000
Escherichia coli (procariote)	4,6	0,14895	4300
Saccharomyces cerevisiae (lievito)	13,5	0,43714	6000
Caenorhabditis elegans (nematode)	100	3,23810	21 700
Arabidopsis thaliana	120	3,88571	26 000
Arabidopsis thaliana (cloroplasto)	0,155	0,00502	87
Drosophila melanogaster	165	5,34286	12 000
Homo sapiens	3300	106,857	23 000
Homo sapiens (mitocondrio)	0,016	0,00052	37

Splicing alternativo

- Permette la **espressione di specifiche varianti da un gene, che avranno funzioni correlate ma specializzate** per diversi tipi cellulari, fasi dello sviluppo o differenziamento cellulare.

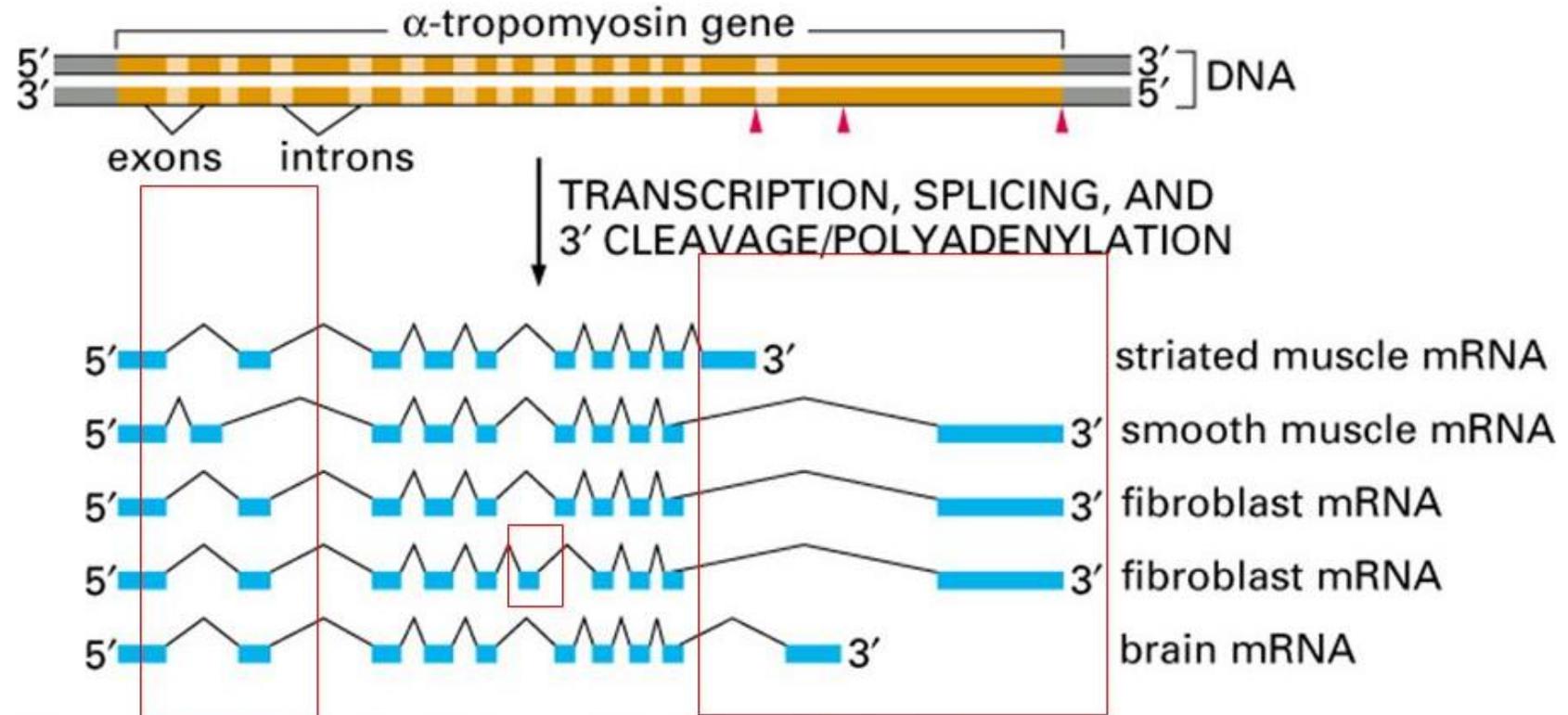
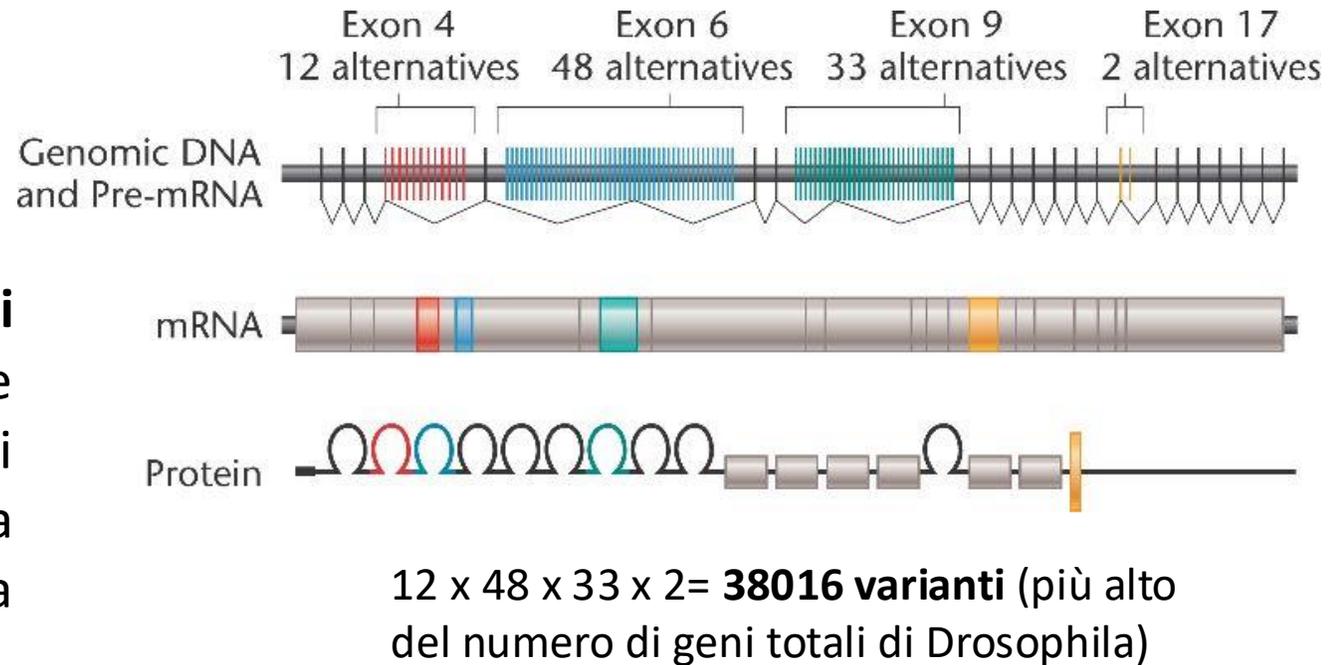


Figure 6-27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Splicing alternativo

Si estima che intorno al **90% dei geni umani subisca splicing alternativo**, contribuendo ad aumentare la varietà di trascritti e proteine

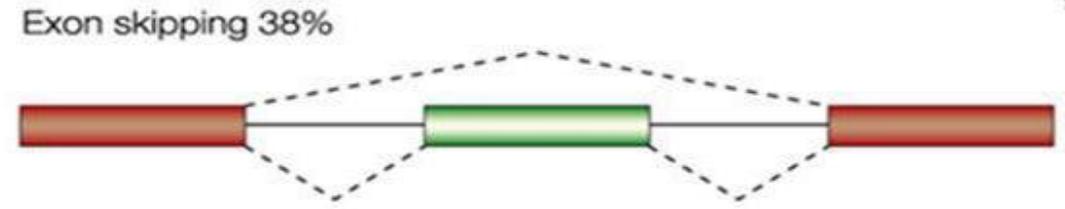
Un esempio di questo è il **gene *Dscam* di *Drosophila***, che codifica per immunoglobuline necessarie per la formazione di connessioni neuronali. Questo gene può dare luogo a 38000 diversi trascritti risultato della combinazione delle diversi varianti.



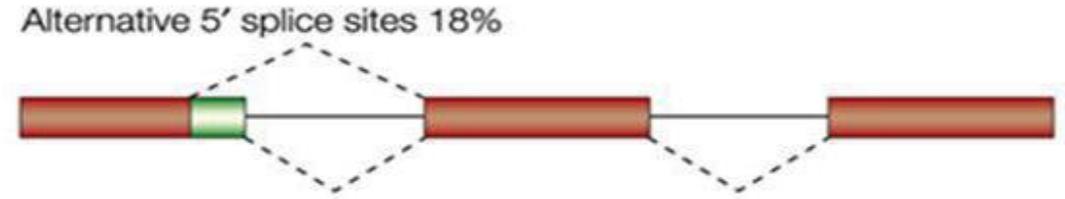
Gli esoni sempre presente in tutti i trascritti dello stesso gene si chiamano: **ESONI COSTITUTIVI**
Gli esoni incorporati solo in alcuni trascritti si chiamano: **ESONI FACOLTATIVI**

Eventi che generano
diversi trascritti mediante
splicing alternativo

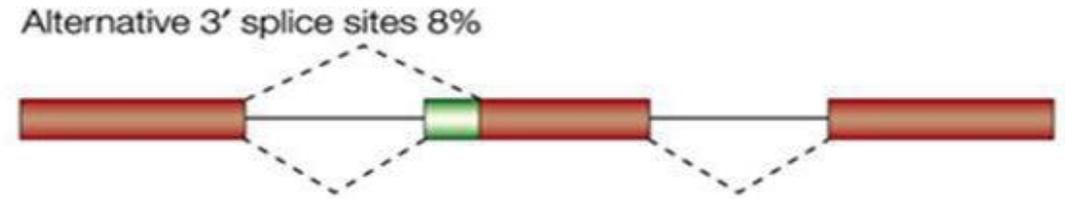
Esoni cassetta o facoltativi



Siti di splicing alternativi al 5'



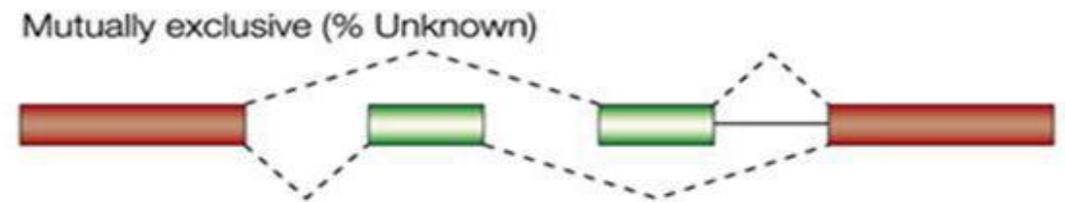
Siti di splicing alternativi al 3'



Ritenzione di introni



Esoni mutuamente esclusivi



Splicing alternativo: REGOLAZIONE

- Elementi *in Cis*

Rappresentati da **specifici domini nel pre-mRNA** quali i siti donatori, accettori o di ramificazione

- Elementi *in Trans*

Fattori proteici che interagiscono in modo specifico con gli elementi in cis, modulando il **riconoscimento dei siti di splicing** e permettendo la espressione della variante appropriata ad ogni momento

Splicing alternativo: REGOLAZIONE

Riconoscimento siti di splicing

- Riconoscimento degli esoni

Vengono riconosciuti siti di splicing localizzati negli esoni

- Riconoscimento degli Introni

Vengono riconosciuti i siti di splicing nell'estremità 5' e 3' dell'introne

Specificità dello splicing

I **siti di riconoscimento dello splicing sono corti e degenerati** e non garantiscono teoricamente un'alta specificità. La **specificità viene data da motivi di sequenza addizionali che si trovano all'interno degli introni o degli esoni che agiscono come attivatori o repressori**.

ESE: *Exonic Splicing Enhancer*

ESS: *Exonic Splicing Silencer*

ISE: *Intronic Splicing Enhancer*

ISS: *Intronic Splicing Silencer*

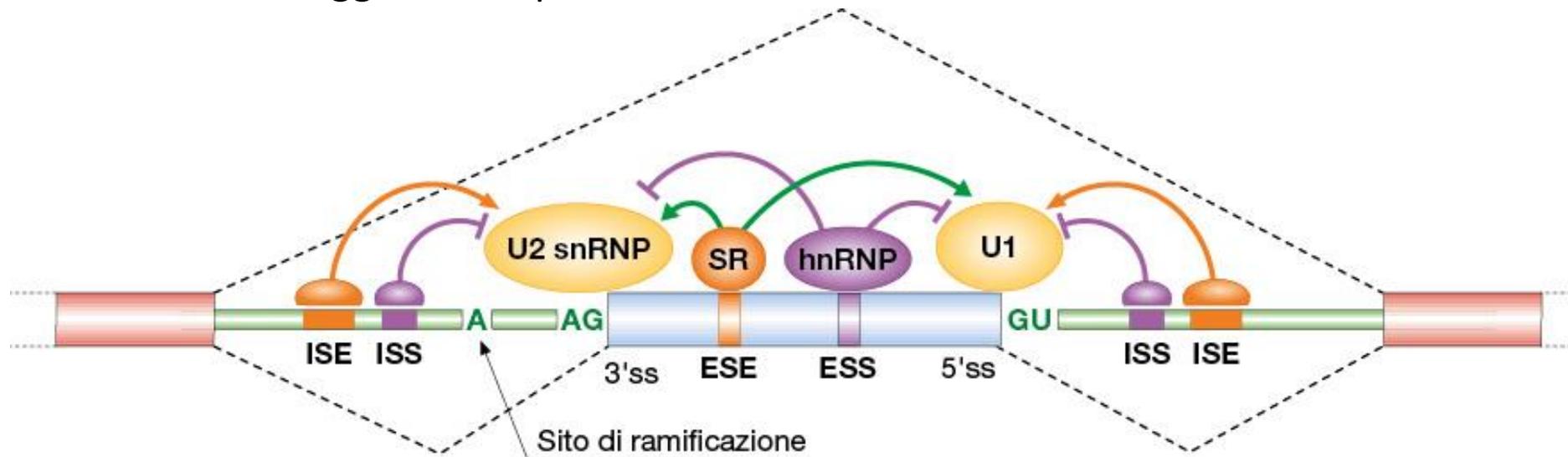
Splicing alternativo: REGOLAZIONE

Riconoscimento e specificità siti di splicing

ESE: *Exonic Splicing Enhancer*

- Riconosciuti da proteine della famiglia **SR**, con domini di riconoscimento del RNA (RRM, RNA recognition Motif) e una regione ricca in serine (S) e arginine (R) (SR motif)

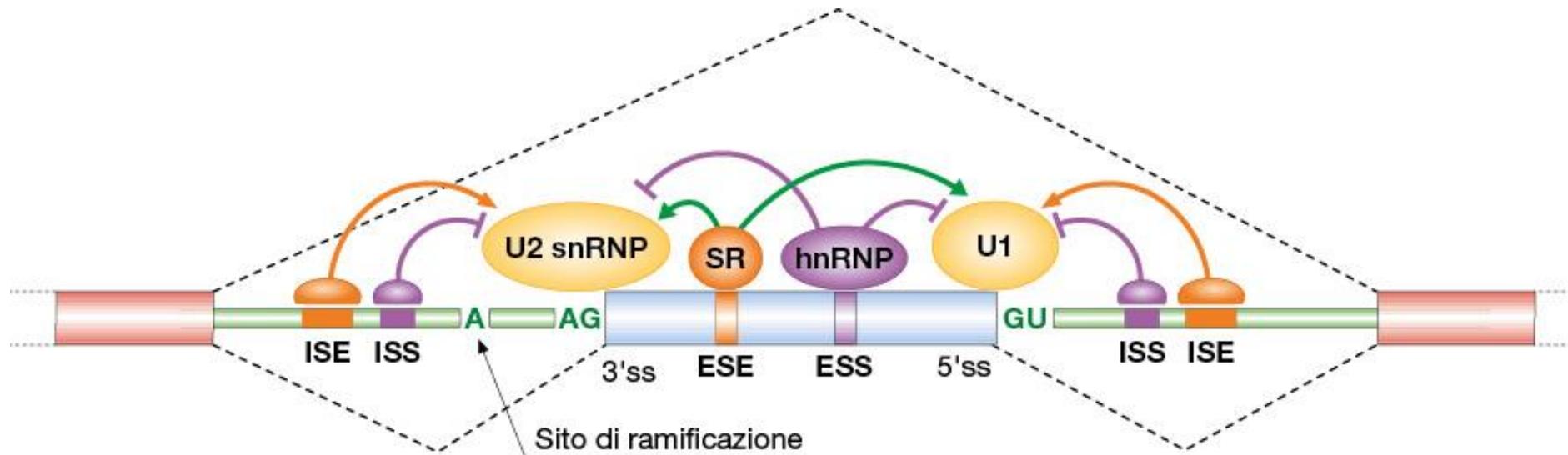
Facilita l'assemblaggio dello spliceosoma



Splicing alternativo: REGOLAZIONE

Riconoscimento e specificità siti di splicing

Gli elementi di regolazione **ISE** e **ISS** hanno un meccanismo di azione simile alle ESE e ESS, ma sono state meno studiate



Splicing alternativo: REGOLAZIONE

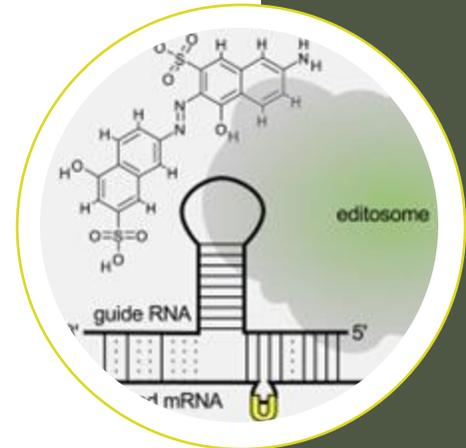
- Il **pattern di splicing** viene determinato dalla **azione cooperativa dei diversi attivatori e repressori**, e la loro localizzazione all' interno di esoni o introni
- Anche la **conformazione del pre-mRNA e le modificazioni epigenetiche della cromatina** possono regolare il pattern di splicing.

Editing dell'RNA

Processo **post-trascrizionale** che porta alla **modificazione** in una o più posizioni della **sequenza nucleotidica** mediante

1. conversione di una base in un'altra
2. mediante l'inserzione o delezione di nucleotidi

Questo processo può generare nuove varianti capaci di generare proteine alternative



Es: adenosine deaminases that convert an A to inosine (I), which the ribosome translates as a G. Thus a **CAG codon** (for Gln) can be converted to a CGG codon (for Arg).