

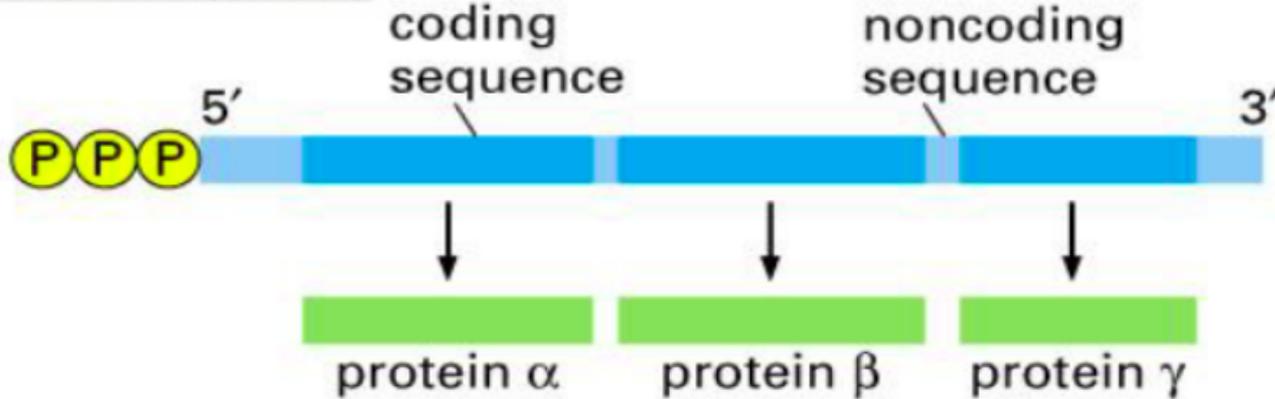
Espressione dei geni eucariotici

Sia negli eucarioti che nei procarioti, la trascrizione è regolata da **attivatori** e **repressori**, ma esistono caratteristiche proprie delle cellule eucariotiche che rendono più complessa l'attività di queste proteine e che conferiscono una maggior complessità alla regolazione genica degli eucarioti:

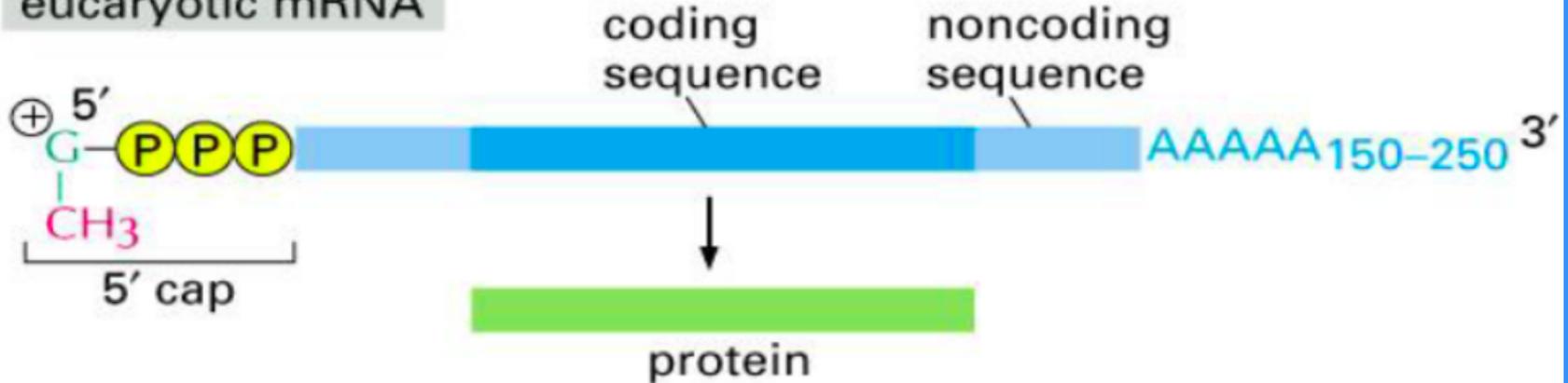
- Presenza di modifiche a carico dei nucleosomi che conferiscono alto **dinamismo** all'accessibilità del DNA
- Presenza di un elevato numero di proteine regolatrici e siti regolatori (enhancer, isolatori etc..) che aumentano l'**integrazione dei segnali** per la trascrizione di un dato gene

mRNA in procarioti ed eucarioti

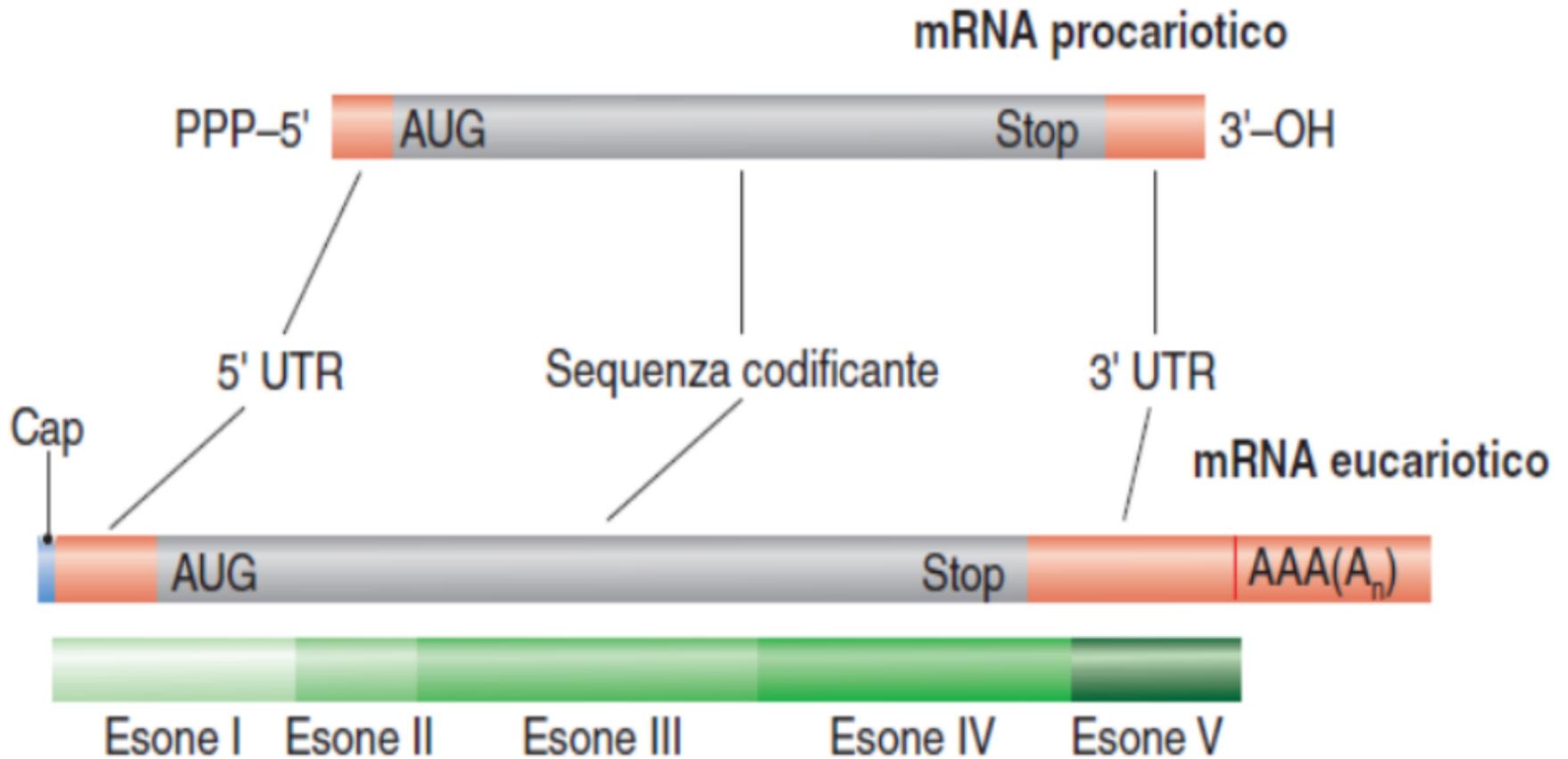
procaryotic mRNA



eucaryotic mRNA

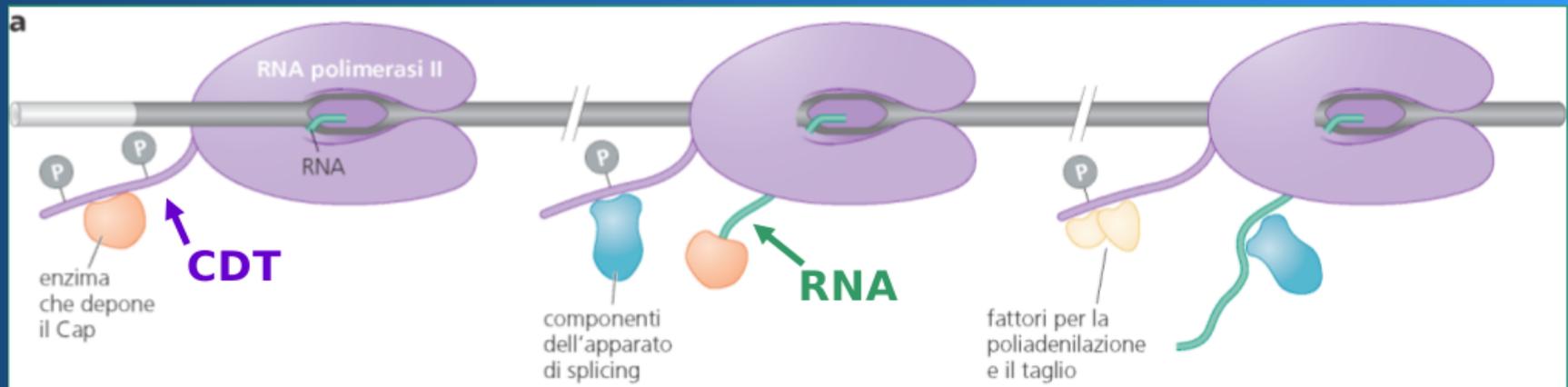


mRNA in procarioti ed eucarioti



La "coda" della RNA polimerasi II

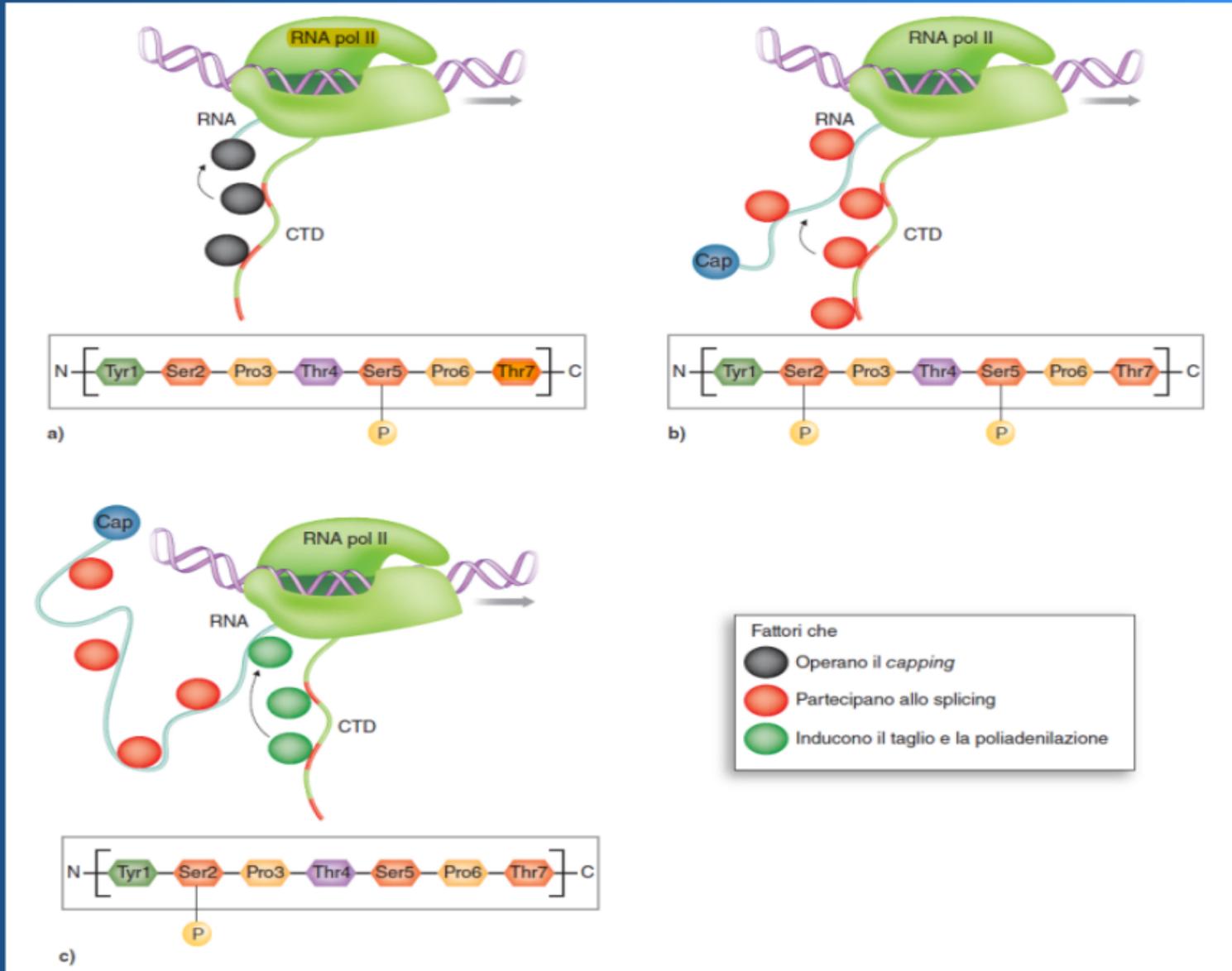
Il dominio c-terminale (**CTD**) della RNA polimerasi II **dirige le tempistiche** di maturazione dei messaggeri modulando il suo stato di **fosforilazione** che influenza il legame di fattori di allungamento, impostando la formazione del **Cap**, della **poli-adenilazione** e dello **splicing** in sostituzione ai fattori di inizio.



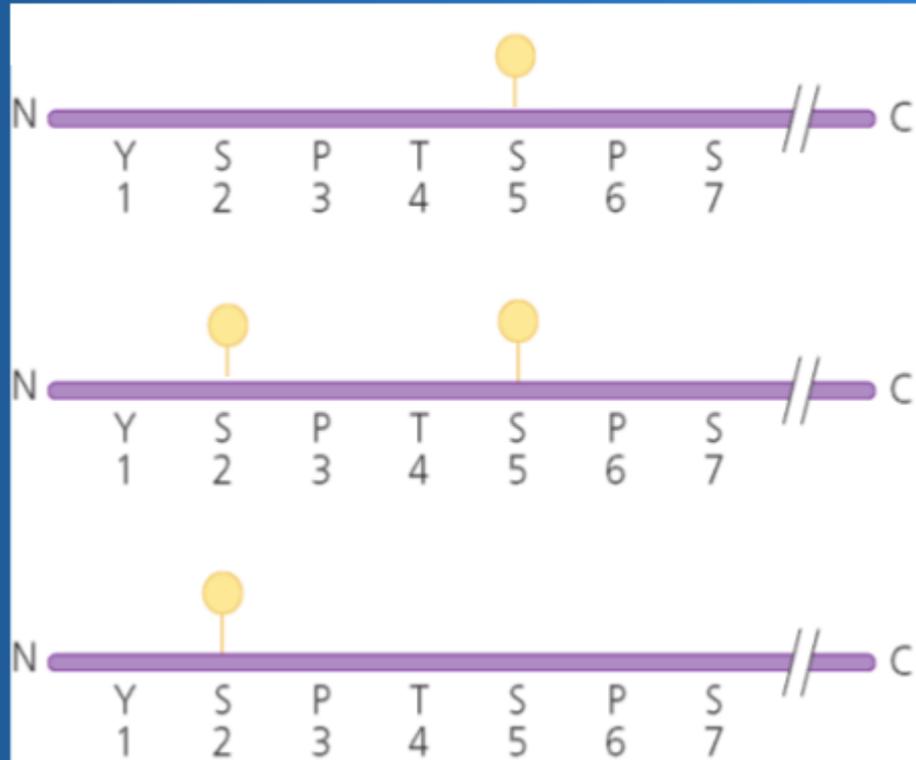
52 ripetizioni in tandem della sequenza di 7 AA

Y-[ST]-P-[STQ]-[ST]-P-[SRTEVKGN]
1 2 3 4 5 6 7

La "coda" della RNA polimerasi II



Fosforilazione della coda: stato di maturazione



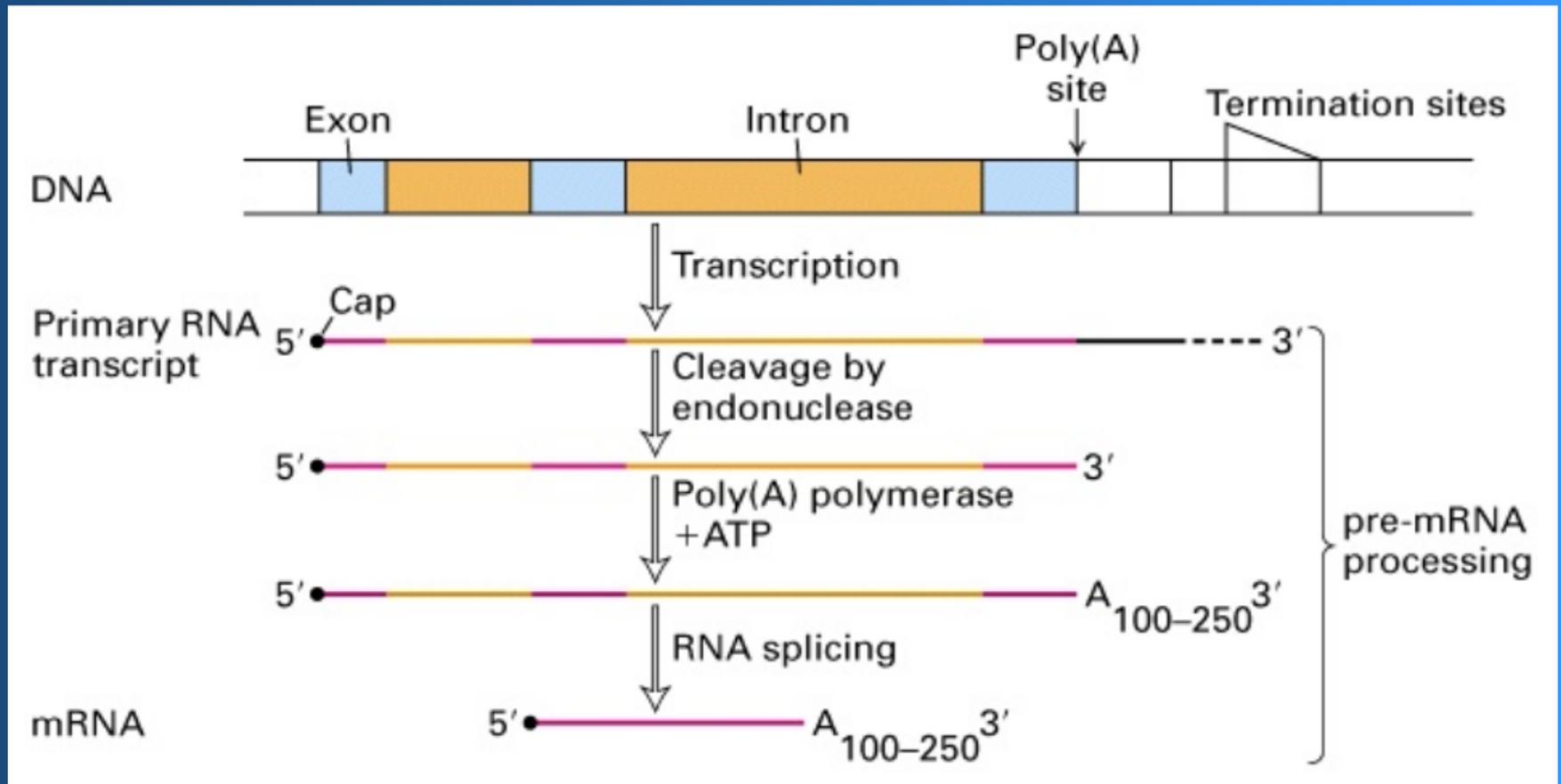
nessuna → preinizio → Formazione PIC

Ser 5 P → distacco dal promotore → Formazione CAP al 5'

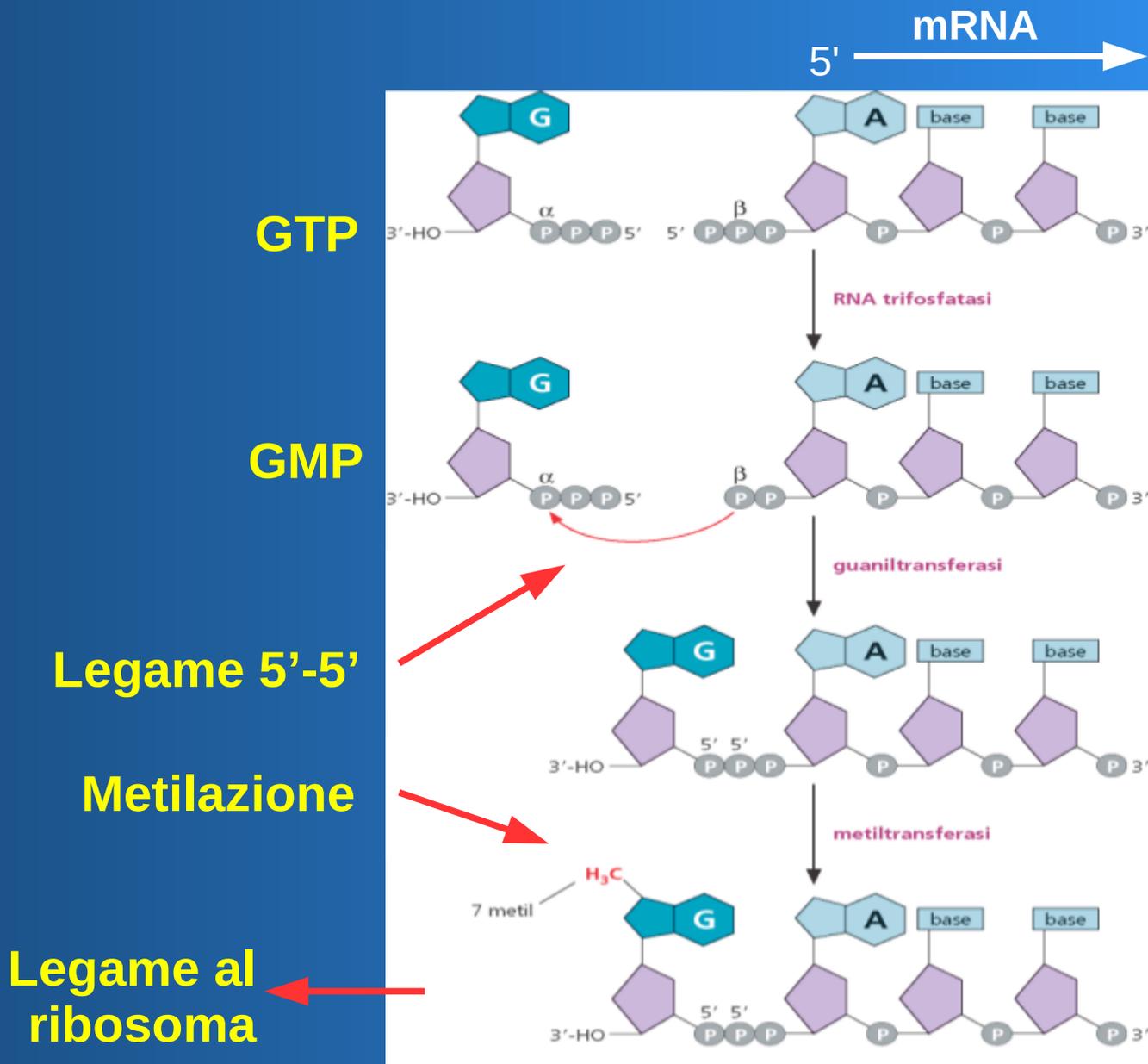
Ser 2P + Ser 5P → capping → Elongazione e splicing

Ser 2 P → allungamento → PolyA e taglio

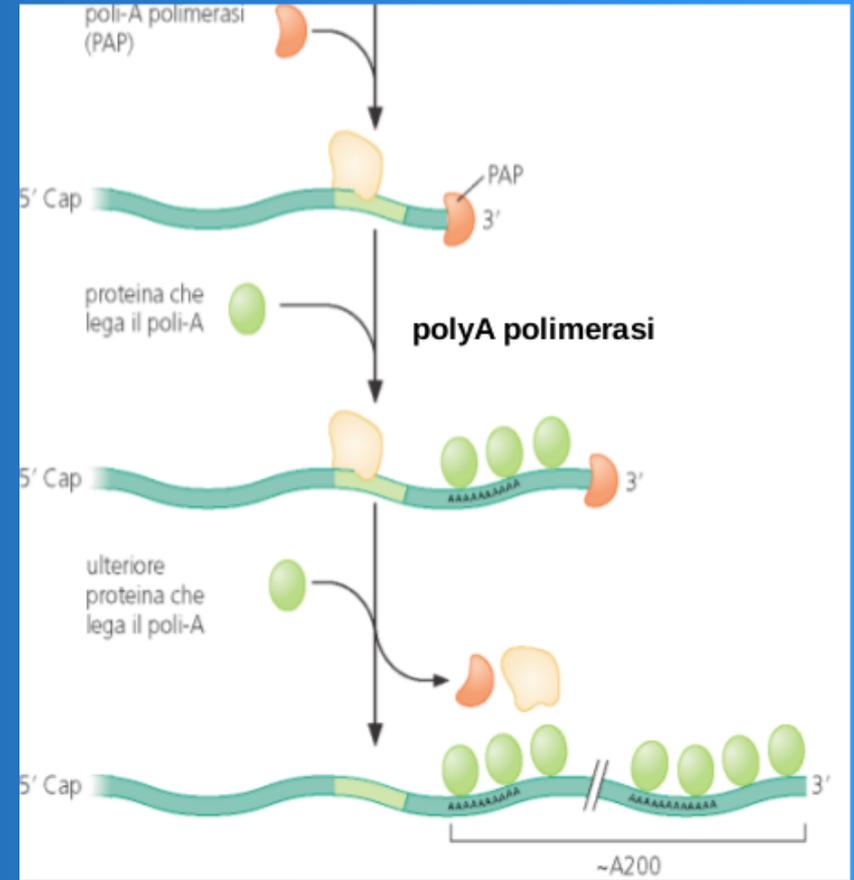
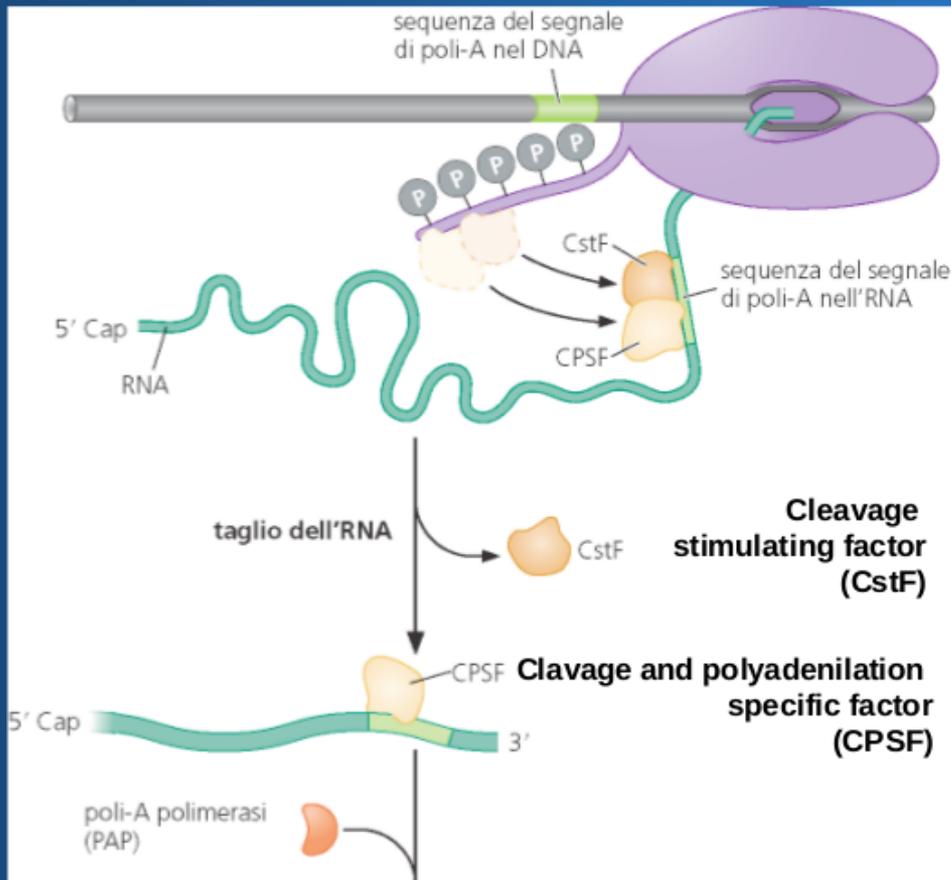
Modificazioni post-trascrizionali



Formazione del cappuccio al 5'



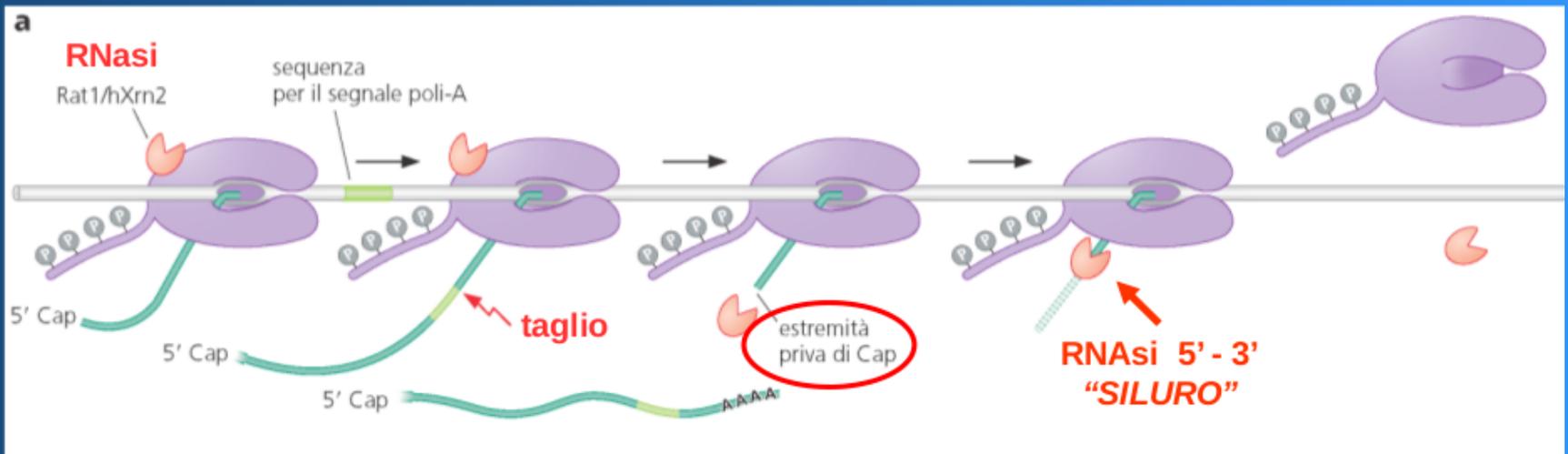
Poliadenilazione al 3'



Terminazione della trascrizione (I)

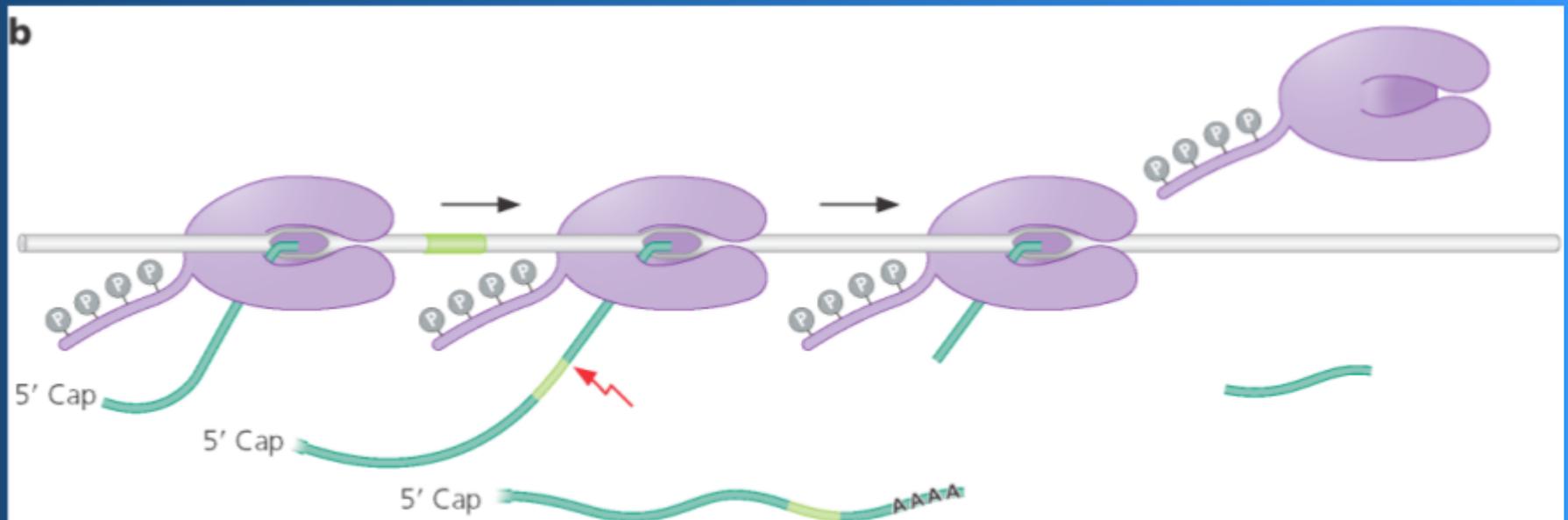
Modello della RNasi "siluro": la RNA polimerasi ospita come subunità una RNasi processiva che si attiva dopo che l'mRNA viene scollegato.

L'RNA rimanente, privo di Cap, viene degradato dalla RNasi che "mangia" finchè raggiunge la bolla di trascrizione, provocando il distacco della polimerasi.



Terminazione della trascrizione II)

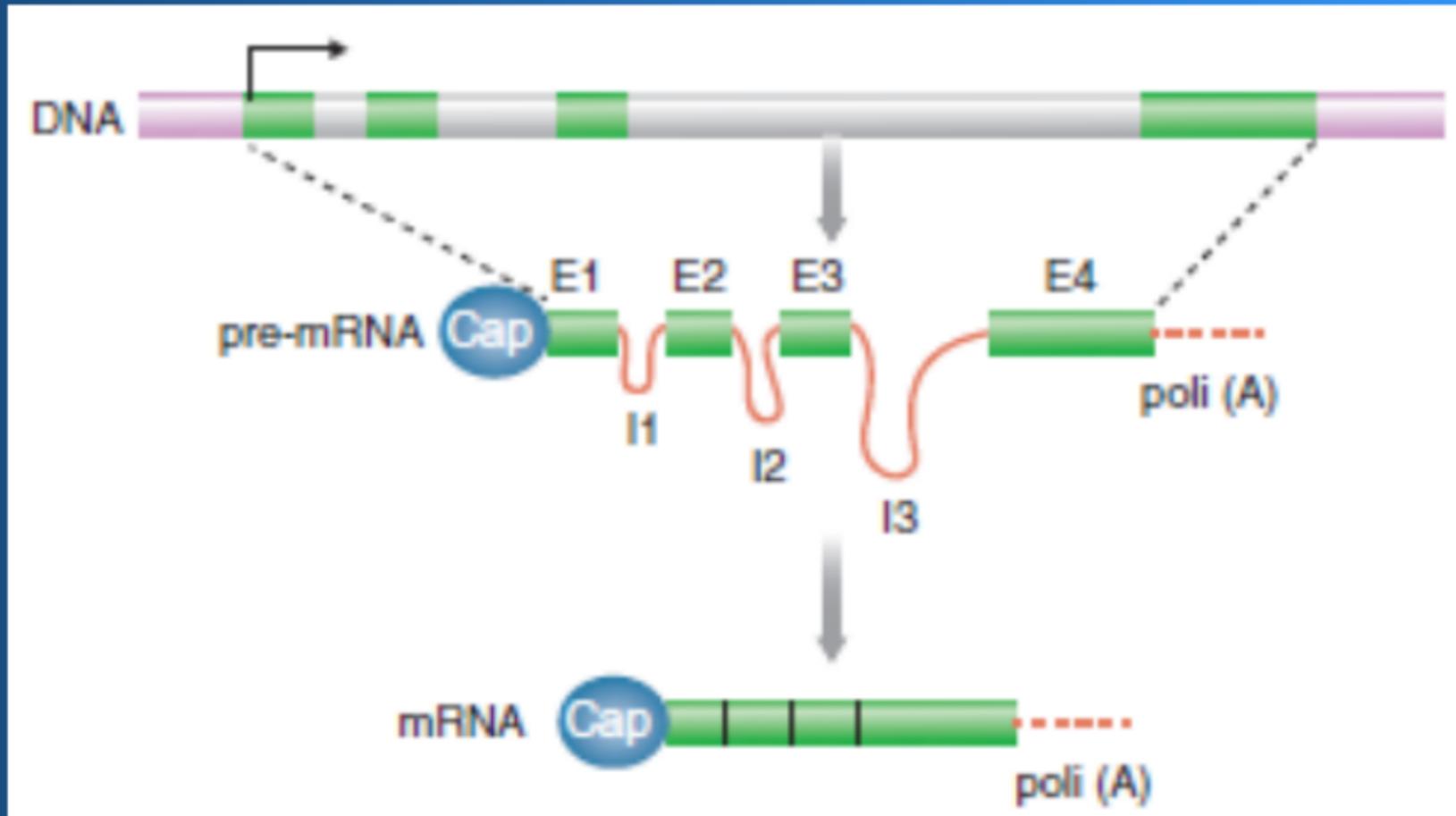
Modello allosterico: la RNA polimerasi raggiunge la regione che promuove la poli-adenilazione, superata la quale perde processività e elementi aggiuntivi che competono con la polimerasi stessa, provocandone il distacco.



Prima evidenza dello splicing

Fu scoperto studiando il virus Adenovirus:

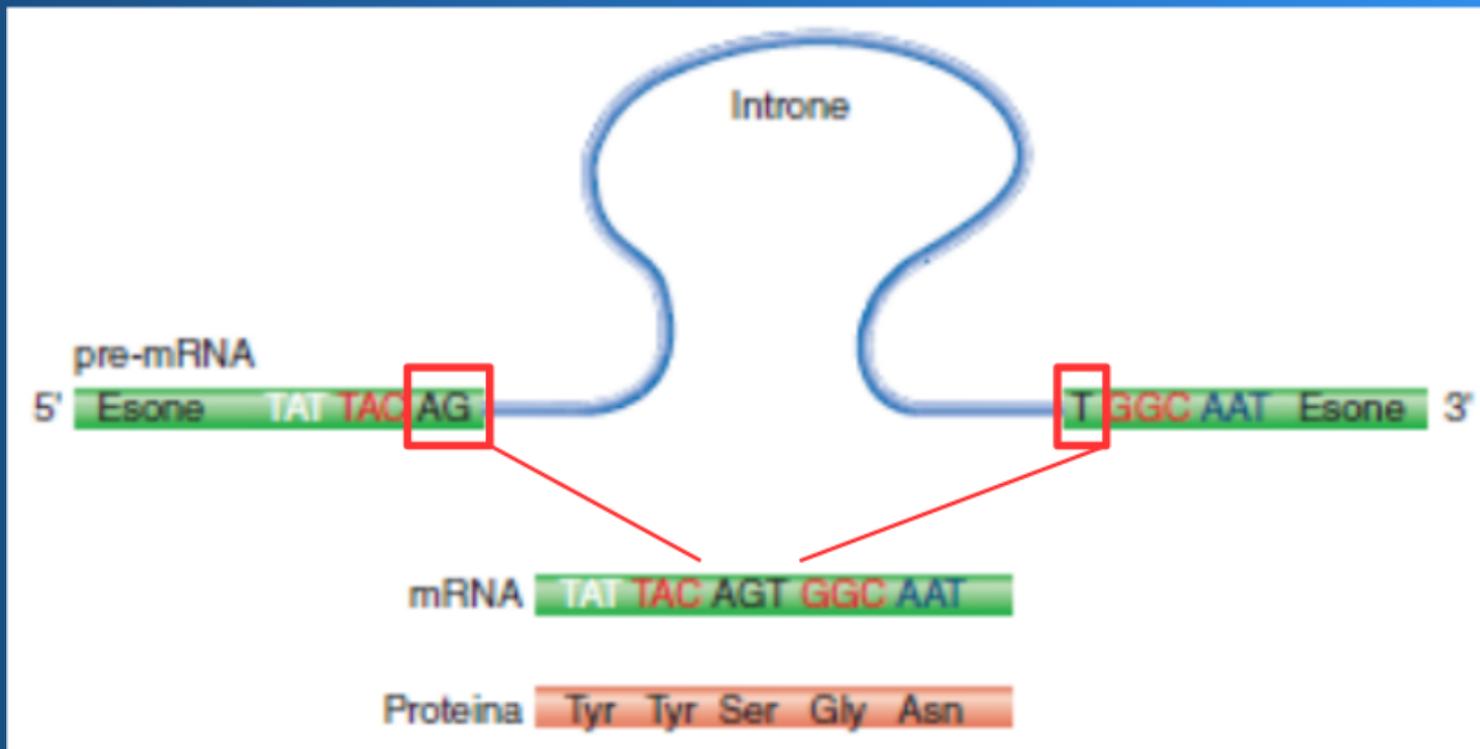
il gene Late aveva una sequenza codificante molto più lunga di quella dell'RNA che produceva



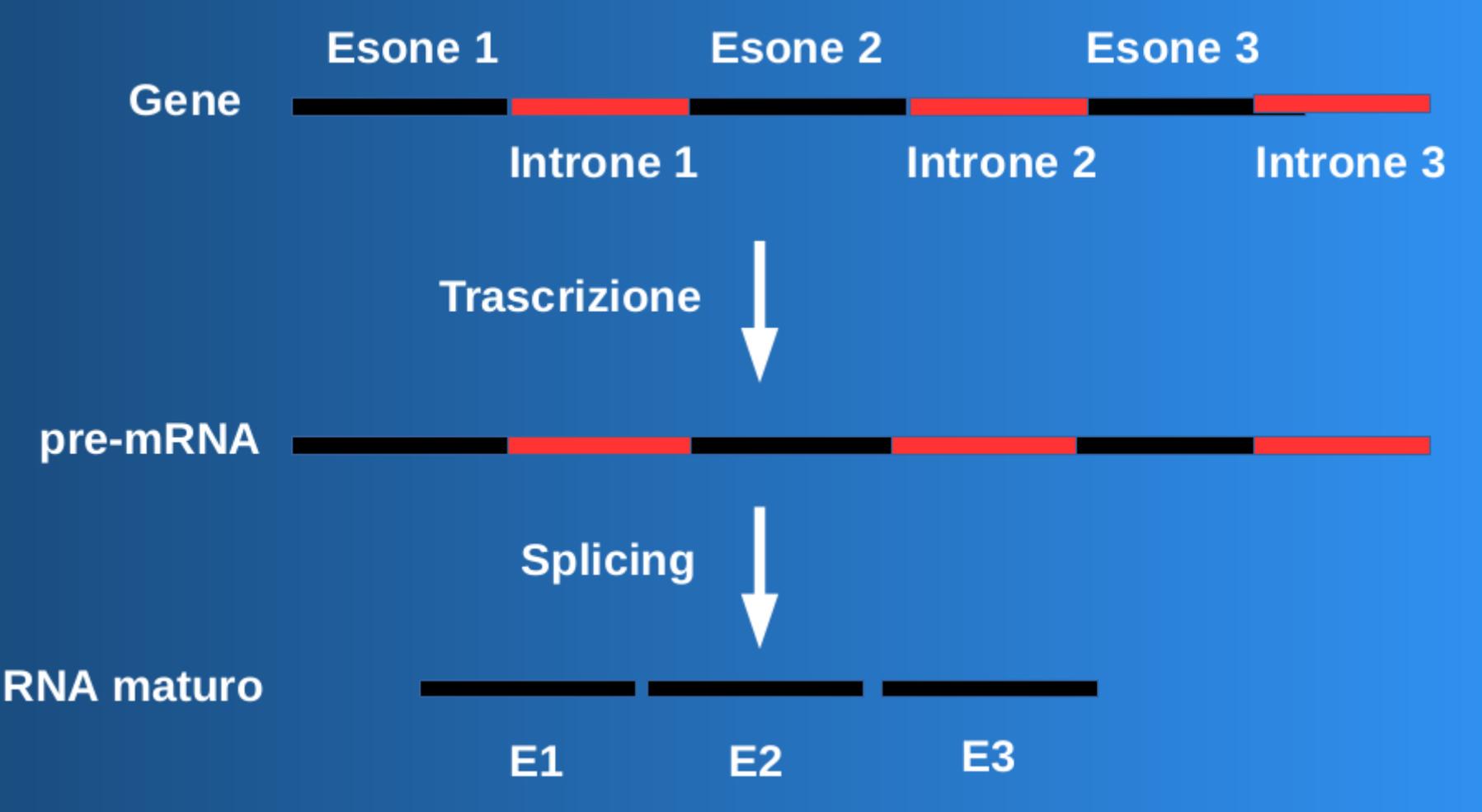
Giunzione degli esoni

Lo splicing è un processo che **salda due esoni consecutivi** operando tagli e ricongiunzioni in posizioni ben definite, con la risoluzione di una singola base.

La molecola di trascritto finale sarà MOLTO più corta rispetto al trascritto primario

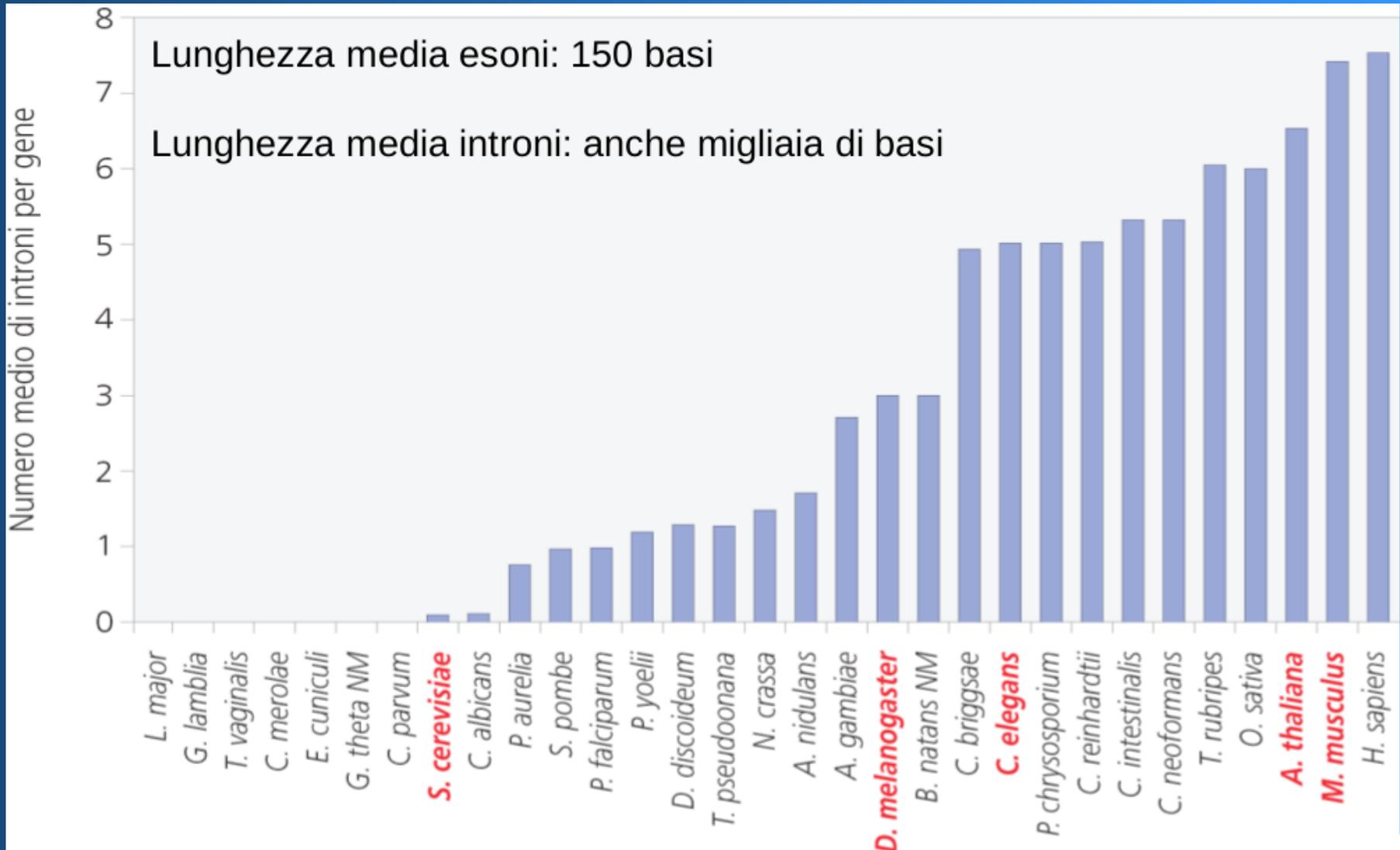


Maturazione del mRNA



Splicing del mRNA

Il numero di introni correla con la complessità dell'organismo



Splicing del mRNA

Il numero di esoni anti-correla con la complessità dell'organismo

TABELLA 7.1 ▼ Numero degli esoni presenti nei geni di varie specie eucariotiche

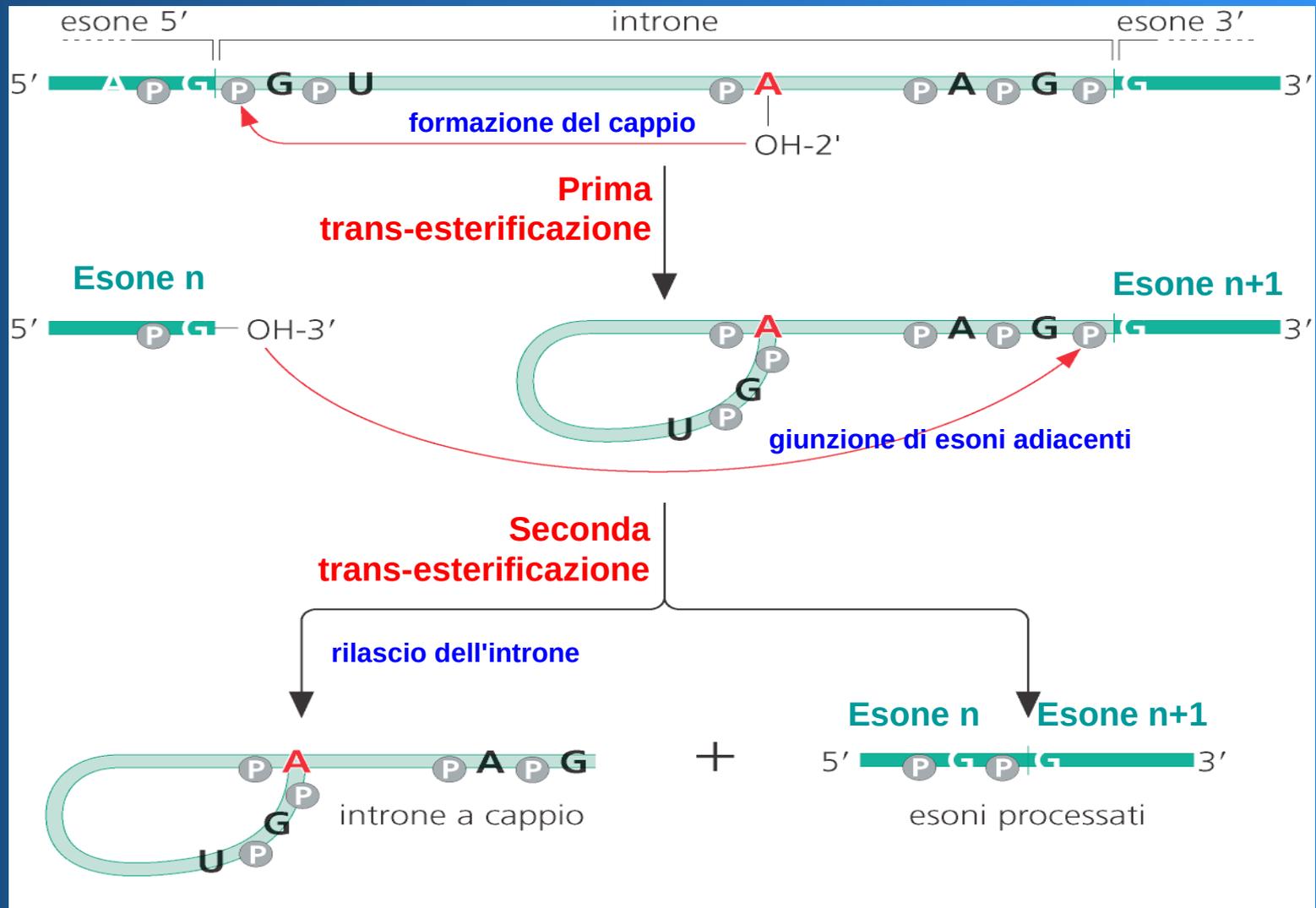
<i>Specie</i>	<i>N. totale geni</i>	<i>N. totale esoni</i>	<i>Lunghezza media di un esone</i>	<i>N. medio esoni per gene</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6136	6185	1412,6	1,055
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5374	9844	722,9	1,937
<i>Dictyostelium discoideum</i>	13.322	30.441	686,9	2,285
<i>Plasmodium falciparum</i>	5300	12.651	949,6	2,404
<i>Neurospora crassa</i>	10.093	26.598	533,5	2,742
<i>Drosophila melanogaster</i>	14.807	56.580	401,0	4,074
<i>Oryza sativa</i>	29.102	128.267	250,2	4,790
<i>Arabidopsis thaliana</i>	28.245	138.876	236,8	5,148
<i>Caenorhabditis elegans</i>	21.172	124.949	203,1	6,194
<i>Pan troglodytes</i>	23.962	177.922	170,2	7,450
<i>Mus musculus</i>	26.314	200.714	179,4	7,861
<i>Homo sapiens</i>	25.074	201.083	174,5	8,722

Splicing del mRNA

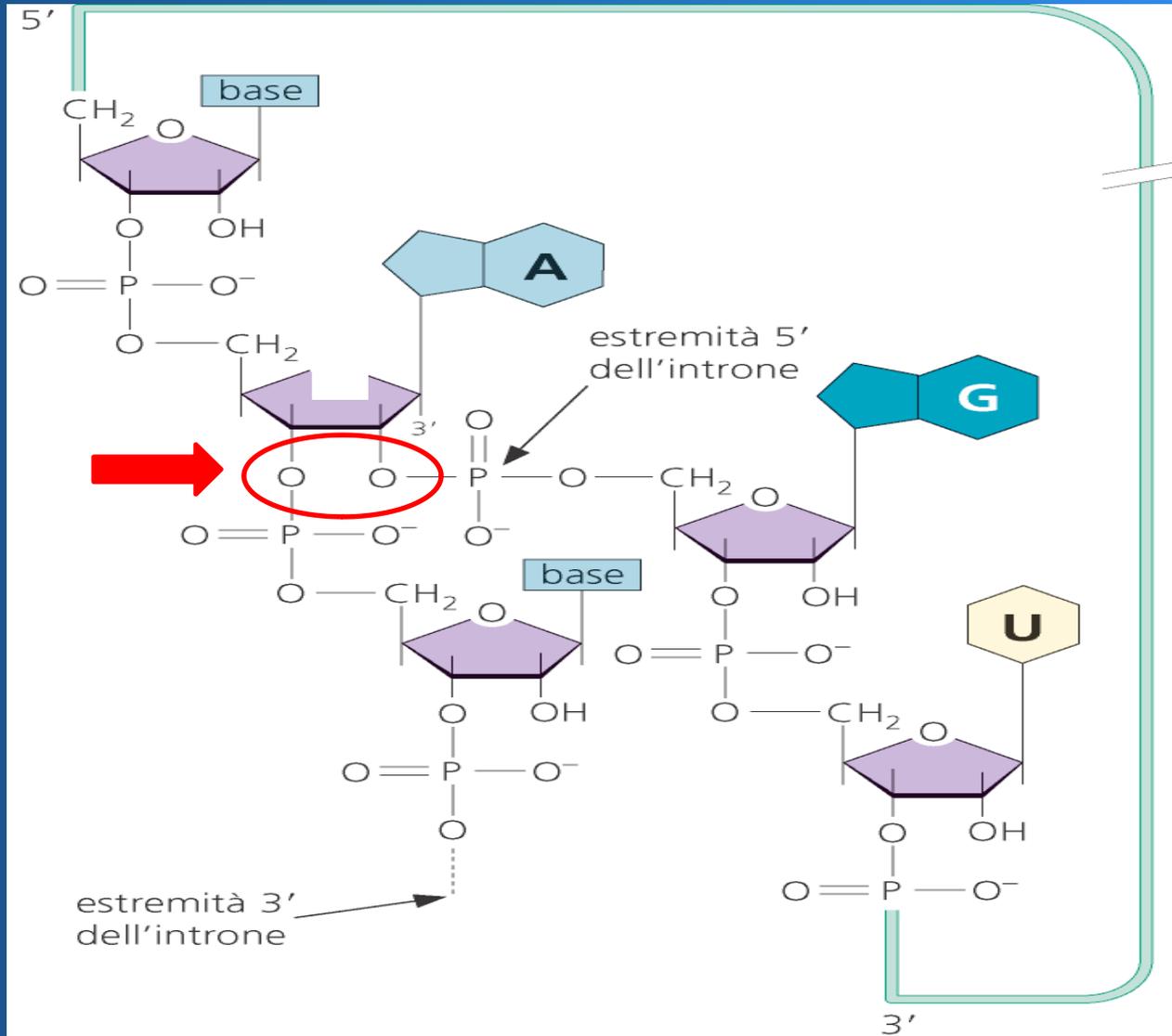
TABELLA 13.1 Le tre classi dello splicing dell'RNA

Classe	Diffusione	Meccanismo	Macchinario catalitico
Pre-mRNA nucleari	Molto comuni; vale per la maggior parte dei geni eucariotici	Due reazioni di transesterificazione, al punto di ramificazione A	Spliceosoma maggiore e minore
Introni del gruppo II	Rari; alcuni geni degli organelli degli eucarioti e alcuni geni dei procarioti	Lo stesso dei pre-mRNA	Enzima a RNA codificato dall'introne (<u>ribozima</u>)
Introni del gruppo I	Rari; rRNA nucleari di alcuni eucarioti, geni degli organelli e qualche gene procariotico	Due reazioni di transesterificazione, al punto di ramificazione G	Lo stesso del gruppo II

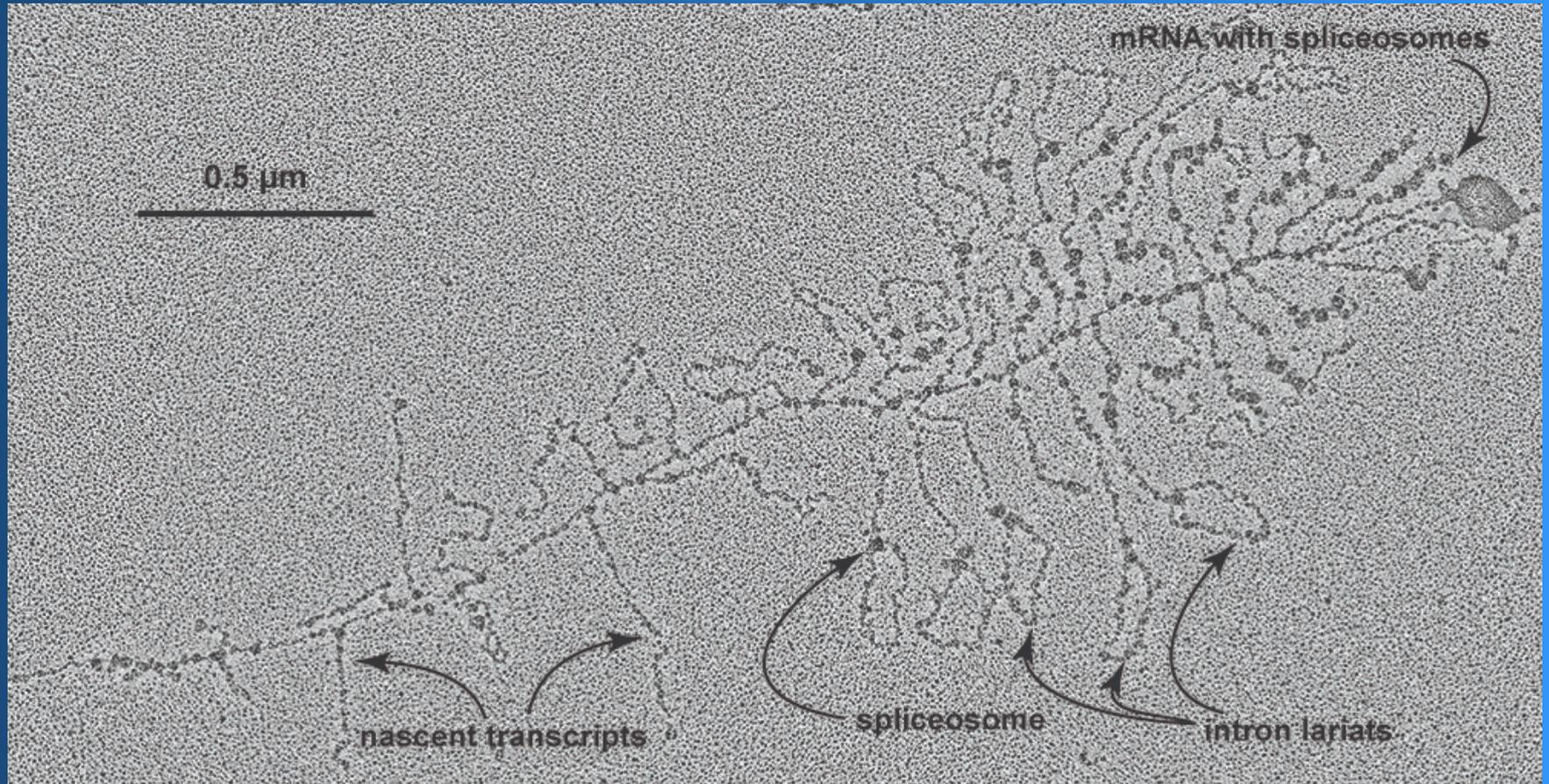
Meccanismo dello splicing



Introne a cappio

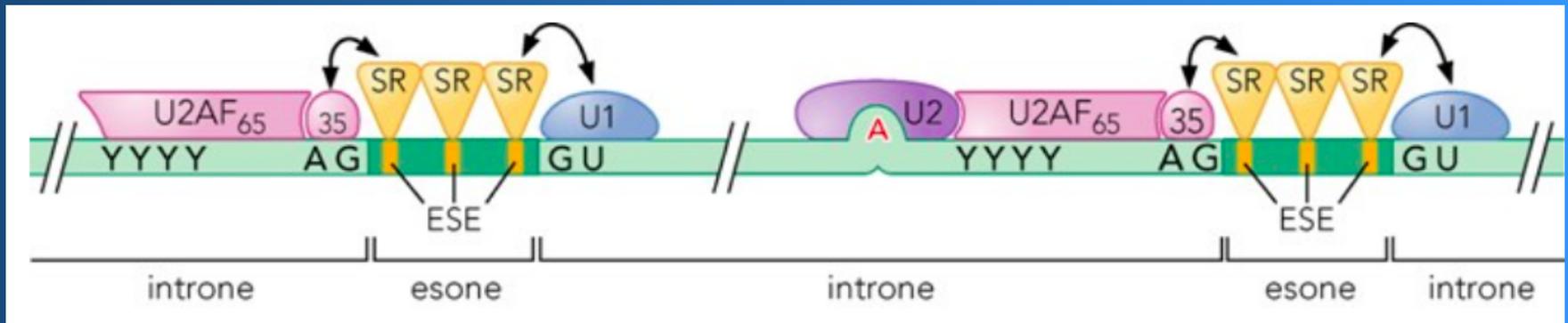


Lo spliceosoma



Definizione dell'introne

Proteine dette **SR** (ricche in Ser e Arg) si legano a sequenze di DNA dette **Exonic Splicing Enrancer (ESE)** che reclutano i fattori U2AF al 3' e U1 al 5'



Definizione dell'esone

SR proteins: marcano le posizioni 5'-3' del sito di splicing favorendo il riconoscimento di U1 e U2.

hnRNP: heterogeneous ribonucleoprotein, compattano gli introni in modo da favorire il ricongiungimento degli esoni

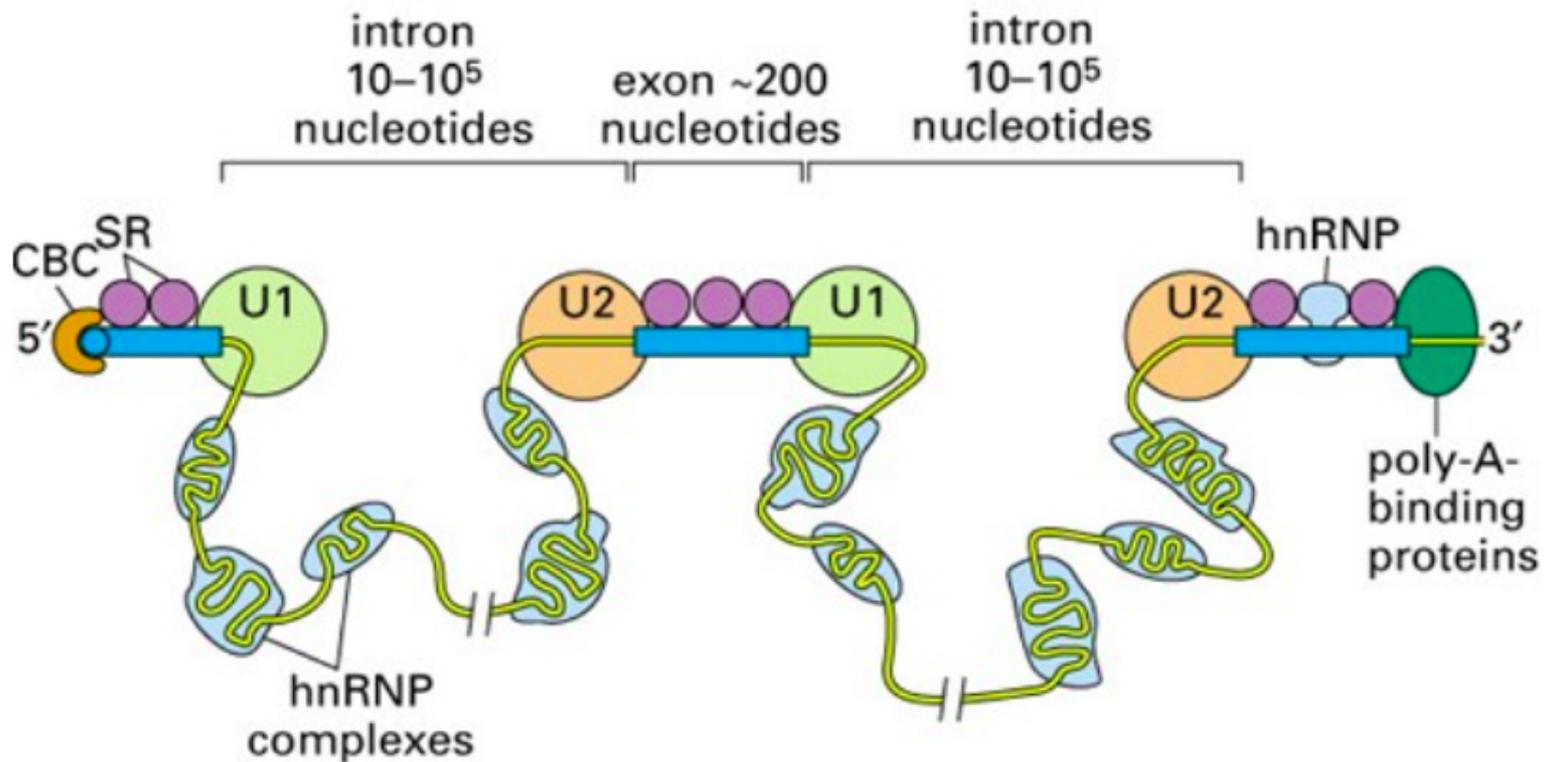
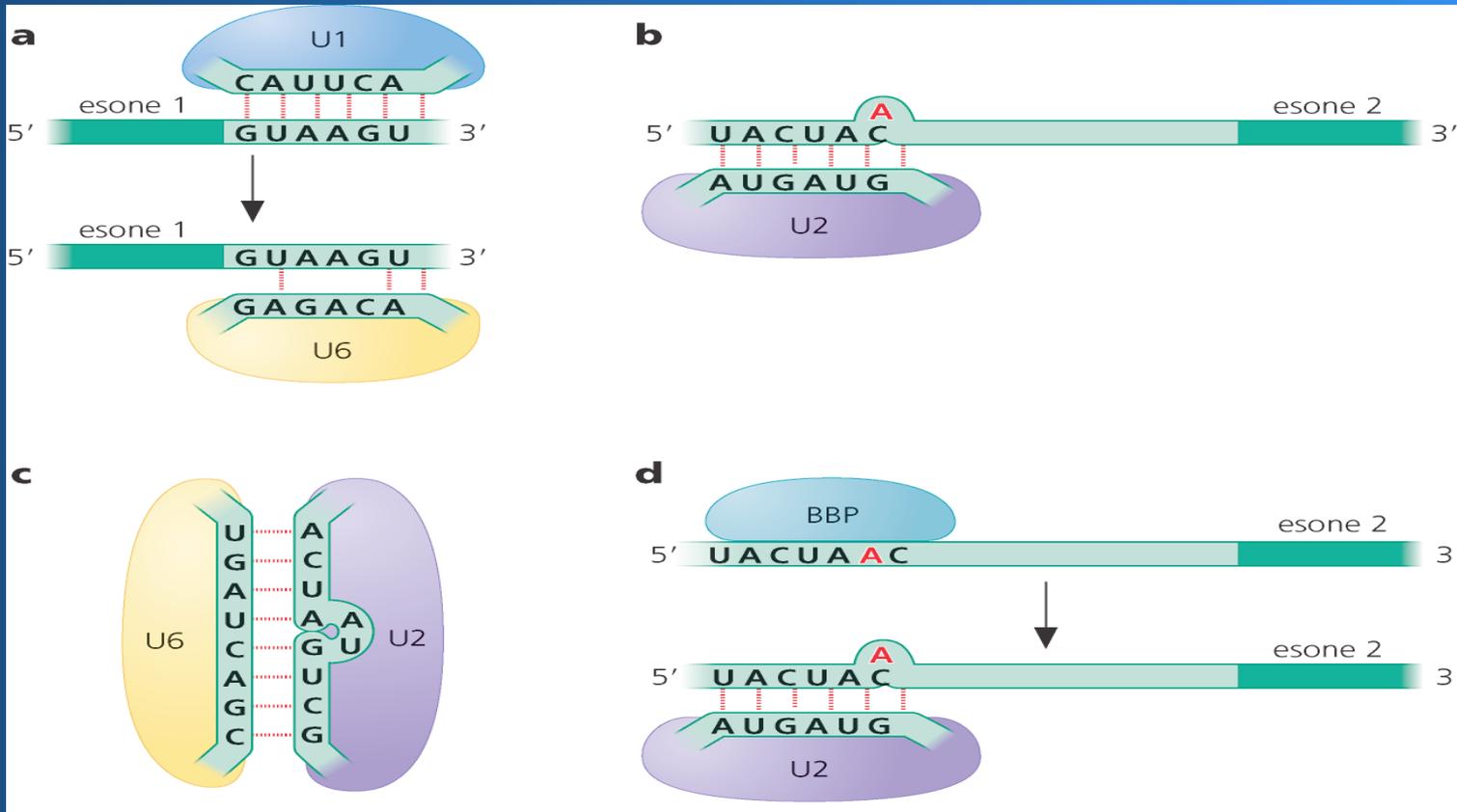


Figure 6-33. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

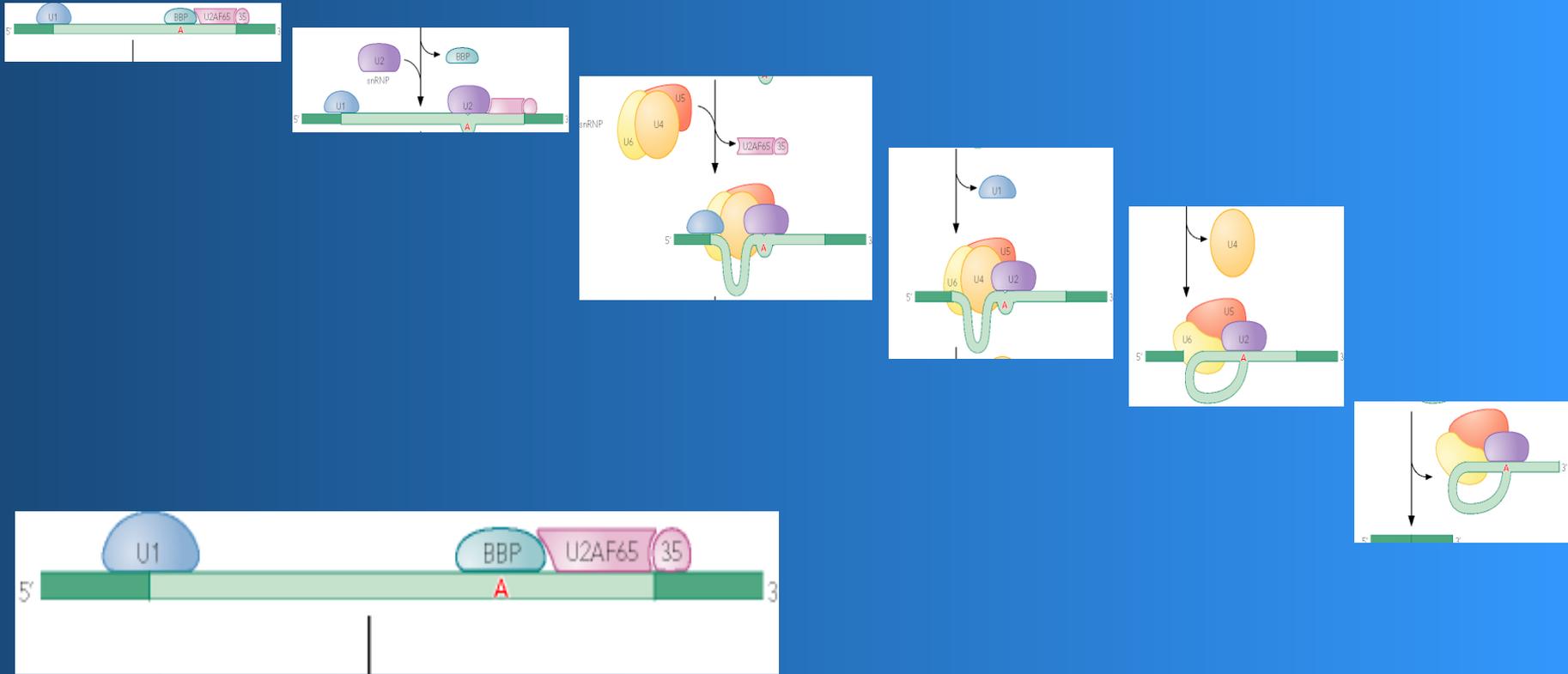
Lo spliceosoma

E' composto da:

- 150 proteine
- 5 small nuclear RNA (snRNA, U1, 2, 4, 5 e 6)

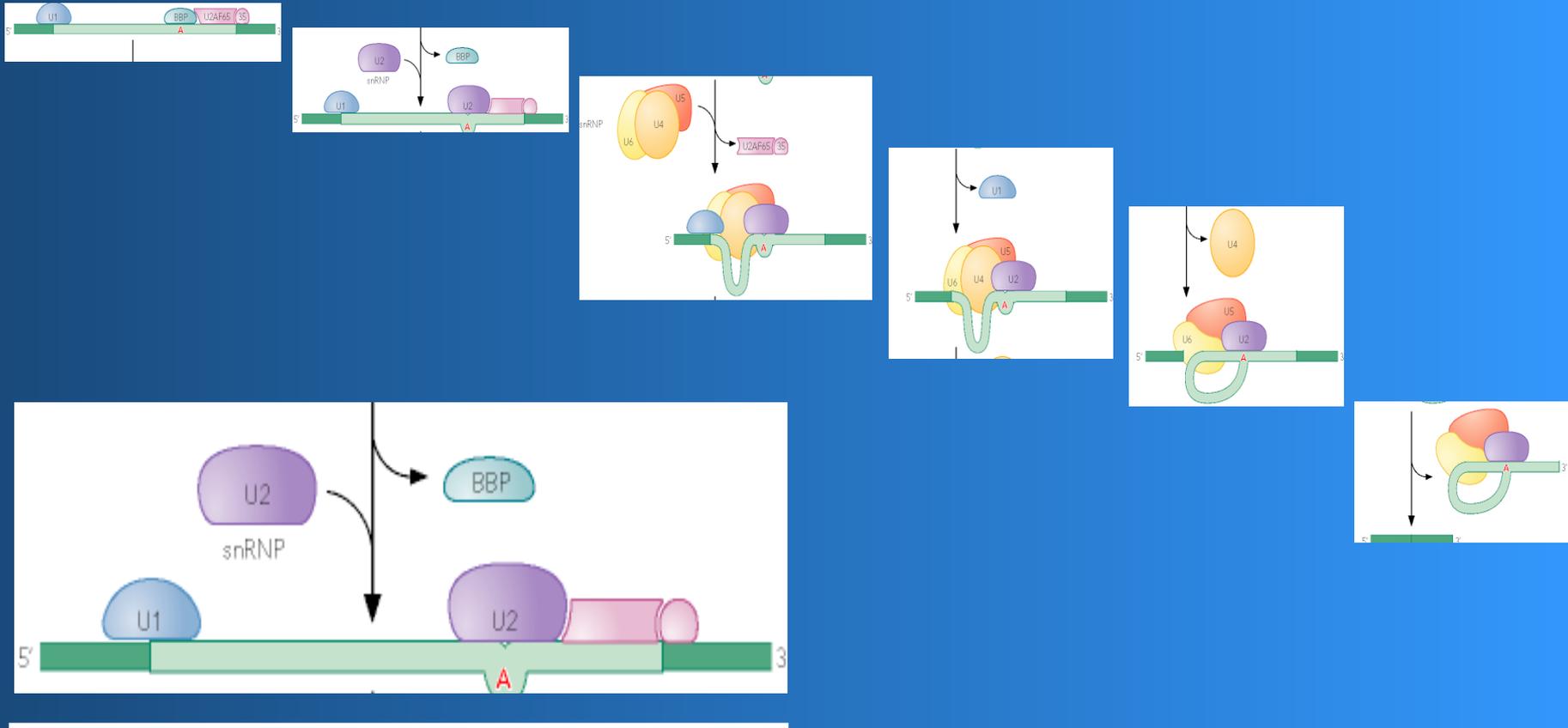


Meccanismo dello splicing



- ✓ U1 snRNP si lega al 5' splice-site
- ✓ U2AF si lega a Py tract ed al 3' splice-site
- ✓ Questa recluta BBP che si lega al branch site.
- ✓ Quindi tutti i siti sono riconosciuti

Meccanismo dello splicing



- ✓ U2 sostituisce BBP al branch site
- ✓ L'appaiamento tra i due RNA spinge in fuori la A del branch site, che diventa disponibile all'attacco

Meccanismo dello splicing



- ✓ ingresso della tripla U4/U5/U6 e rilascio di U2AF
- ✓ il complesso si riarrangia e si avvicinano i 2 siti di splicing

Meccanismo dello splicing



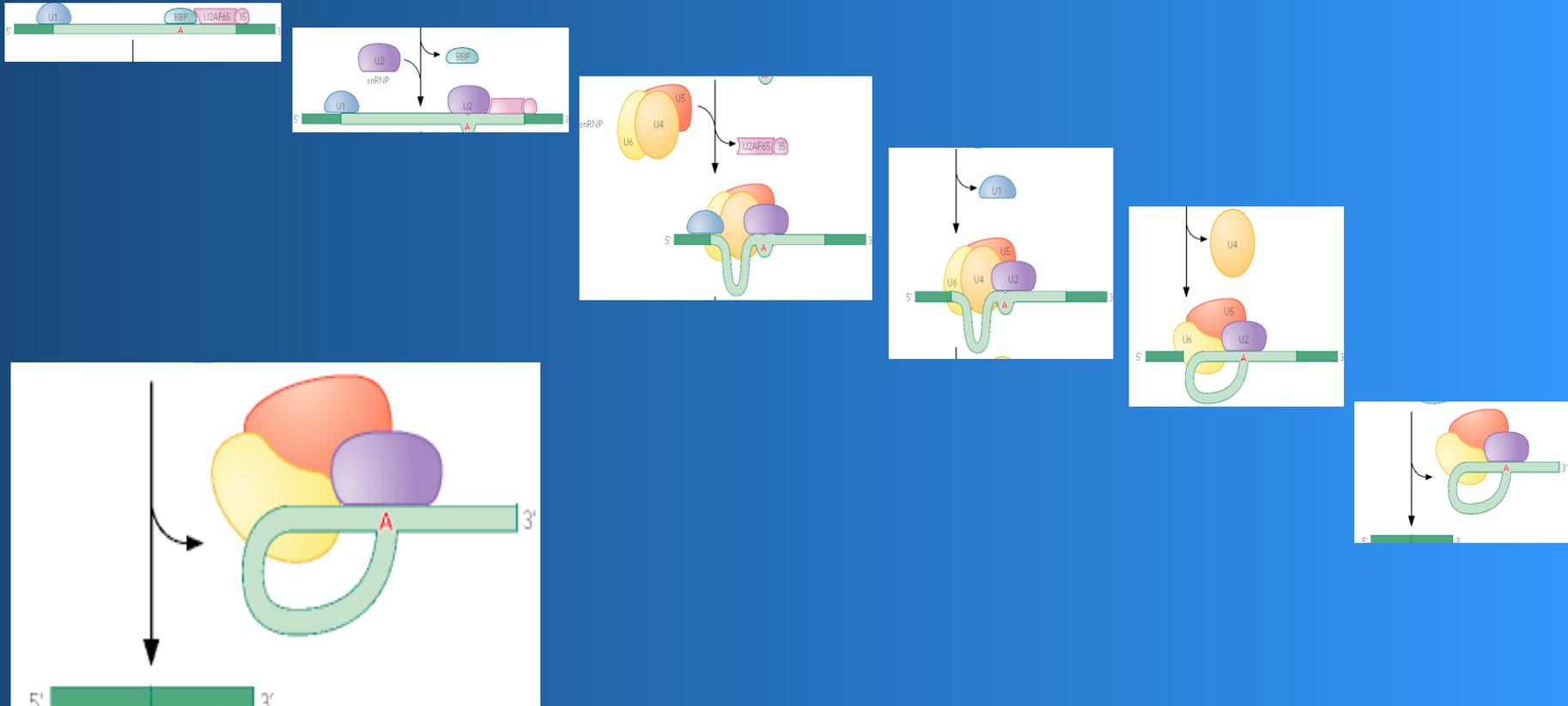
✓ U6 sostituisce U1 al 5'splice -site

Meccanismo dello splicing



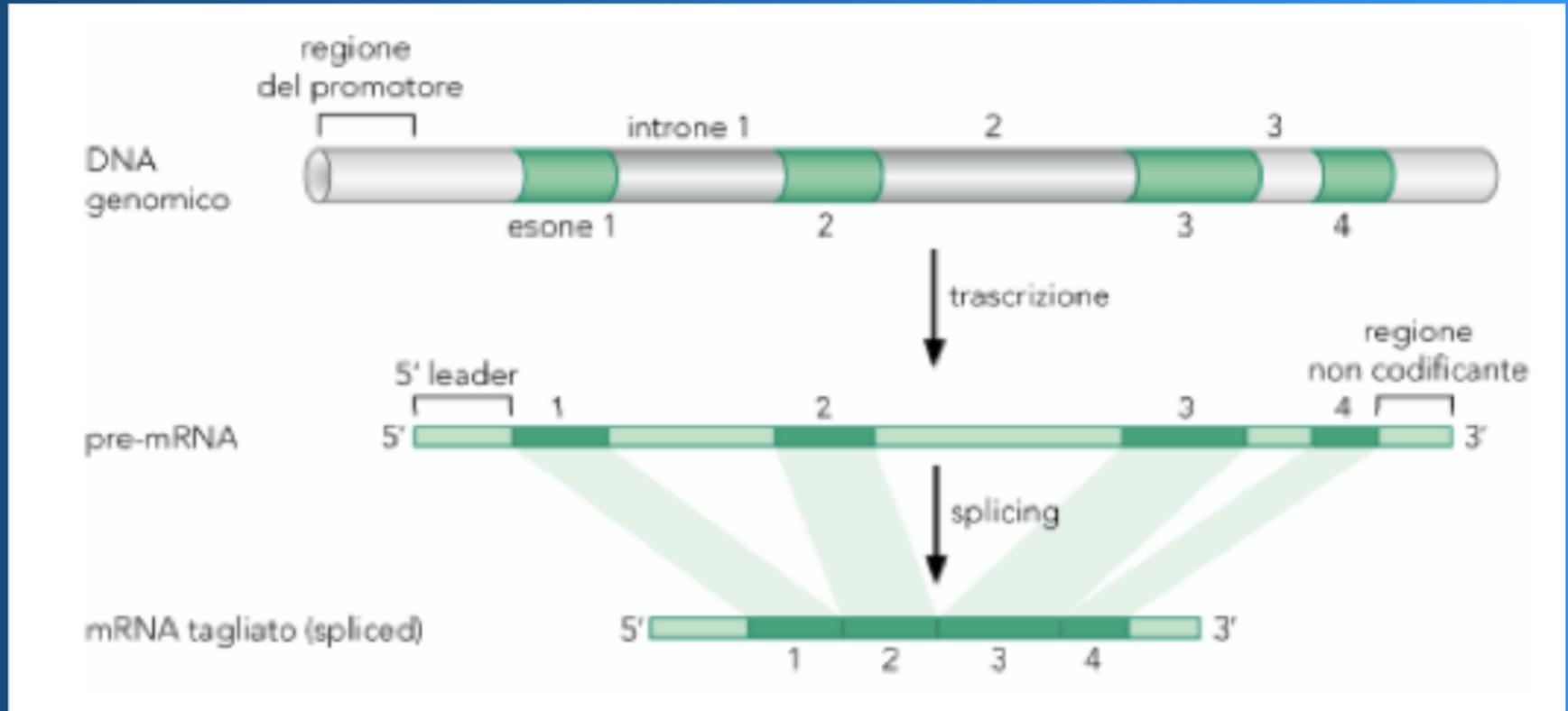
- ✓ U4 viene rilasciato, U2 e U6 interagiscono appaiando gli RNA
- ✓ Si forma il **sito attivo**, composto principalmente da RNA
- ✓ Il 5' splice site si avvicina a U2-U6 (prima trans-esterificazione).
- ✓ U5 avvicina i siti 3' e 5' (seconda transesterificazione).

Meccanismo dello splicing



✓ Il cappio e le SnRNP vengono rilasciati

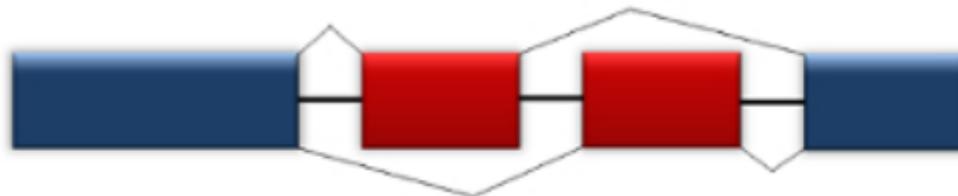
Meccanismo dello splicing



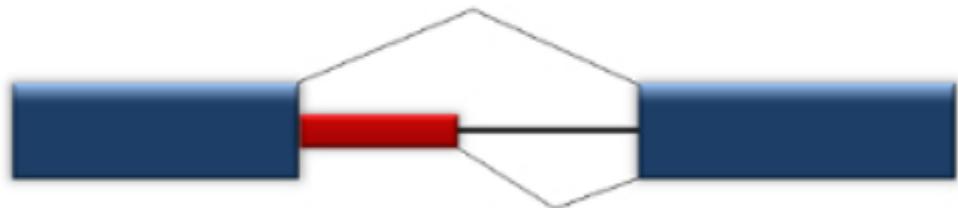
Aumento della variabilità trascrizionale



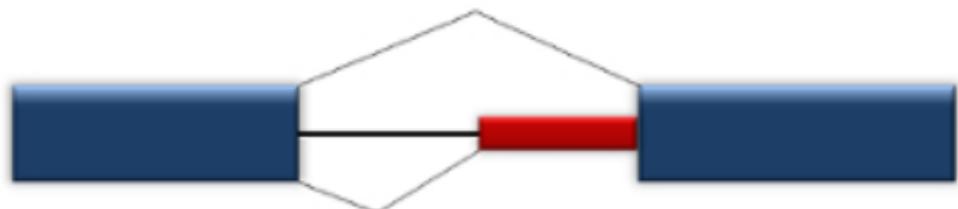
Exon skipping



Mutually exclusive exons



Alternative 5' splice site



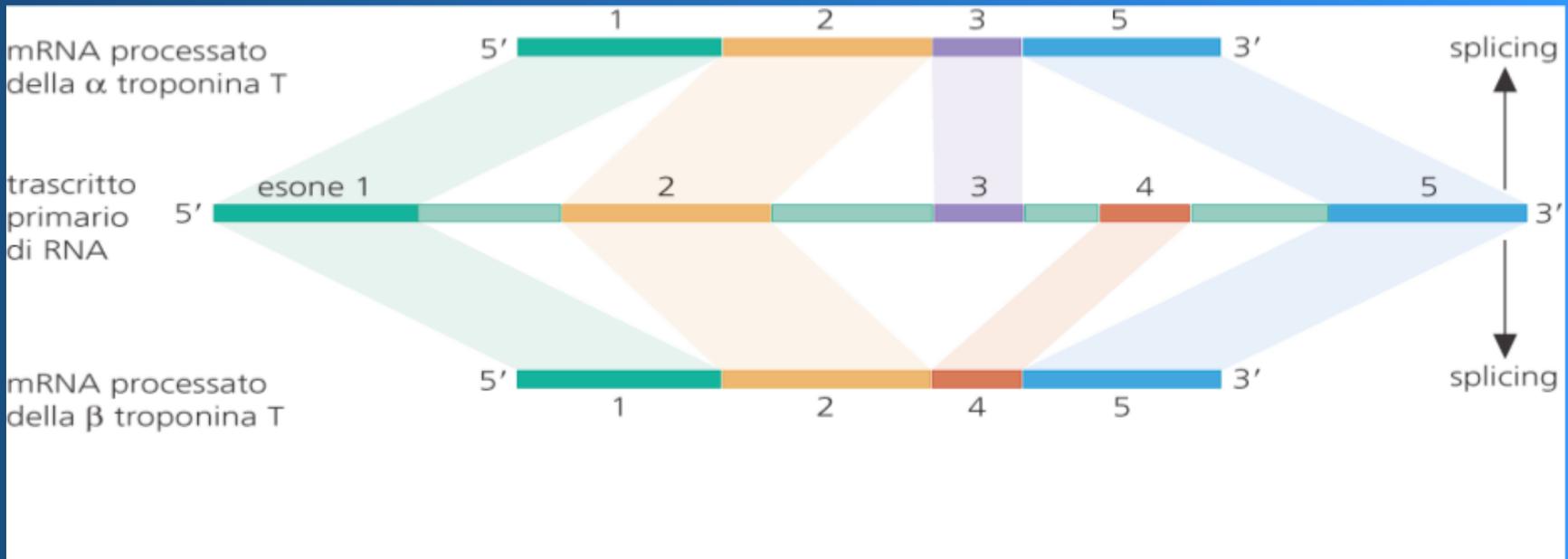
Alternative 3' splice site



Intron retention

Splicing alternativo

- ✓ Presente nei trascritti del 75% dei geni umani
- ✓ In genere 2 prodotti diversi; in alcuni casi molti di più

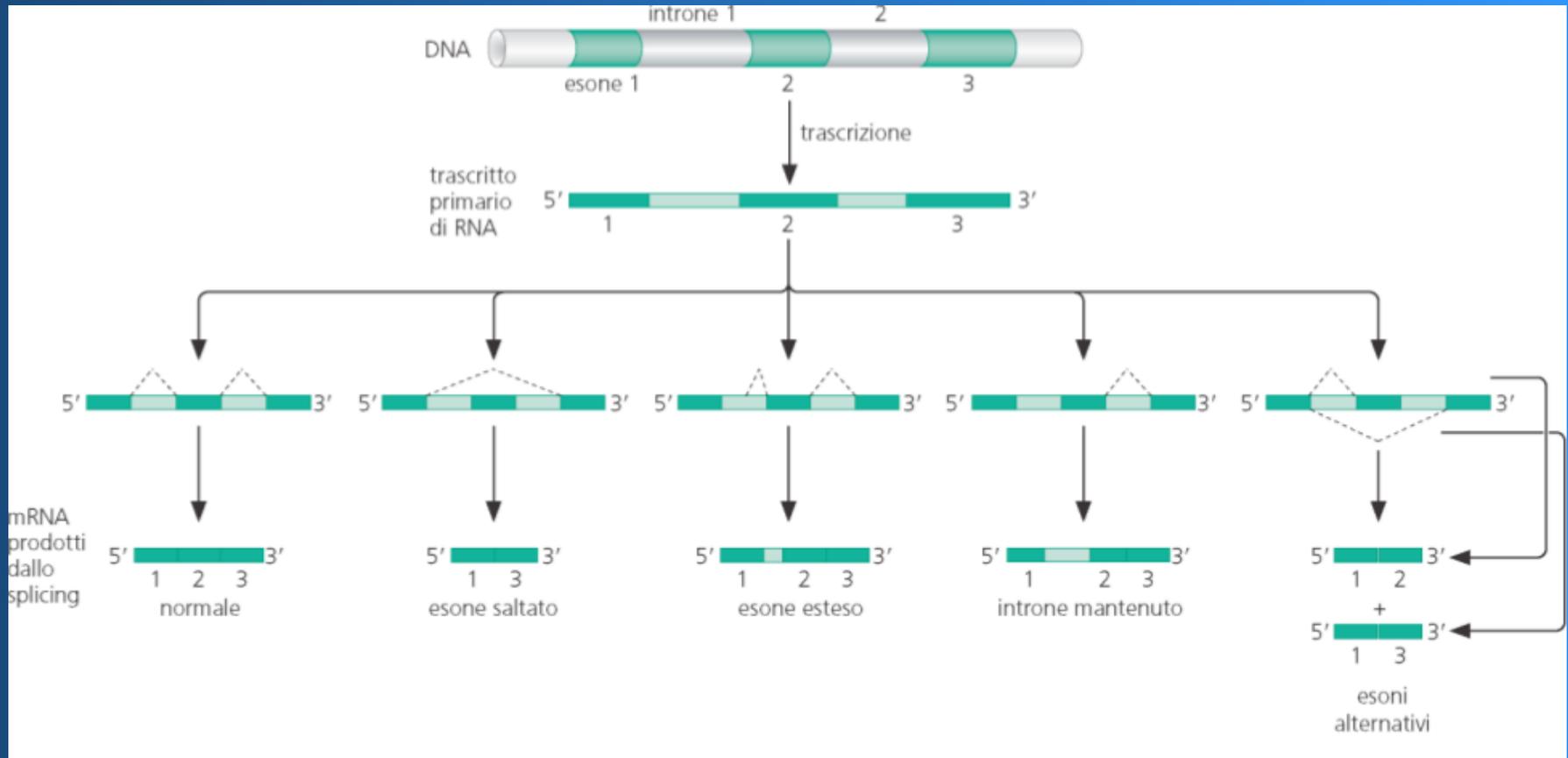


In questo esempio lo splicing può ignorare l'esone 3 oppure il 4

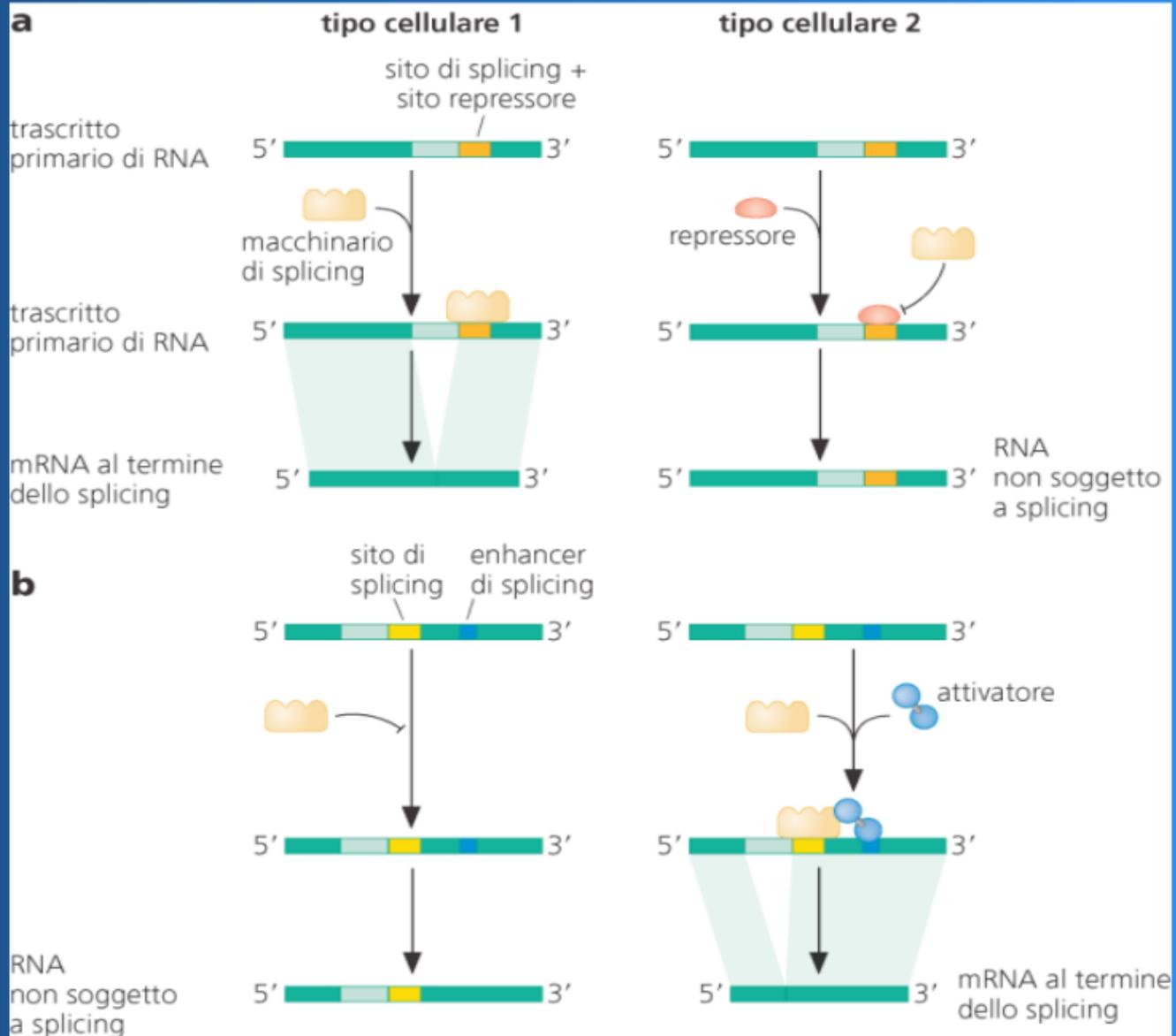
Splicing alternativo

Le diverse forme di mRNA possono essere

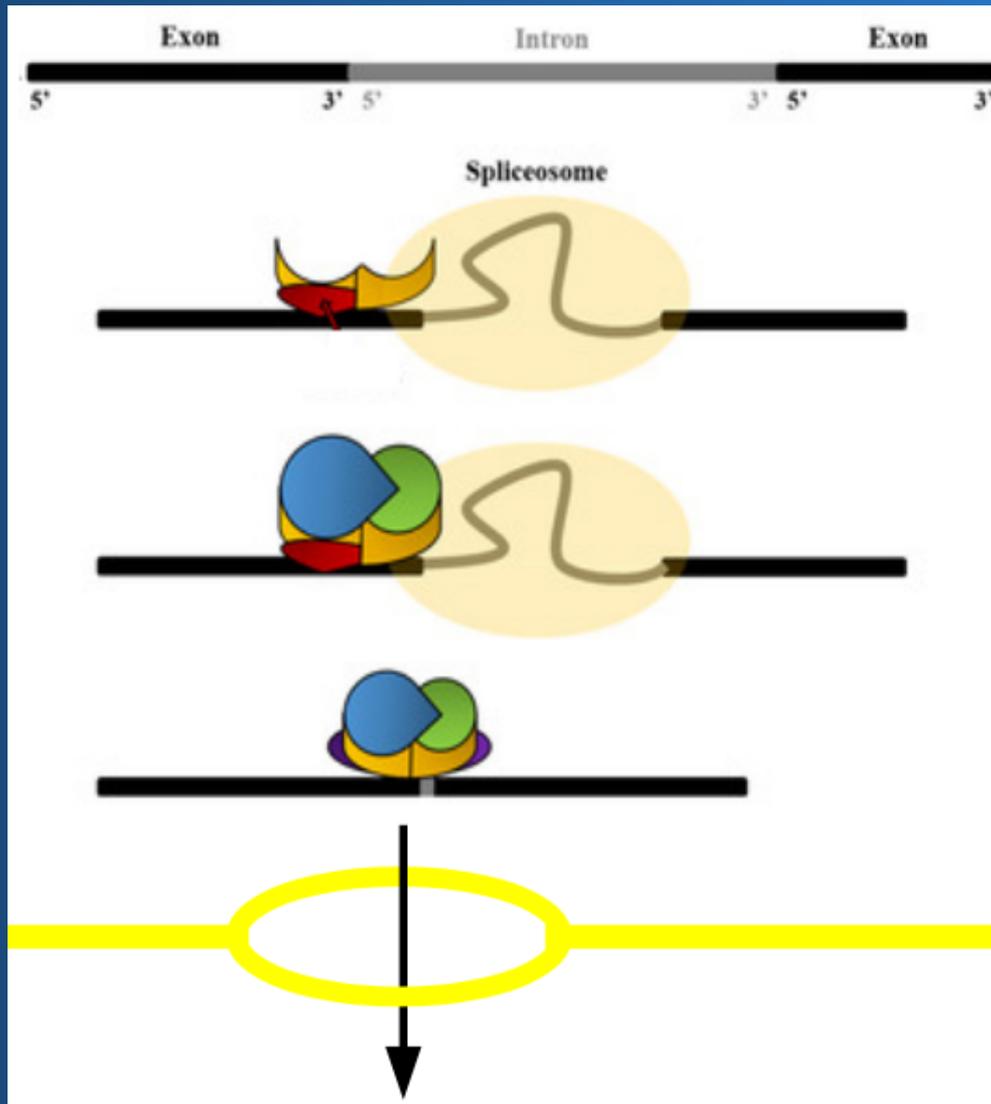
- prodotte contemporaneamente
- mutualmente esclusive



Regolazione dello splicing alternativo



Exon Junction Complex: le etichette dei siti di splicing



pre-mRNA

riconoscimento del sito di splicing

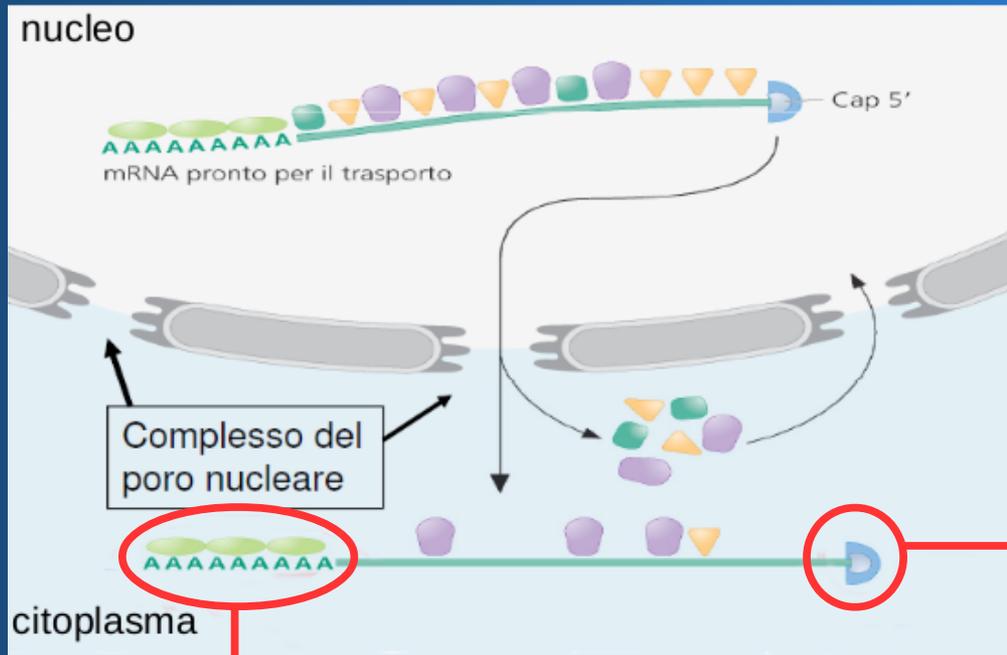
marcatura dei sito di splicing

splicing e posizionamento dei complessi di giunzione

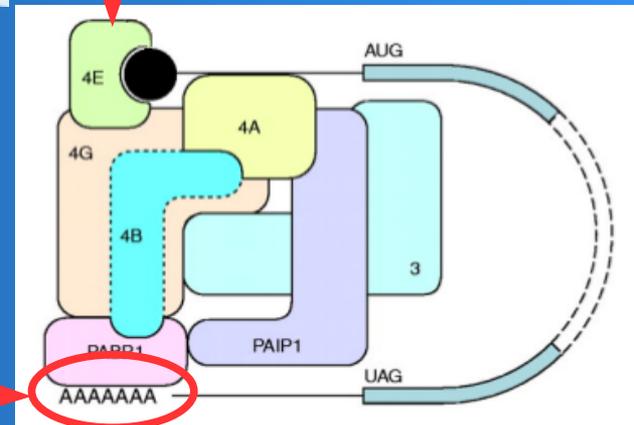
esportazione al citoplasma

Esportazione dei mRNA

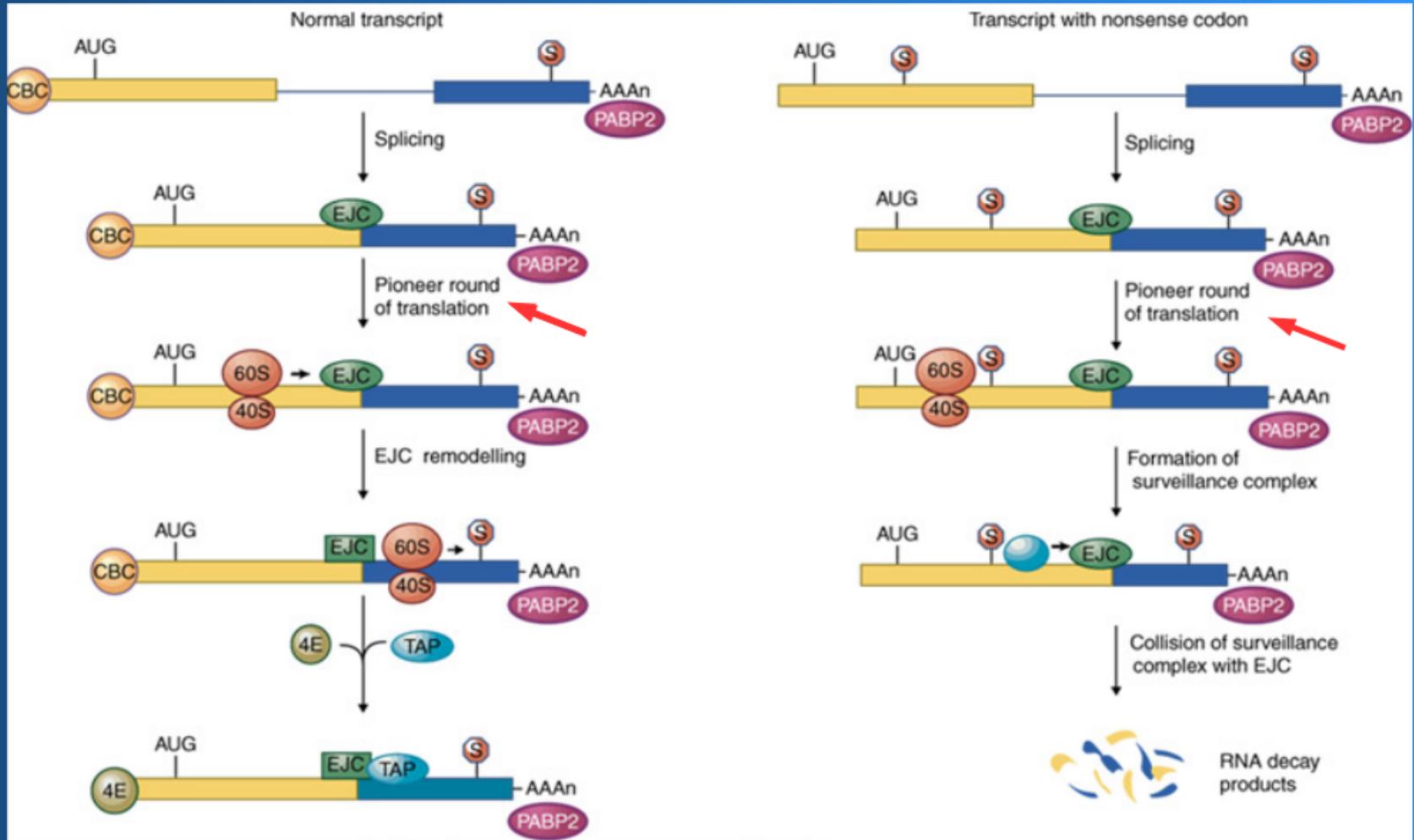
I mRNA vengono prodotti e maturati nel nucleo, dal quale devono essere esportati affinché si possa realizzare la traduzione dell'informazione in proteine



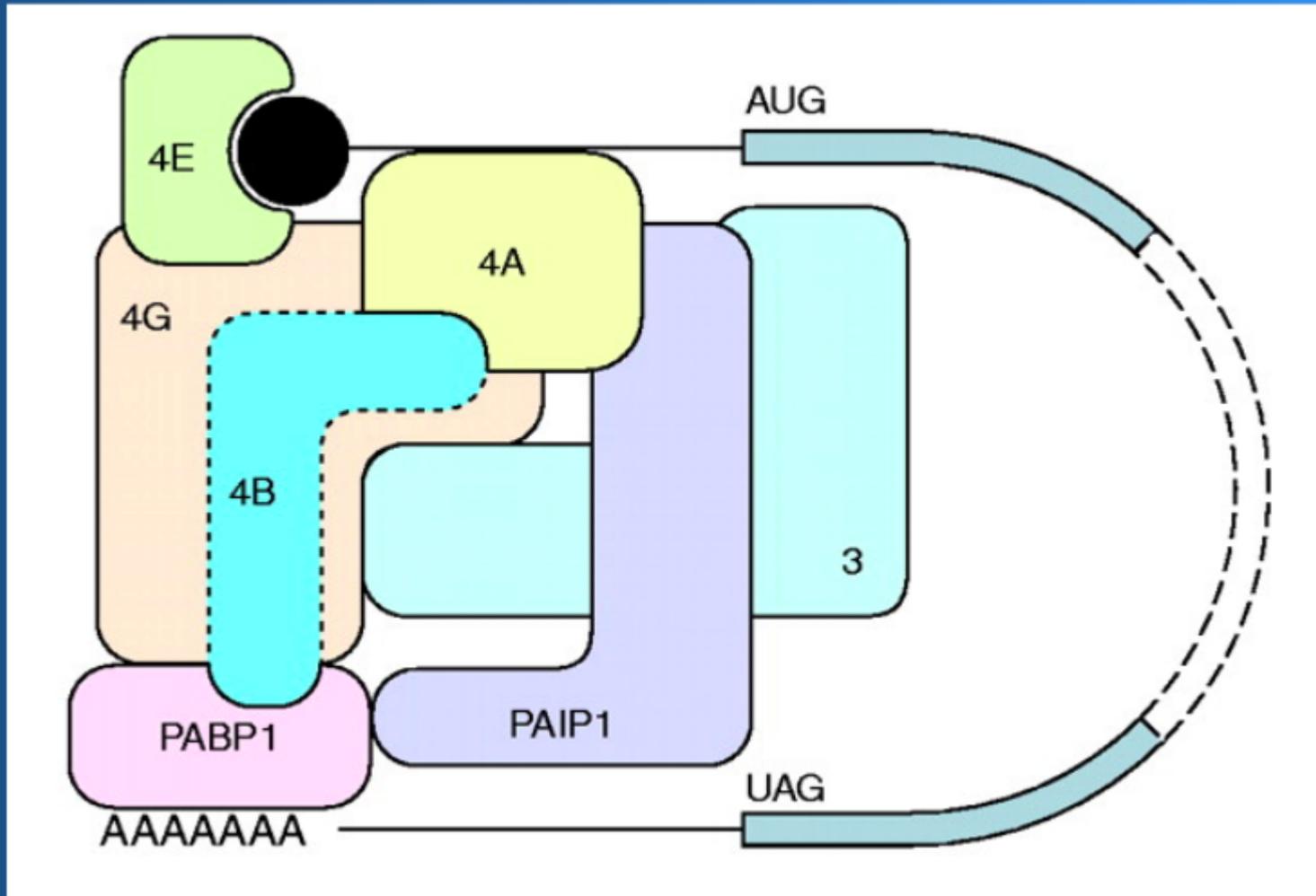
Il cap e la coda poly-A mediano il contatto del mRNA con il ribosoma



Messaggi dallo splicing: il nonsense mediated decay



Traduzione: mRNA circolarizzati



Introni ed esoni

DOMANDA: gli introni sono stati

- ✓ persi dai procarioti (introni precoci) o
- ✓ acquisiti dagli eucarioti (introni tardivi) ?

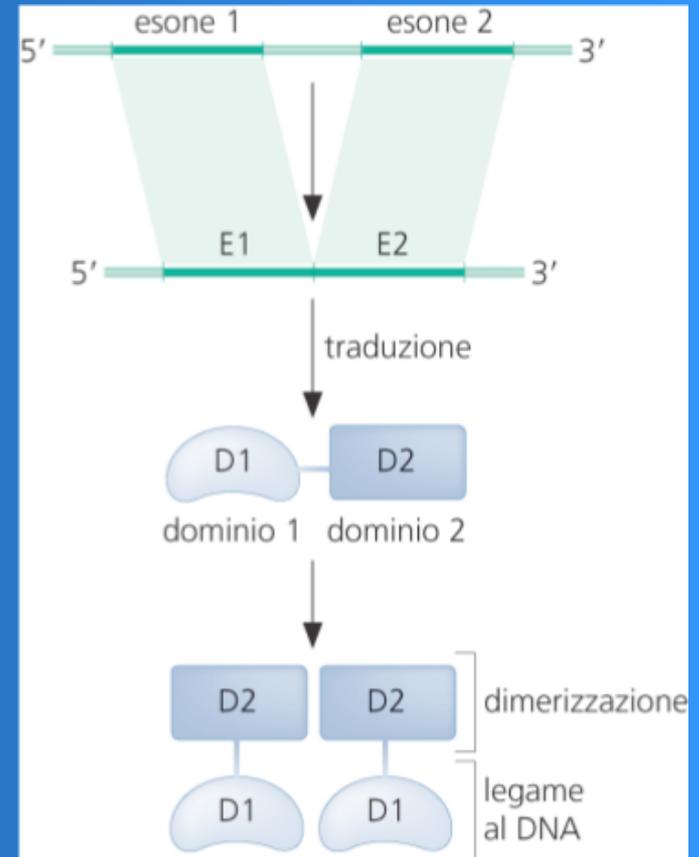
DOMANDA: perché gli esoni si sono mantenuti?

lo splicing alternativo può formare prodotti proteici multipli da un singolo gene

il rimescolamento degli esoni nell'evoluzione può creare nuovi geni, infatti:

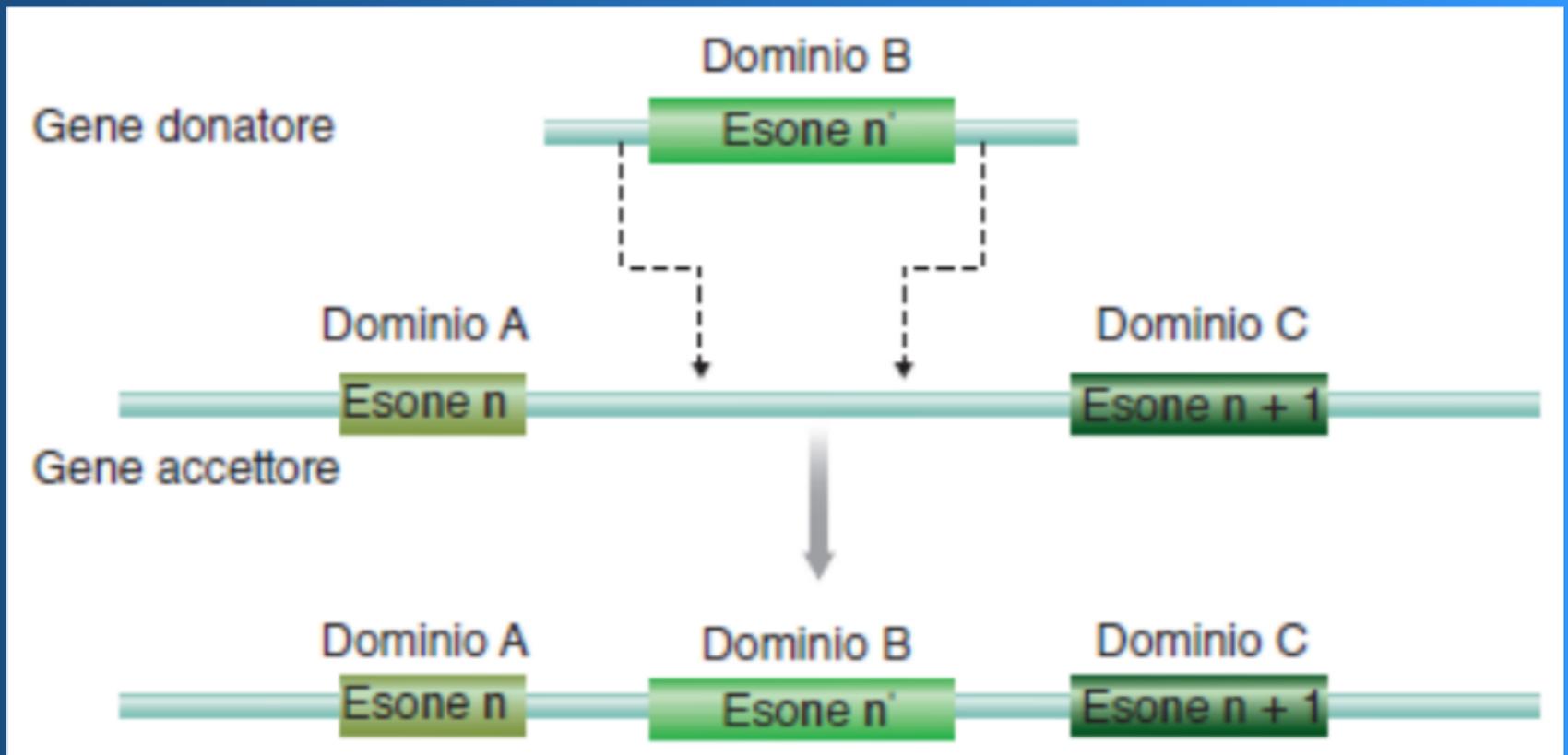
- **molti domini proteici spesso sono codificati da un esone**

- gli esoni sono sottoposti a duplicazione e divergenza



Exon shuffling

Gli esoni durante l'evoluzione degli organismi si sono mescolati: si ipotizza una ricombinazione intronica che ha determinato la perdita o l'aggiunta di un esone (quindi di un dominio funzionale!)



Splicing e patologie umane

Sono note numerose patologie associate a **errori nello splicing**:

- ✓ **Mutazioni in cis**: mutazioni a carico di sequenze che guidano i meccanismi di splicing legando i vari componenti dello spliceosoma
- ✓ **Mutazioni in trans**: mutazioni a carico dei componenti dello spliceosoma

Splicing e β talassemie

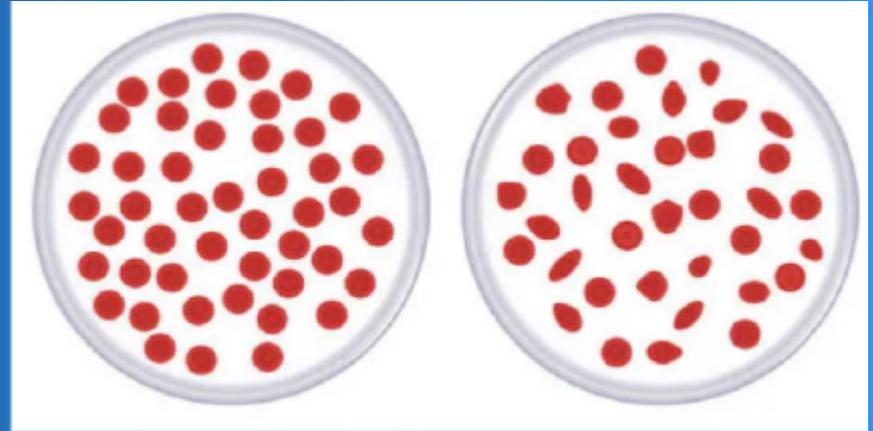
Le talassemie sono patologie del sangue dovute ad uno sbilanciamento delle forme α e β dell'emoglobina. Una delle possibili cause della talassemia β è una mutazione a singola base

AA

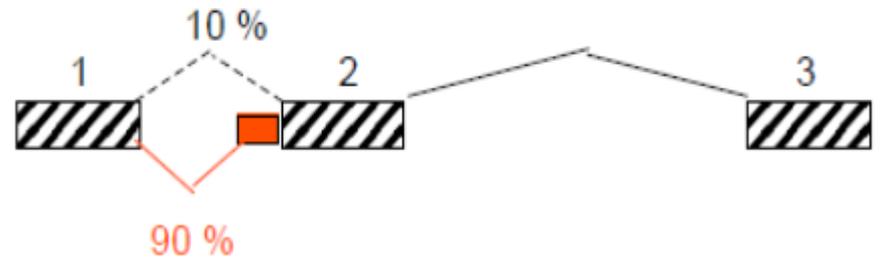
AG

che causa la comparsa di un sito di splicing non previsto nell'introne 1, subito a monte dell'esone 2.

Nel trascritto mutato si crea un codone di stop precoce e quindi una proteina tronca



GG \rightarrow AG



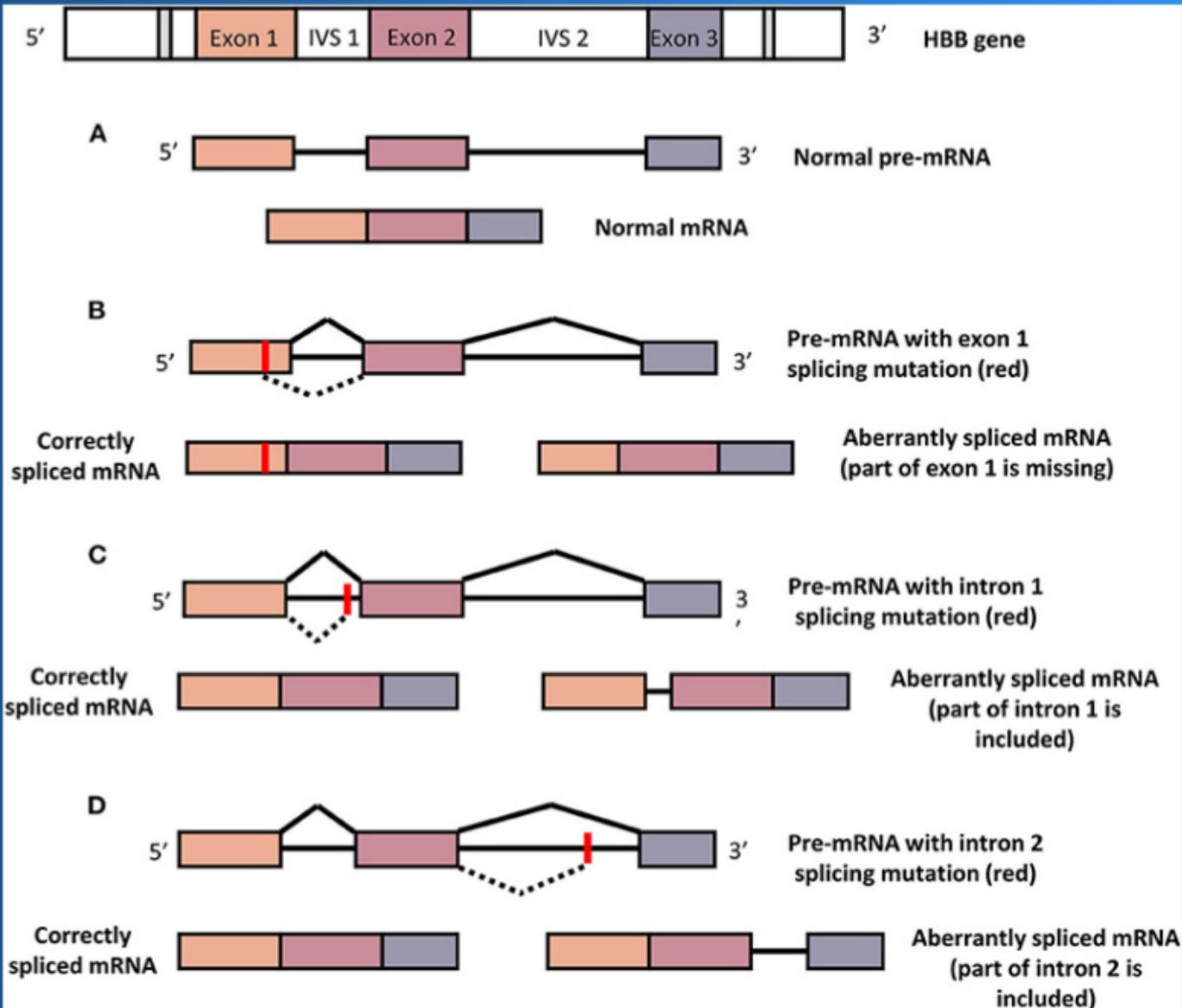
3. Hb E

(b^+ , b^E)

60% Hb A

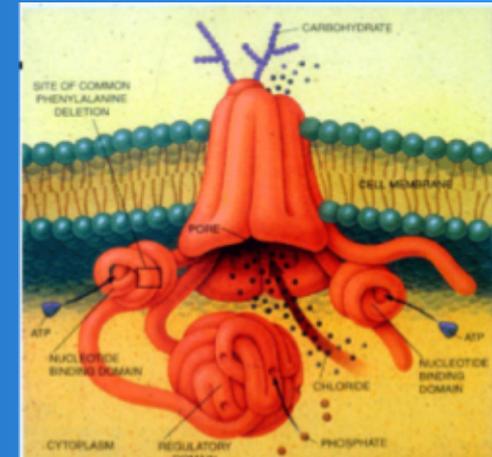
40% Hb E

Splicing ϵ β thalassemie

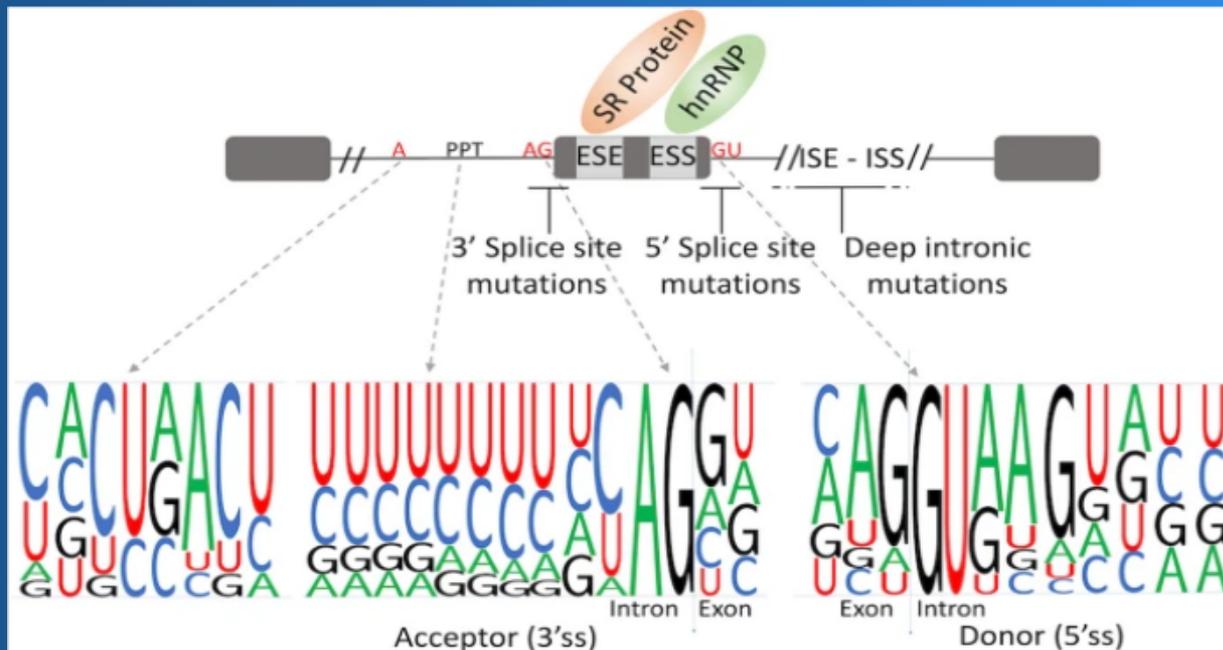


Fibrosi cistica

Il gene CFTR codifica un canale per gli ioni cloruro. Sono note molte mutazioni del gene (oltre 2000), per lo più in regioni codificanti ma anche in regioni rilevanti per il suo splicing.



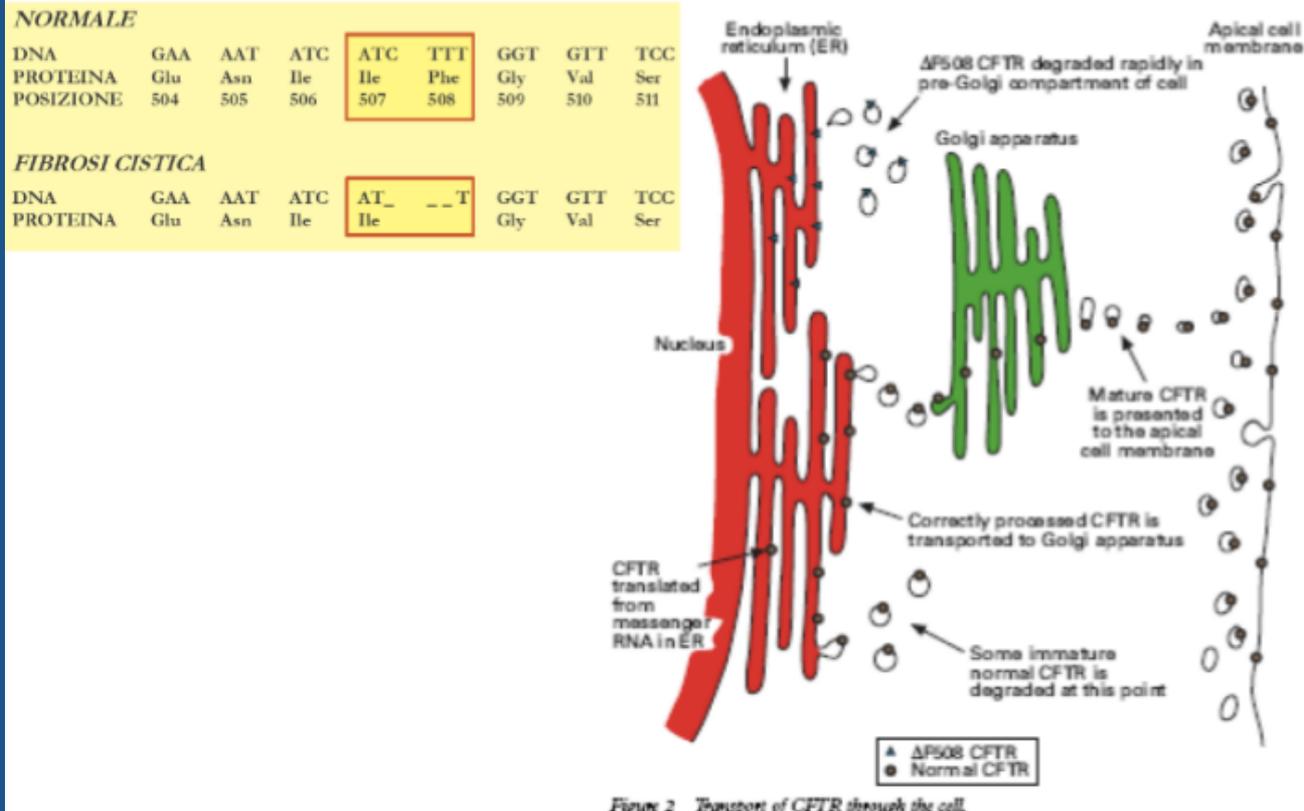
Alcune forme di CF sono causate da splicing aberrante.



Mutazioni e fibrosi cistica

Alterazione genica più comune (circa 70% dei casi):

$\Delta F508$

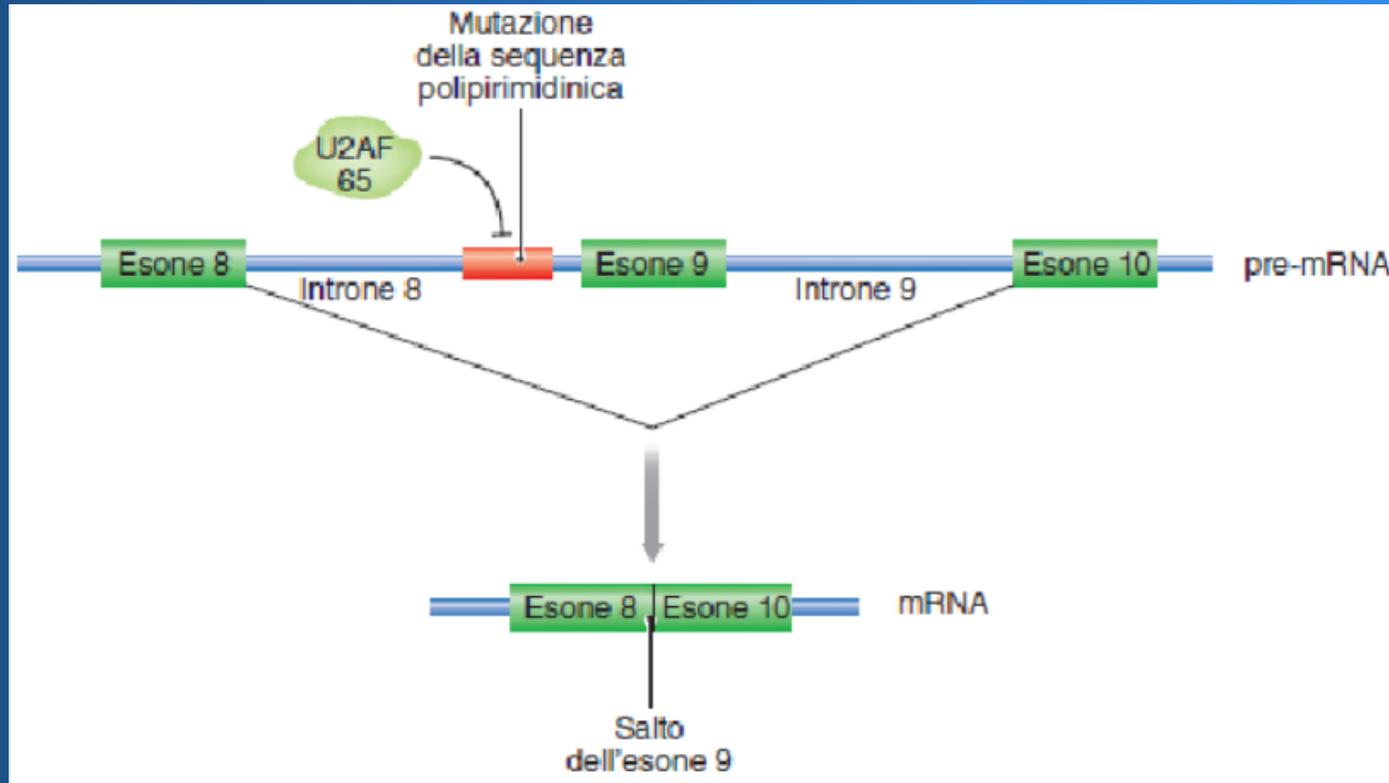


La delezione $\Delta F508$ sul gene CFTR determina un errato ripiegamento della proteina canale del cloro che non permette la sua corretta inserzione nella membrana plasmatica.

Splicing e fibrosi cistica

L'introne 8 del gene CFTR presenta regione polipirimidinica (Py-tract) al 3'. Mutazioni (delezioni) in questa regione impattando negativamente sul riconoscimento del sito di splicing dell'esone 9.

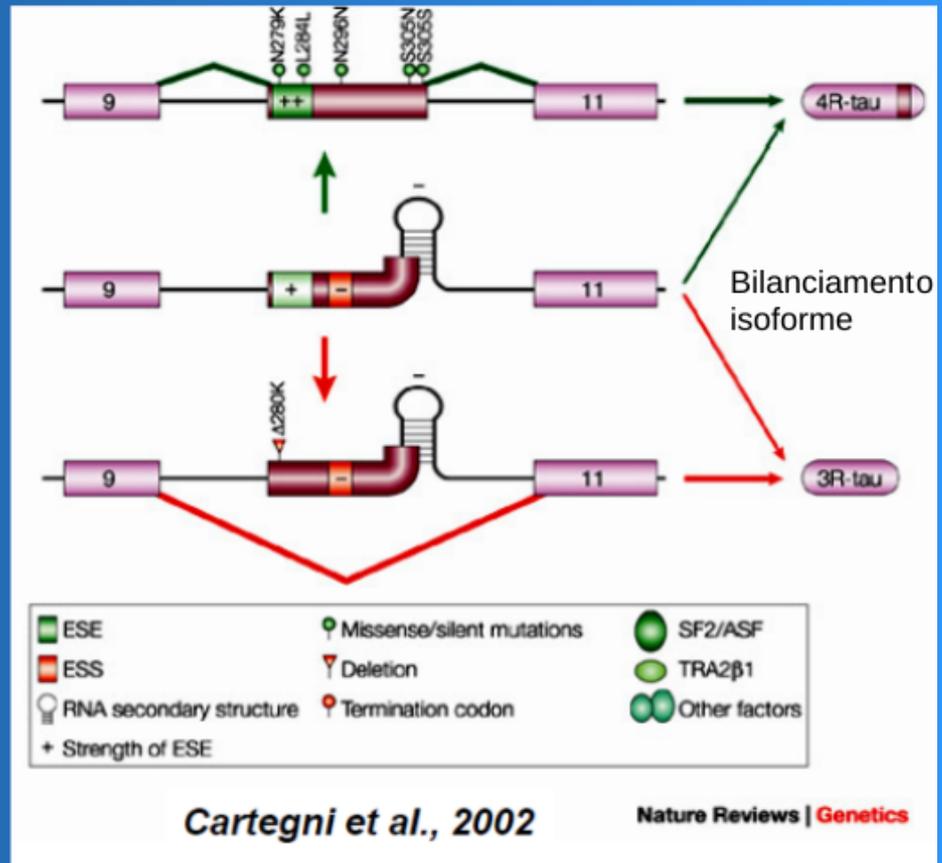
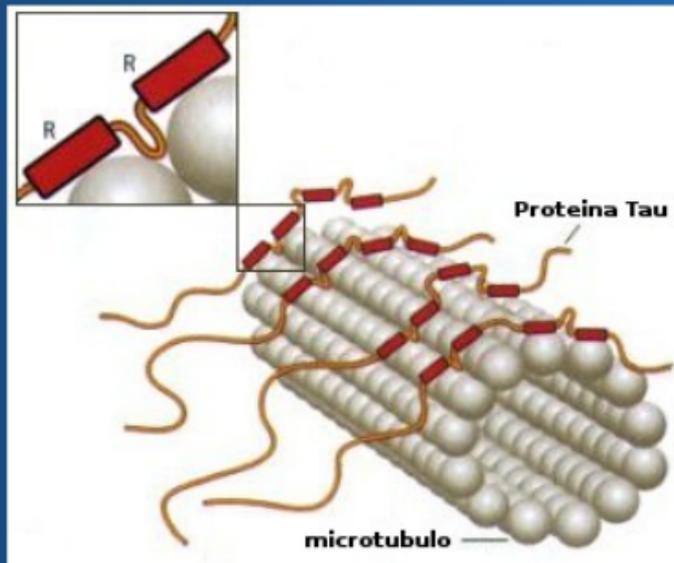
A causa di questo, l'esone 9 viene "saltato" (**exon skipping**), formando una proteina canale non funzionante



Splicing e demenza

Il gene MAPT (cromosoma 17) produce la proteina TAU che organizza e rinforza i microtubuli cellulari.

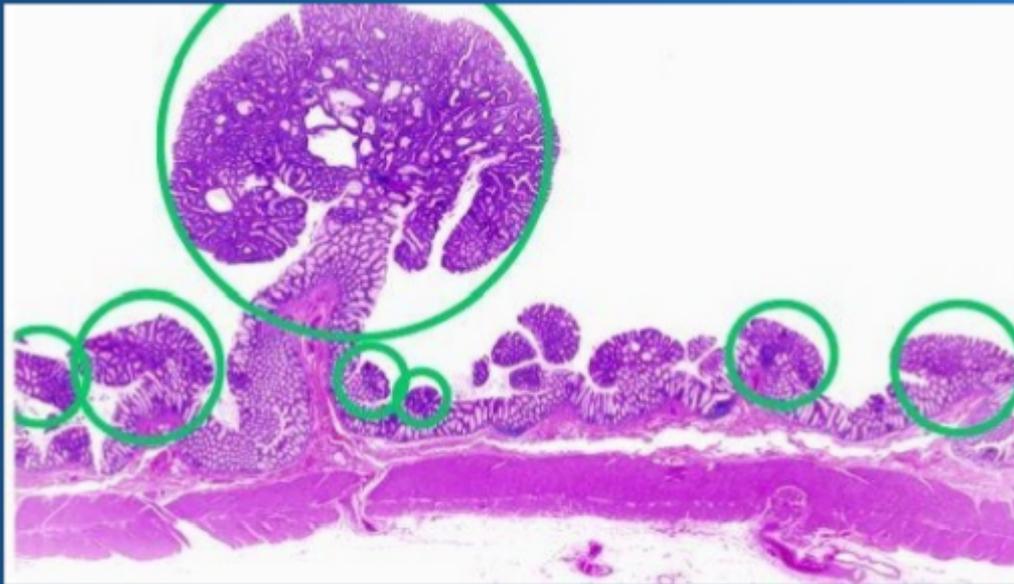
Il gene subisce un processo di splicing dell'esone 10 ma a causa di varianti nelle regioni ESE (exon splicing enhancer) e ESS (exon splicing silencer) il rapporto tra 4R-tau e 3R-tau viene alterato, causando la malattia.



Splicing e poliposi adenomatosa familiare (FAP)

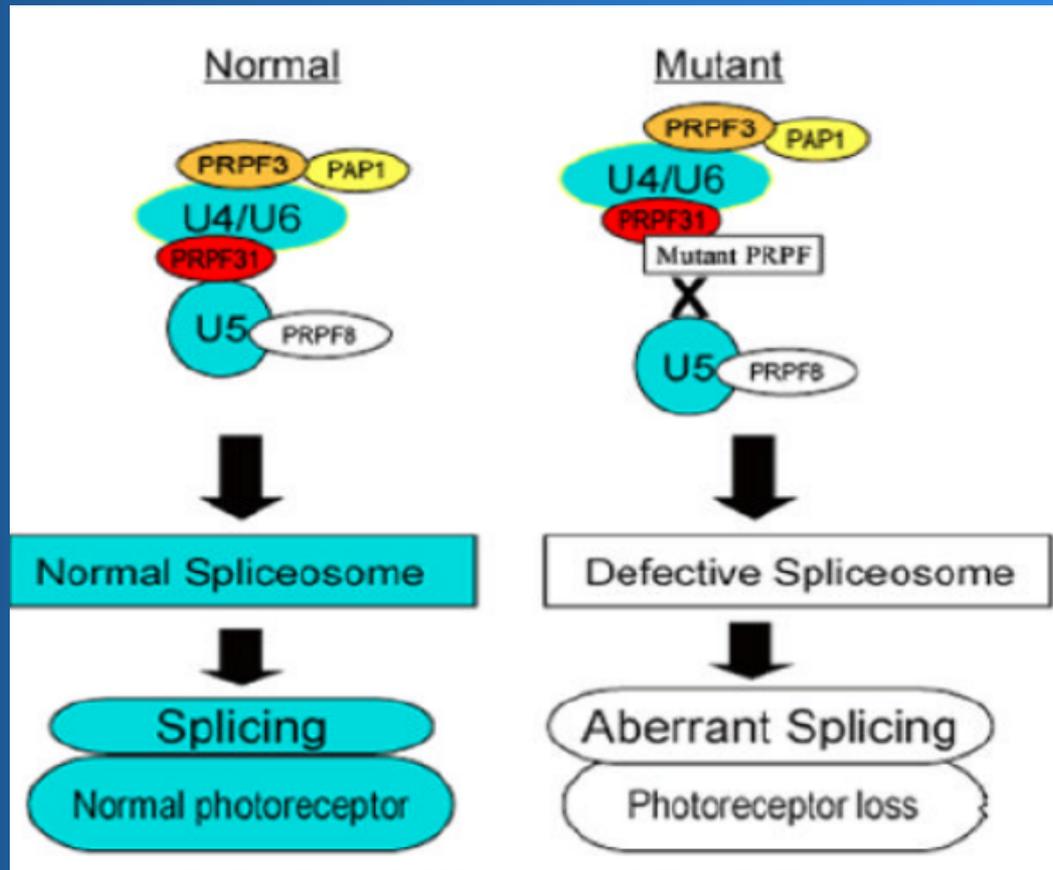
Il gene APC (oncosoppressore, cromosoma 5) quando ereditato in forma patologica determina la formazione di polipi intestinali che degenerano in tumori al colon entro il 40° anno di età.

Nel gene, di oltre **100 kb** e **156 esoni**, sono noti molti polimorfismi ma 2 mutazioni impattano sul processo di splicing, provocando exon skipping e in conclusione delle forme proteiche tronche.



Splicing e retinite pigmentosa

Questa malattia ereditaria causa cecità e può essere dovuta ad un difetto di assemblaggio della componente **U5 snRNP** dello spliceosoma (quindi una **mutazione in trans**). Non ha effetti su altri tessuti ma l'alto turnover della rodopsina impatta la retina in modo più rilevante.



Editing dell'RNA

Processo post-trascrizionale usato per modificare l'informazione genetica e generare molecole di RNA diverse dal loro stampo in una o più posizioni.

Meccanismi:

- ✓ conversione di base
- ✓ inserzioni / delezioni

Effetti:

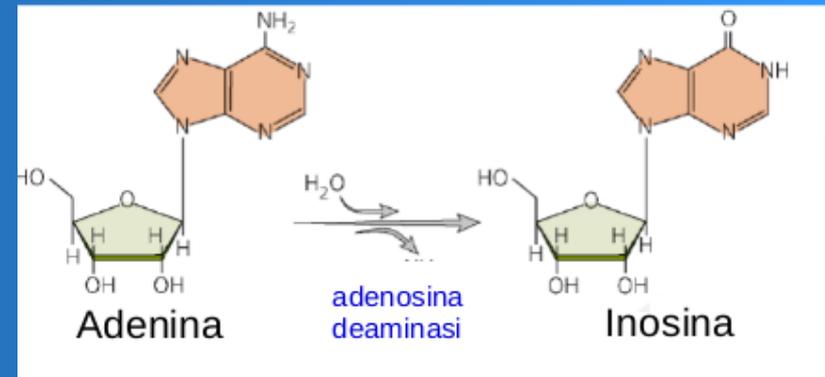
- ✓ sostituzioni amonoacifiche
- ✓ creazione/eliminazioni condoni di stop/inizio
- ✓ creazione di ORF intere.

Editing per conversione di basi

Enzimi per l'editing dell'RNA:

Adenosina deaminasi ADA (A ---> I)

Molto frequente (>1600 geni), ADAR lavora su RNA a doppio filamento

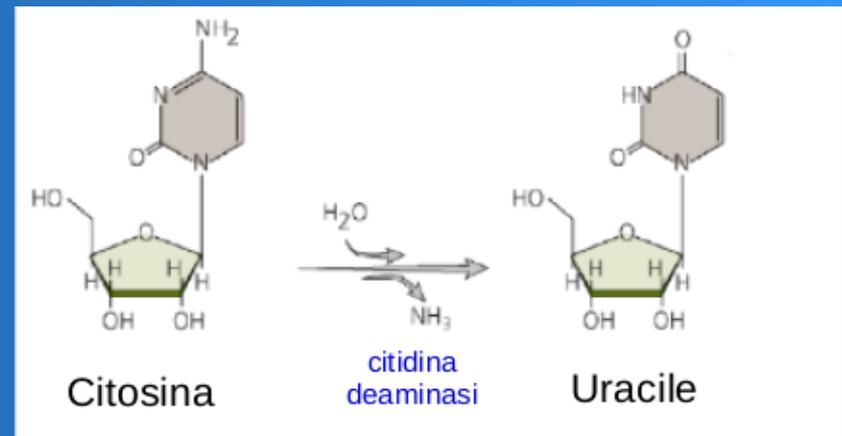


Talvolta cambia un amino acido, più spesso è in regioni non codificanti.

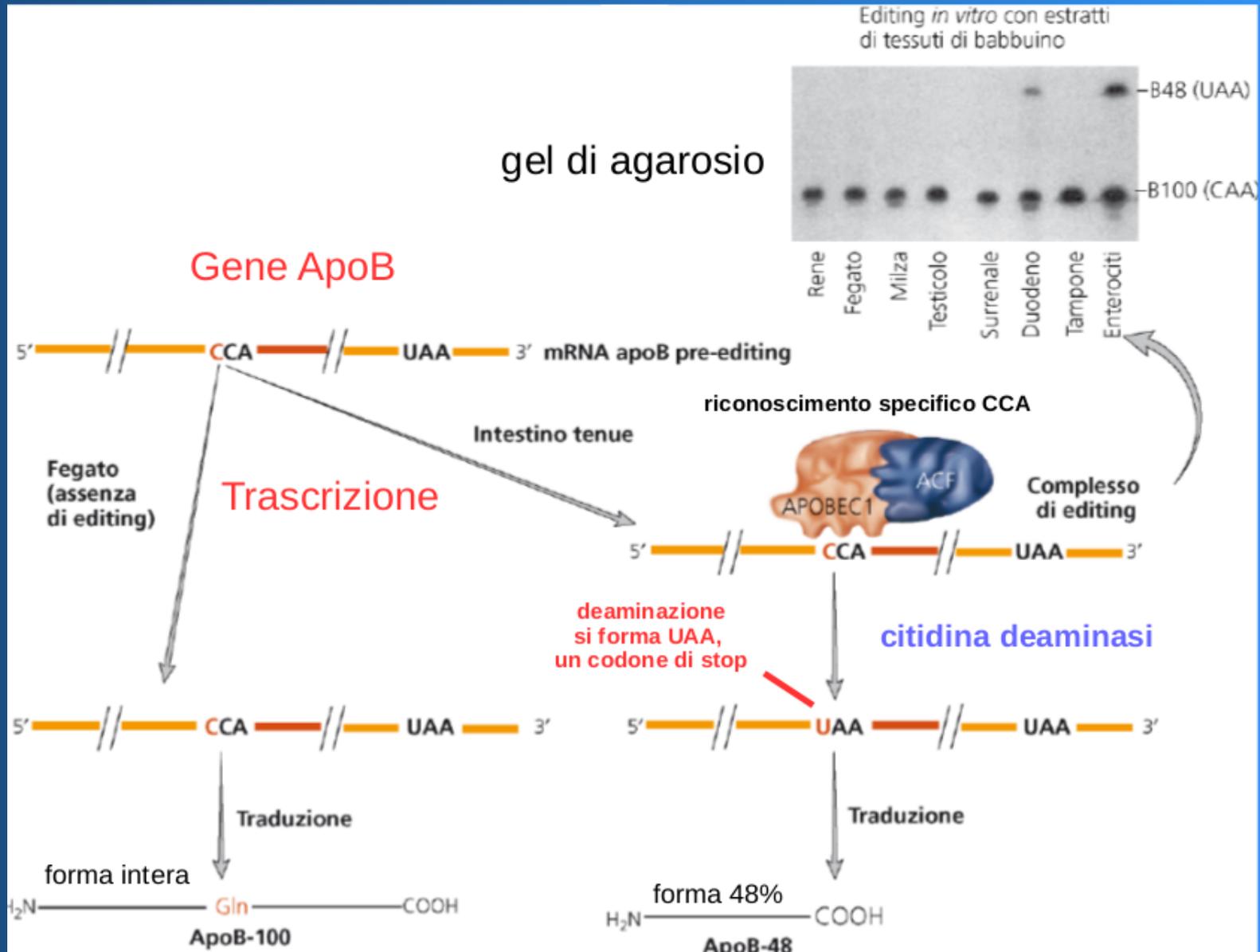
In genere gli elementi Alu (tratti ripetitivi di DNA AGCT dei primati) si trovano in regioni non tradotte

Citidina deaminasi CDA (C ---> U)

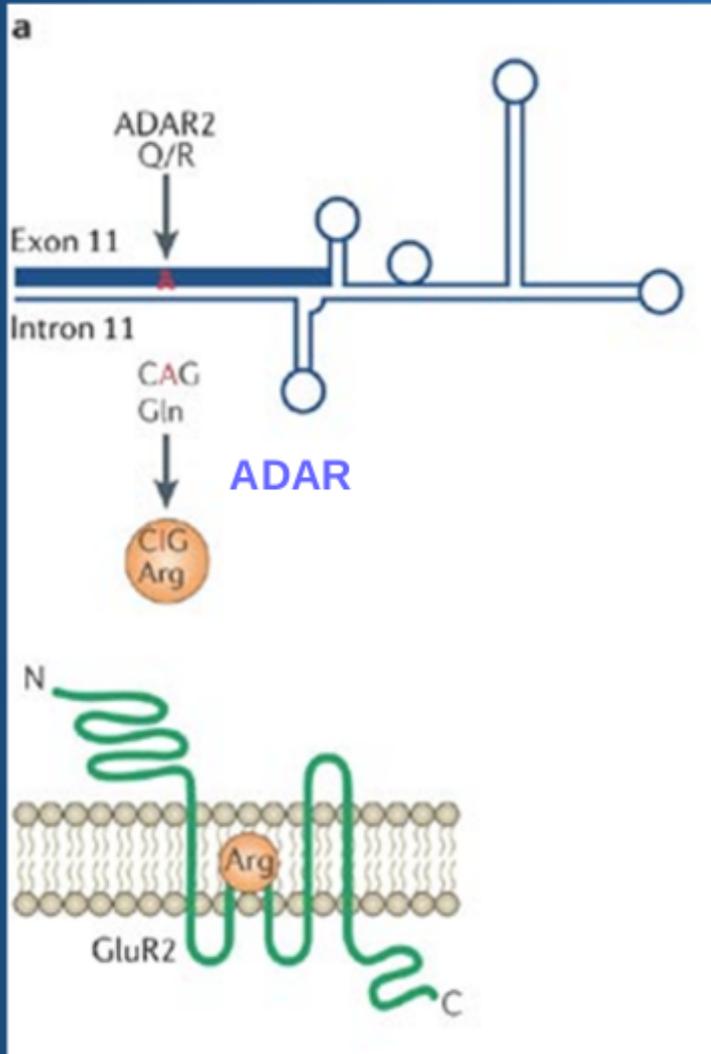
Poco frequente



Editing per il controllo della apolipoproteina B

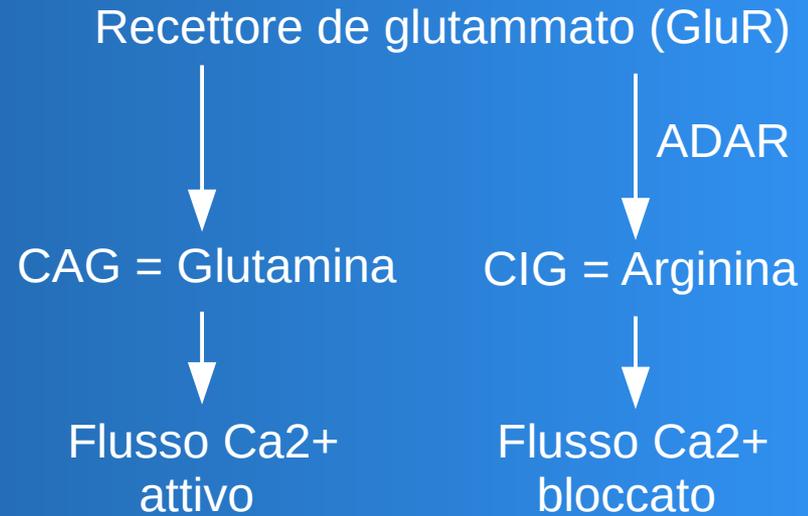


Editing del mRNA nel cervello umano



ADAR: Adenosina Deaminasi RNA specifica

L'editing da parte di ADAR A > I è importante ed abbondante nei tessuti cerebrali umani.



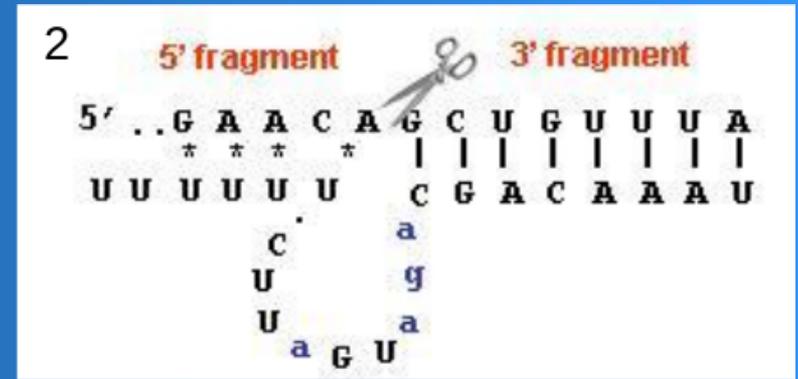
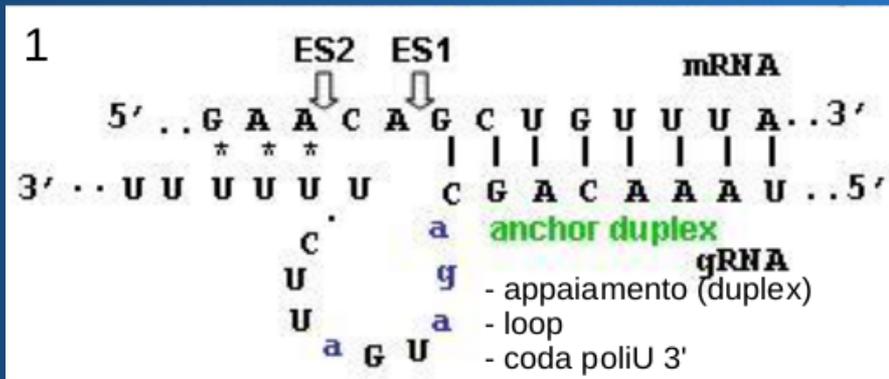
Difetti di editing creano disordini neurologici come epilessia, depressione, sclerosi laterale amiotrofica (**SLA**)

Editing per inserzione di basi U

Scoperto nei mitocondri dei tripanosomi, ha la funzione di inserire singoli nucleotidi in sequenze codificanti, modificando il frame di lettura. Si basa su piccoli stretch di RNA chiamati **guida** (gRNA)

Il gRNA si appaia con l'mRNA a valle di ES1 (chaperoni?)

Una endonucleasi taglia il filamento originale sul punto di mismatch



Una uridil trasferasi terminale riempie il gap

Una ligasi sigilla il filamento modificato

