

Corso di
**Metodologie diagnostiche di
Biochimica e di Biologia molecolare**
modulo di Biologia molecolare

A.A. 2012/2013

Michela A. Denti
denti@science.unitn.it

Modificazione, esporto e degradazione
dell'RNA

Lezione 7

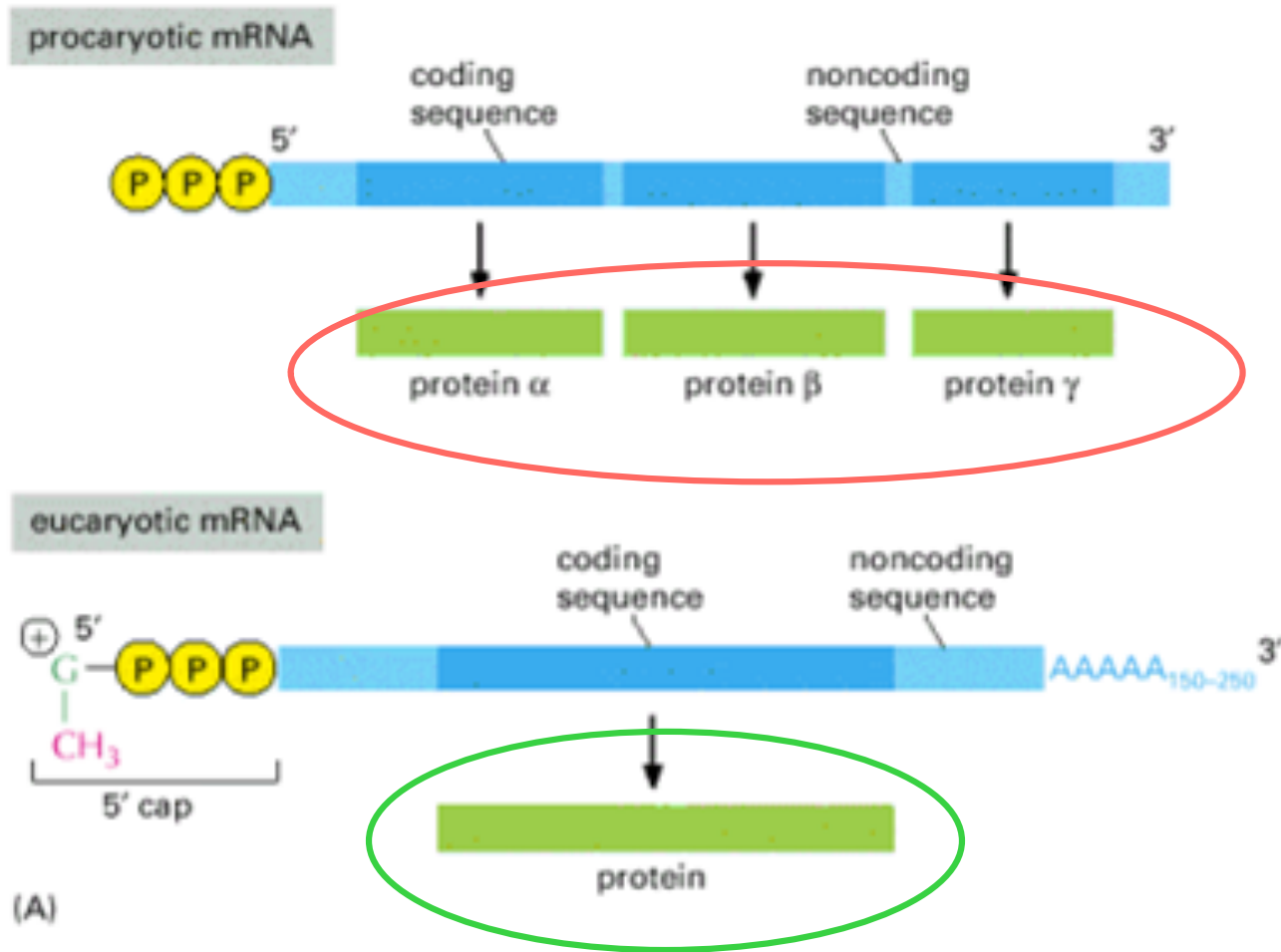
(24 ottobre 2012)

- Lo splicing dell'RNA.
- L'editing dell'RNA.
- Il trasporto dell'RNA.
- La degradazione dell'RNA

Allison cap. 13, 14

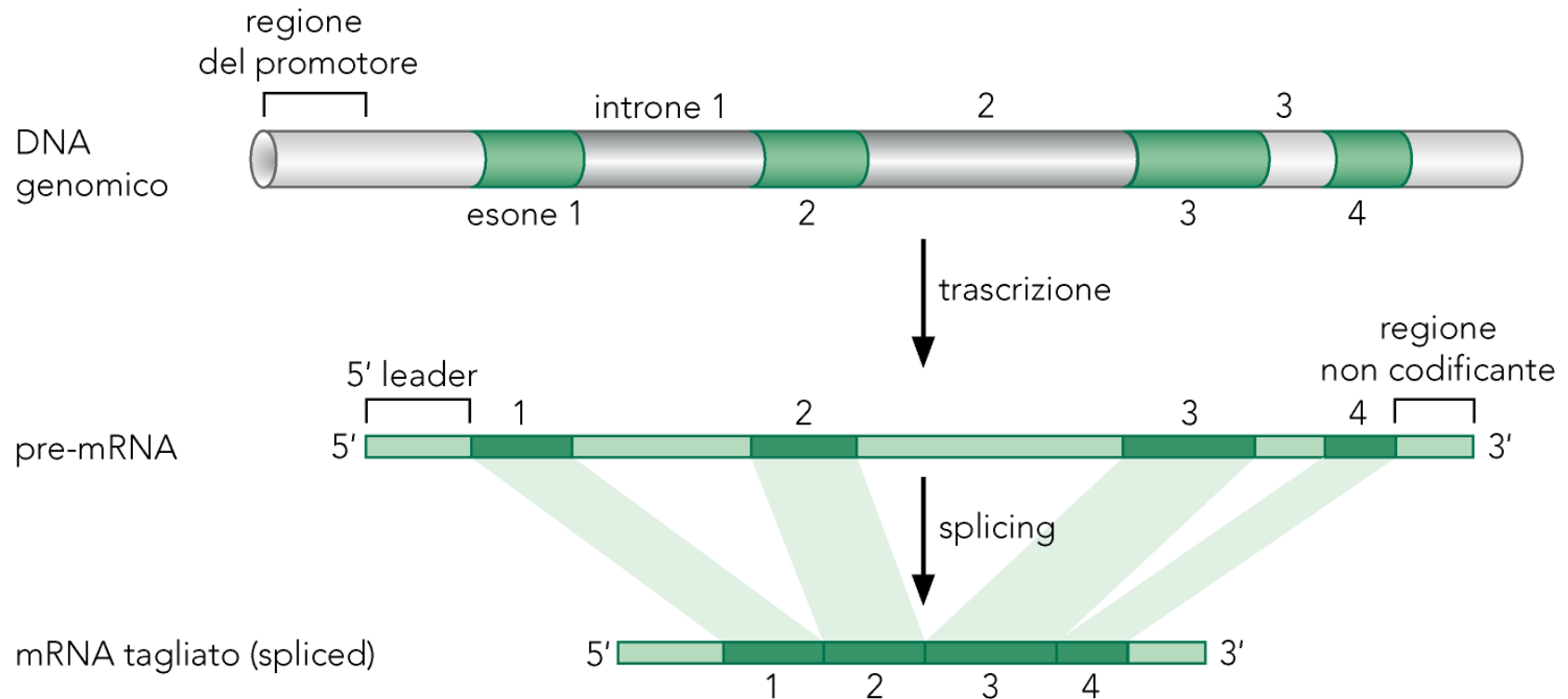
Alberts cap. 6

Watson cap. 13, 14



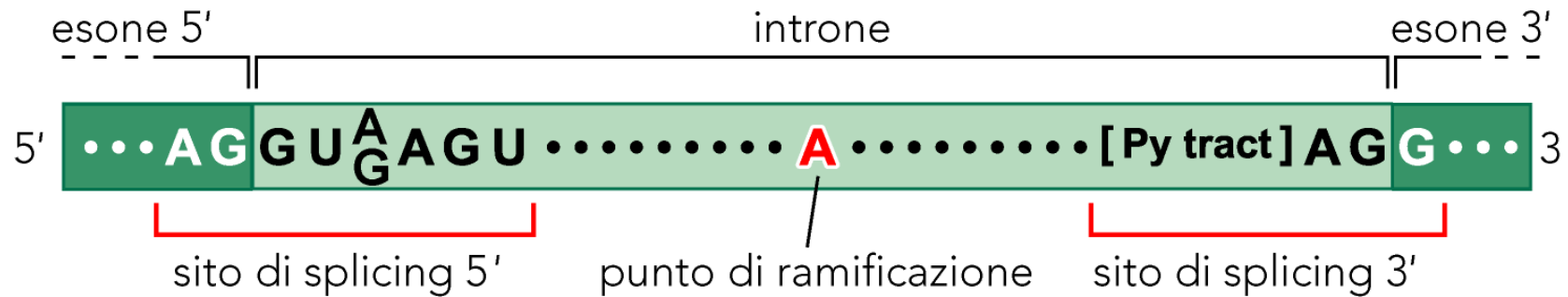
Confronto tra le strutture delle molecole di mRNA procariotiche ed eucariotiche.

Lo **splicing dell'mRNA** rimuove sequenze introniche dai pre-mRNA appena trascritti



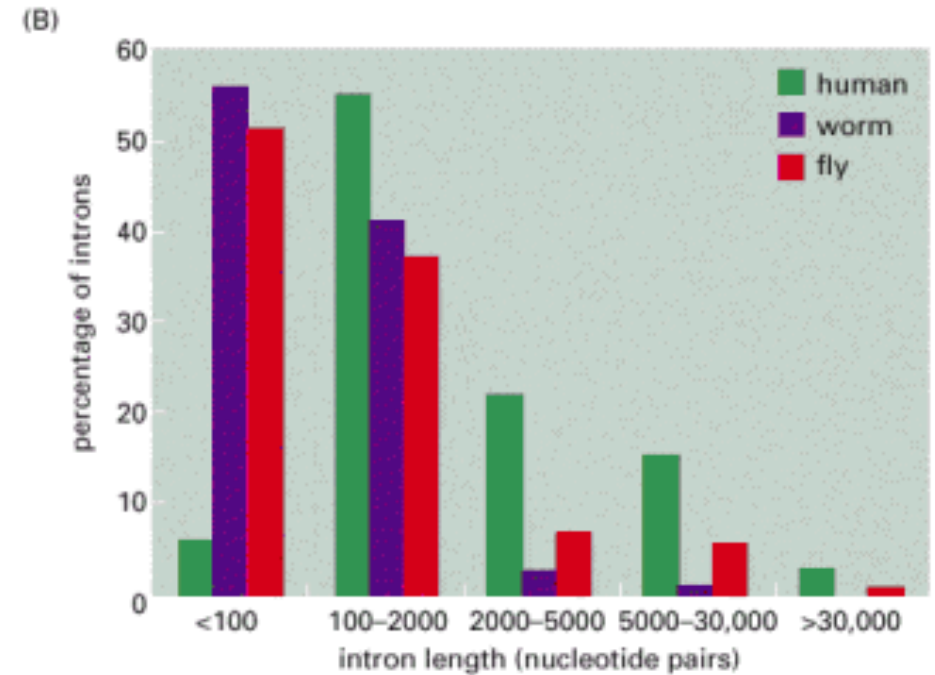
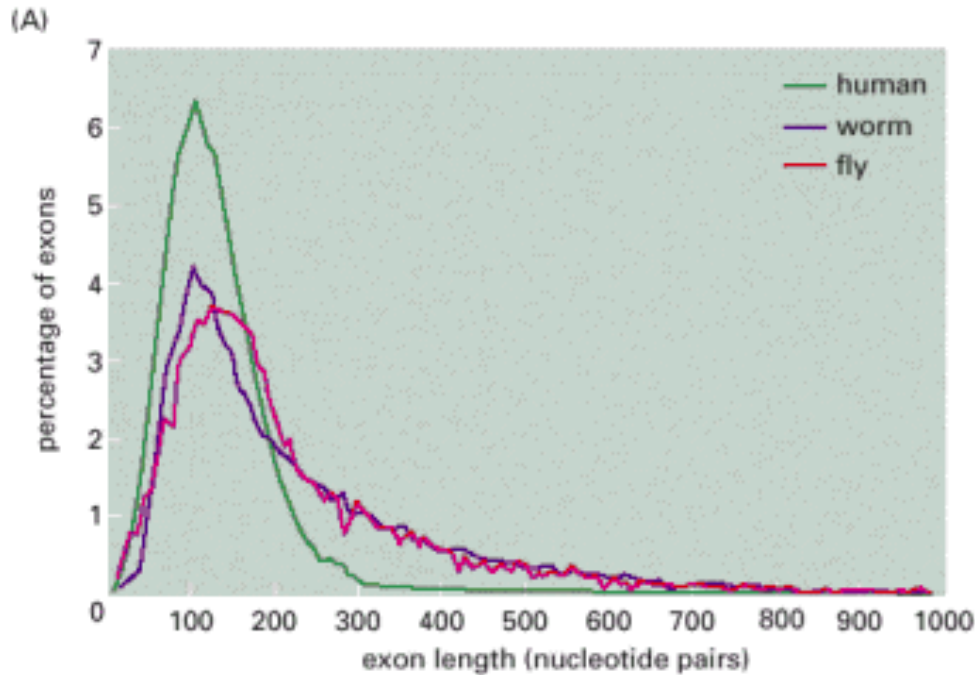
5' UTR, 3'UTR (UnTranslated Region)

Sequenze nucleotidiche segnalano dove deve avvenire lo *splicing*



5' ss; 3' ss : 5' o 3' splice sites

RNA splicing



Variazione nelle lunghezze degli esoni ed introni nei genomi di uomo, verme e mosca.

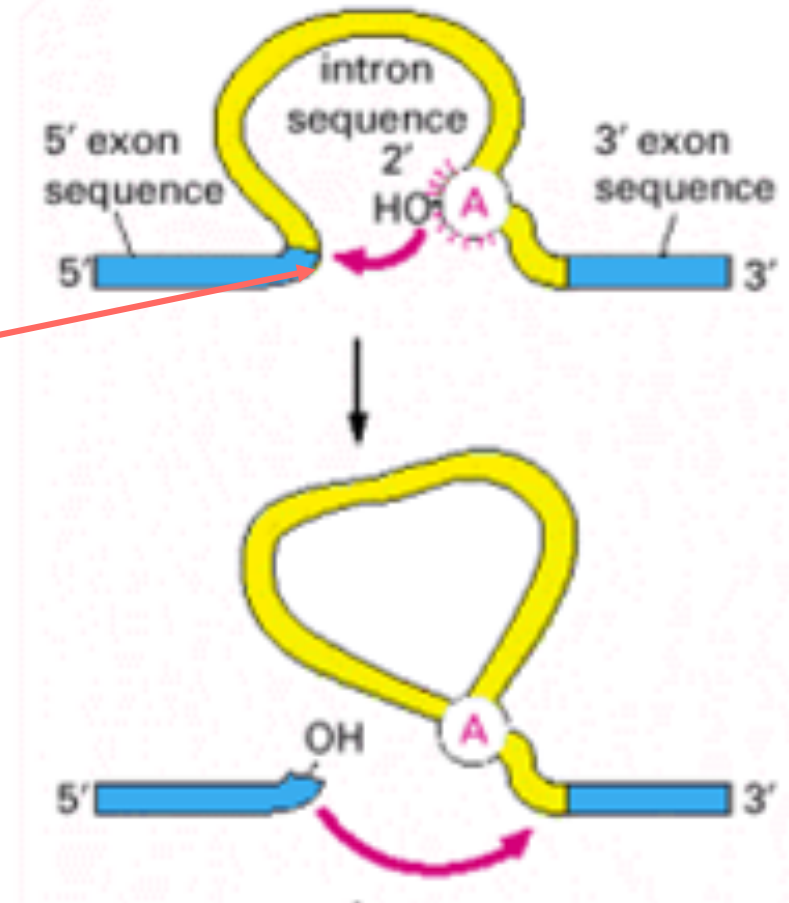
(A) Distribuzione delle dimensioni degli esoni.

(B) Distribuzione delle dimensioni degli introni.

RNA splicing

La reazione di *splicing* del pre-mRNA

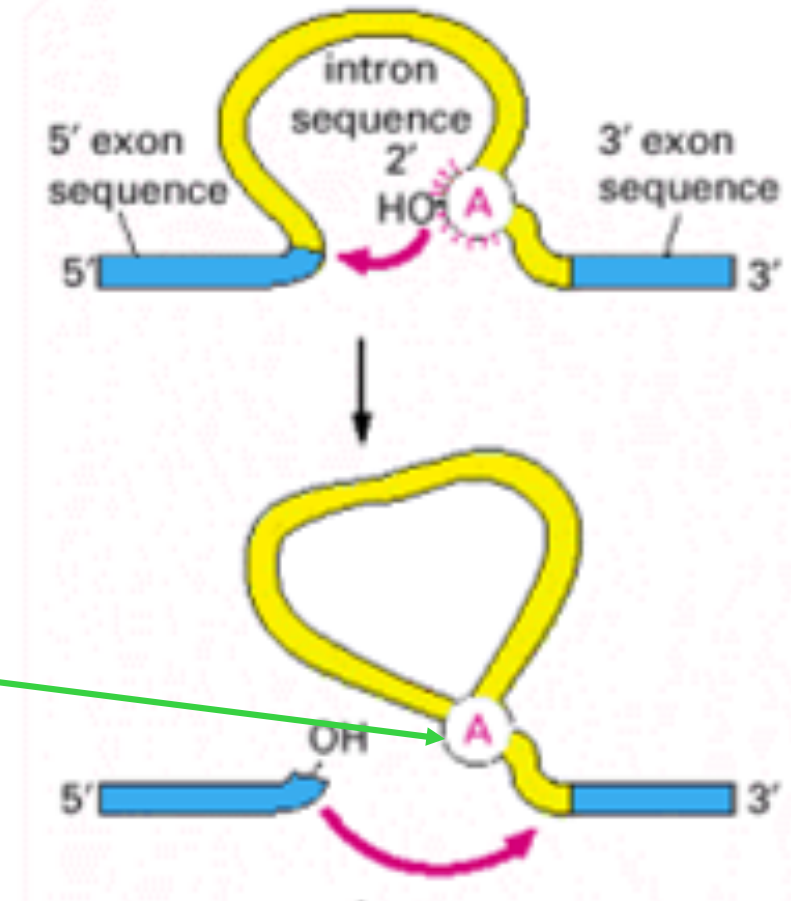
- 1) Un nucleotide adeninico specifico nella sequenza intronica (indicato in rosso) attacca il sito di splicing 5' e taglia l'ossatura di zucchero-fosfato dell'RNA in quel punto.

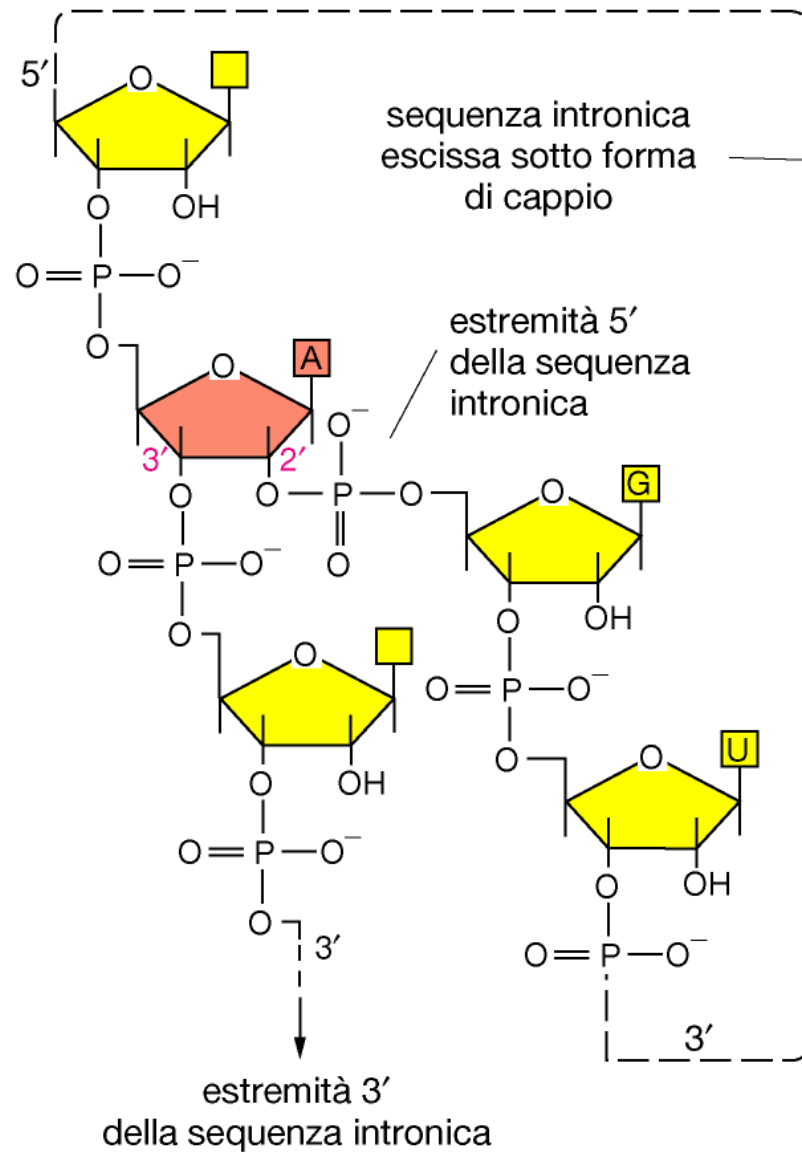


RNA splicing

La reazione di *splicing* del pre-mRNA

- 1) Un nucleotide adeninico specifico nella sequenza intronica (indicato in rosso) attacca il sito di splicing 5' e taglia l'ossatura di zucchero-fosfato dell'RNA in quel punto.
- 2) L'estremità 5' tagliata dell'introne viene unita covalentemente all'adenina, creando così un'ansa nella molecola di RNA

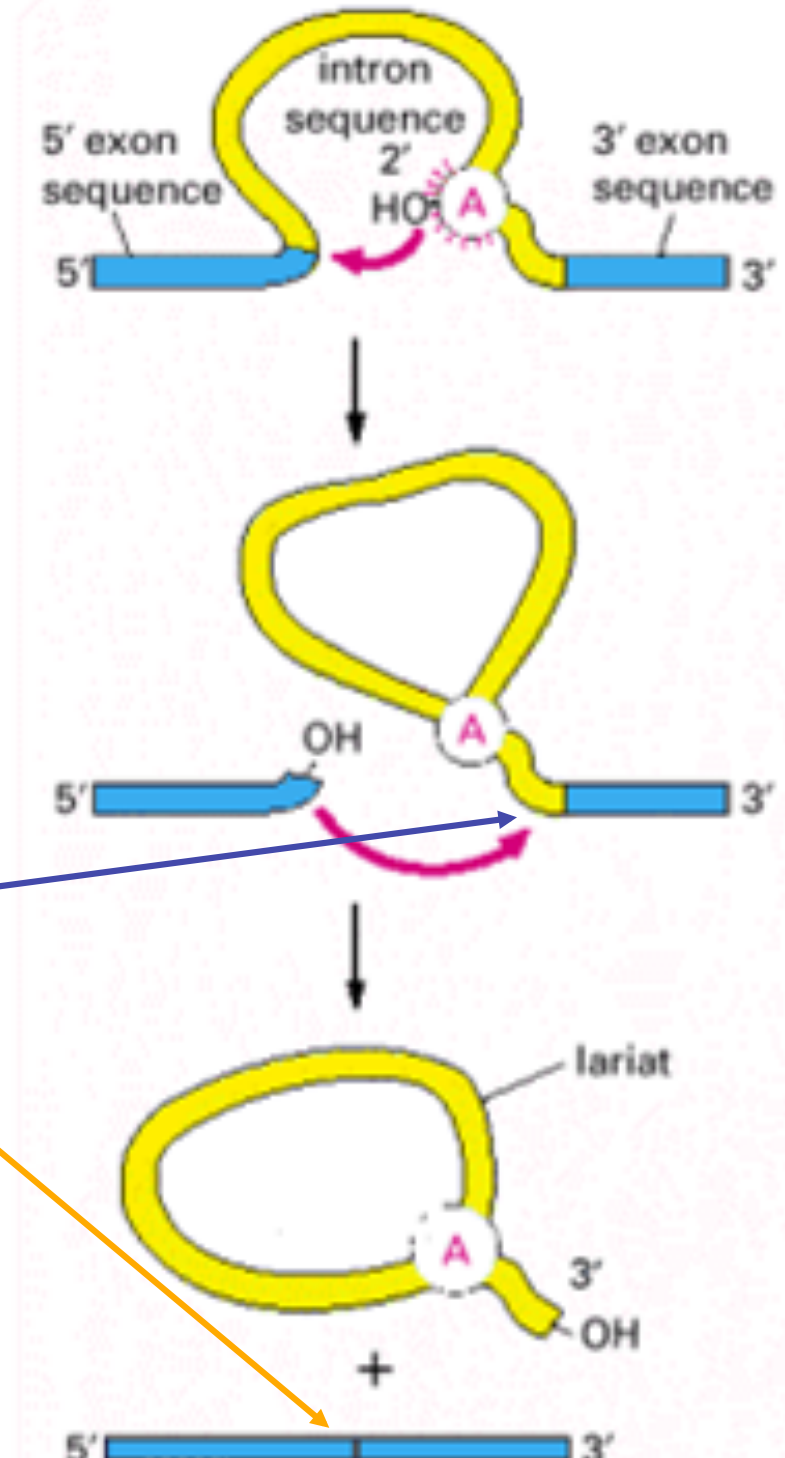




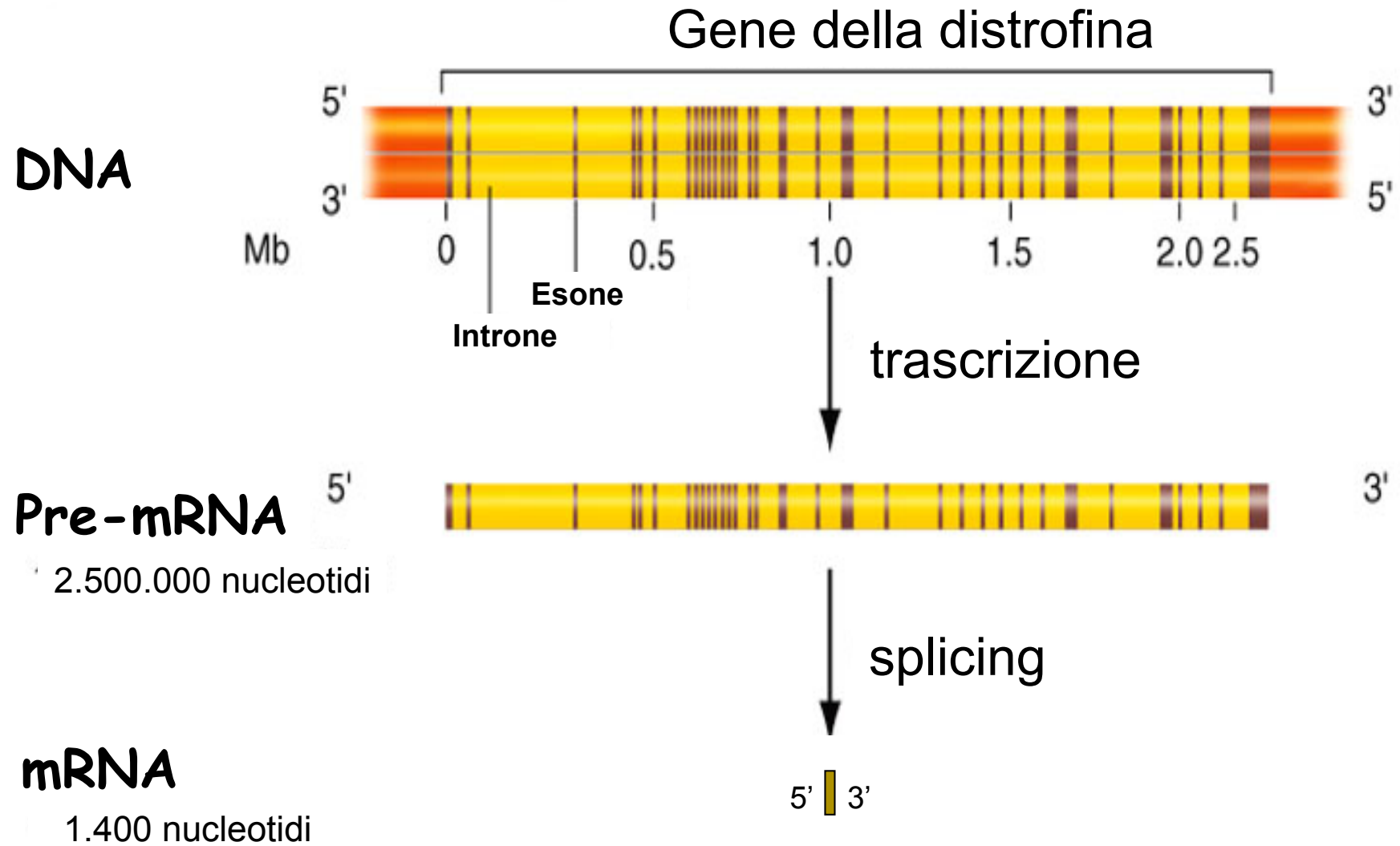
RNA splicing

La reazione di *splicing* del pre-mRNA

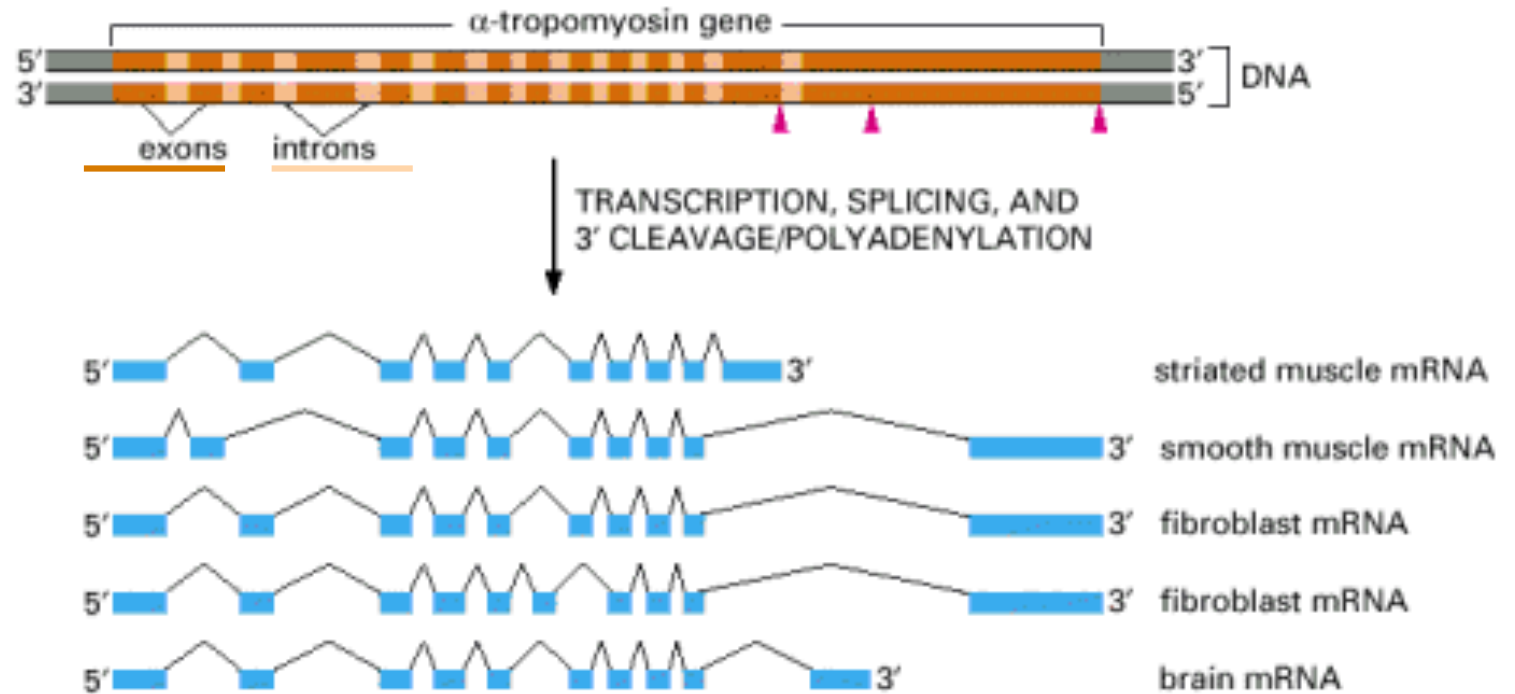
- 1) Un nucleotide adeninico specifico nella sequenza intronica (indicato in rosso) attacca il sito di splicing 5' e taglia l'ossatura di zucchero-fosfato dell'RNA in quel punto.
- 2) L'estremità 5' tagliata dell'introne viene unita covalentemente all'adenina, creando così un'ansa nella molecola di RNA
- 3) L'estremità 3'-OH libera rilasciata dalla sequenza esonica reagisce quindi con l'inizio della successiva sequenza esonica, unendo insieme i due esoni e rilasciando la sequenza intronica sotto forma di cappio. La sequenza intronica rilasciata viene poi degradata



Distrofina



RNA splicing

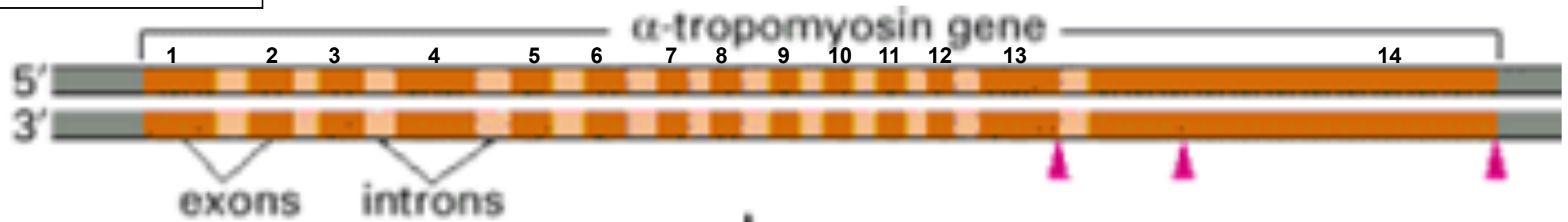


Splicing alternativo del gene della alfa-tropomiosina di ratto.

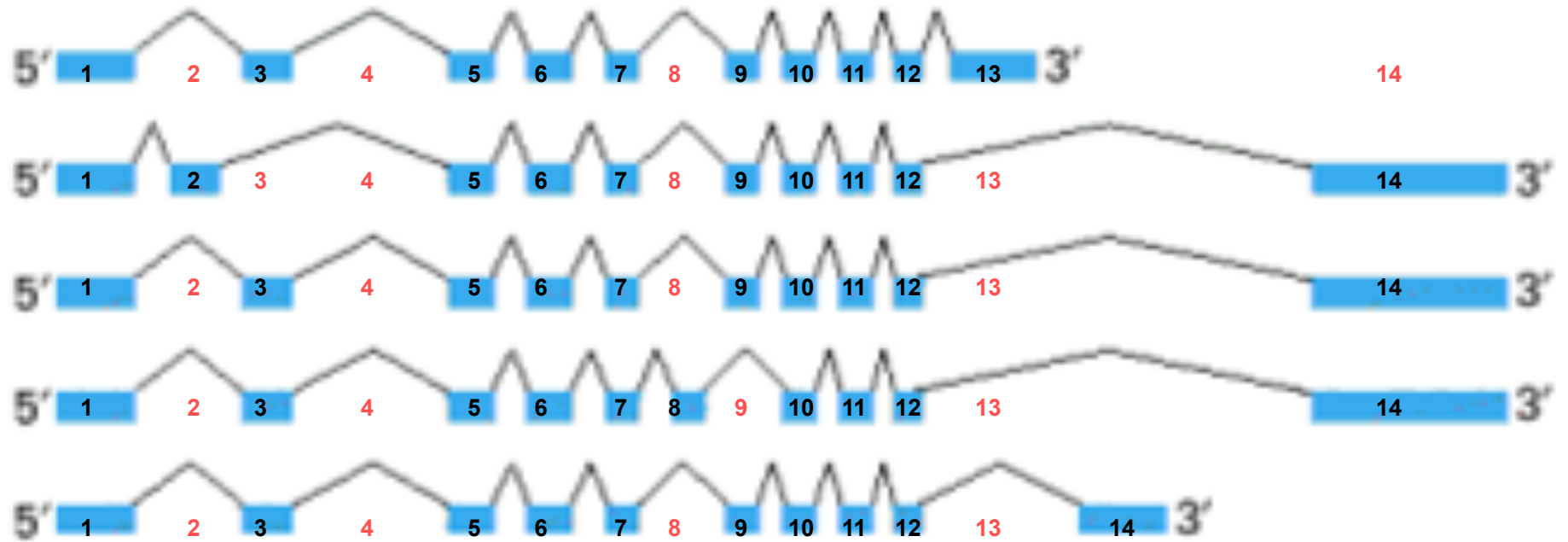
Il trascritto primario può subire splicing in modi diversi, per produrre mRNA distinti, che danno quindi origine a varianti proteiche. Alcuni schemi di splicing sono specifici di certi tipi di cellule. Per esempio la proteina prodotta nel muscolo striato è diversa da quella prodotta dallo stesso gene nel muscolo liscio.

Le frecce rosse indicano i siti in cui il taglio e la poliadenilazione formano le estremità 3' degli mRNA maturi.

RNA splicing

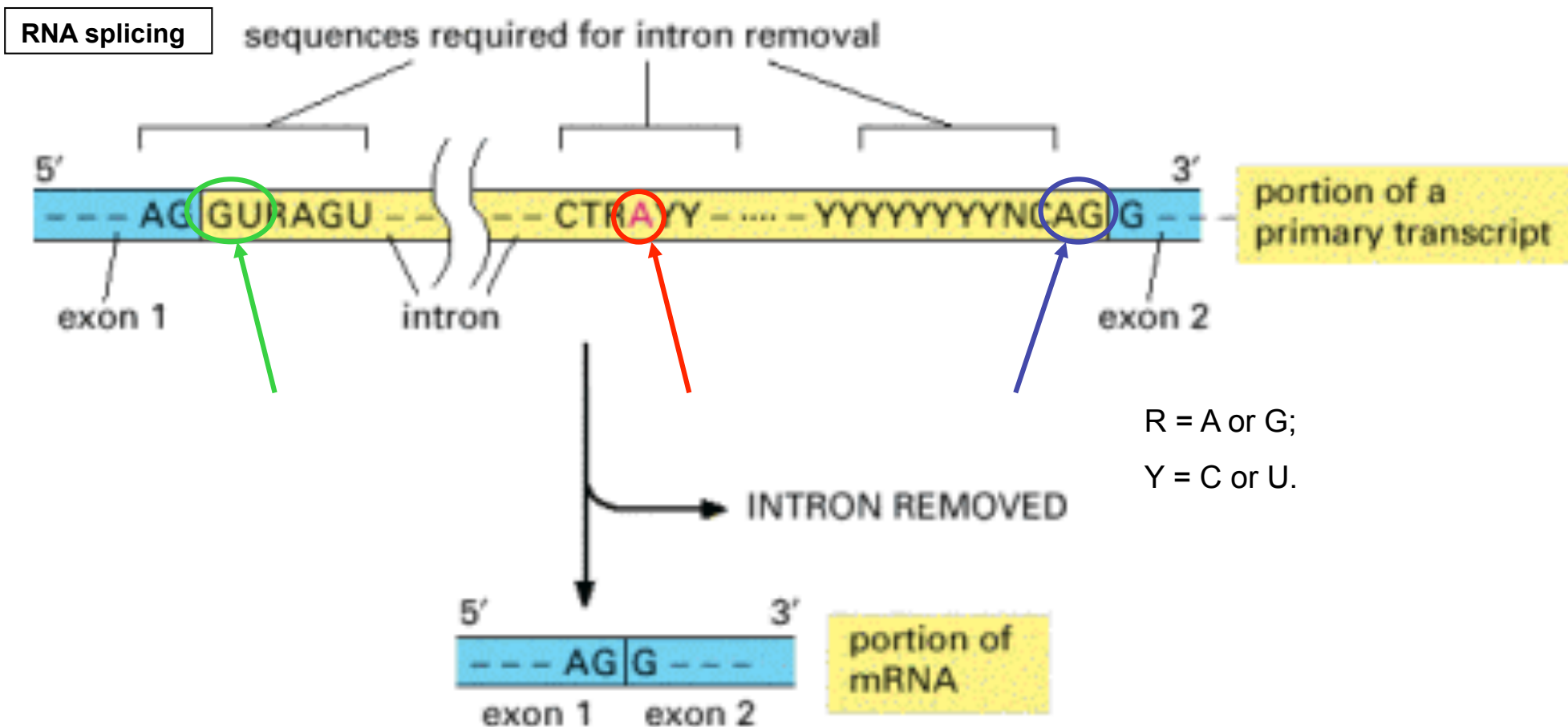


TRANSCRIPTION, SPLICING, AND
3' CLEAVAGE/POLYADENYLATION



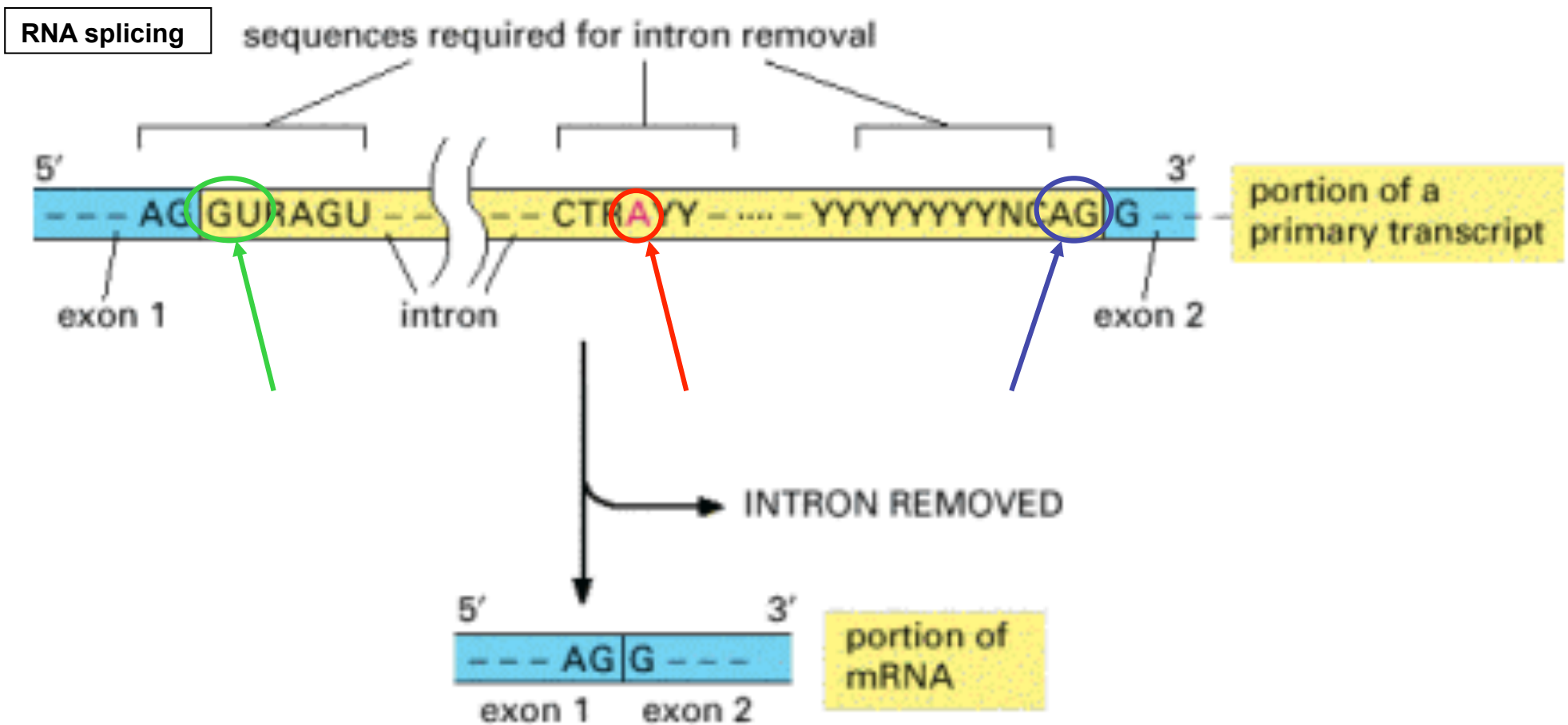
Perché vengono conservati gli introni, che sono apparentemente inutili e dispendiosi?

- Amplificazione del potenziale genetico: splicing alternativo
- Zone “franche” di mutazione (gli introni non sono limitati nella loro evoluzione dalla loro funzione)
- Possibilità di ricombinare diversi esoni di geni diversi (“exon shuffling”), dando origine a geni nuovi (le proteine sono modulari ed i moduli spesso coincidono con gli esoni).



Le sequenze nucleotidiche consenso di una molecola di RNA che segnalano l'inizio e la fine della maggior parte degli introni nell'uomo.

Soltanto i tre blocchi di sequenze nucleotidiche mostrate sono necessari per rimuovere una sequenza intronica. Il resto dell'introne può essere occupato da qualunque nucleotide.



La **A** evidenziata in rosso forma il punto di ramificazione (*branch point*) del cappio prodotto dallo splicing.

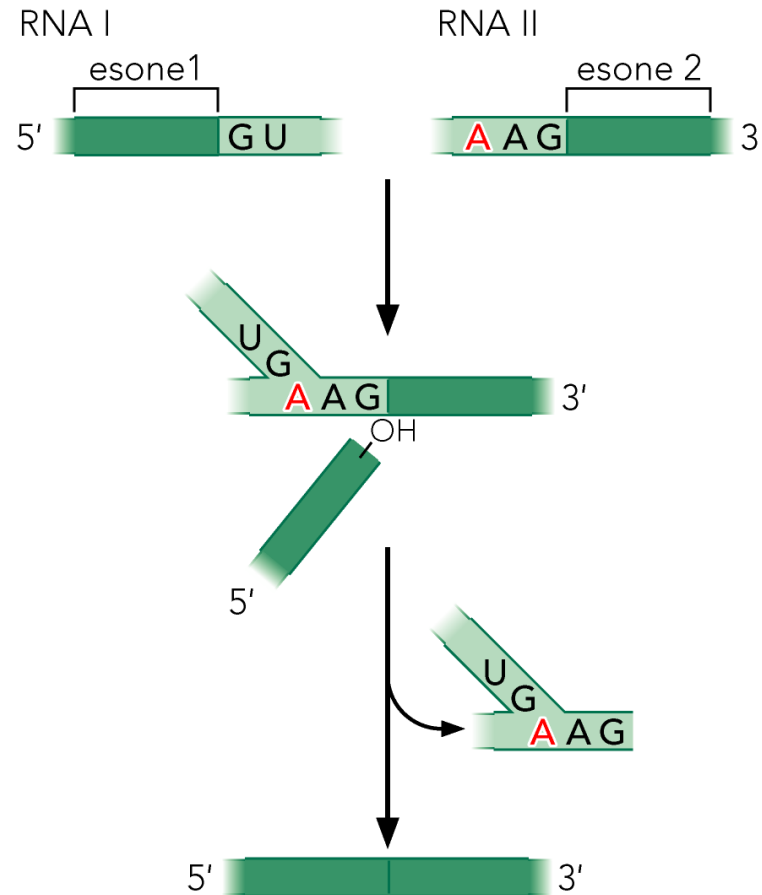
Soltanto **GU** all'inizio dell'introne e **AG** alla fine sono nucleotidi invarianti nelle sequenze consenso di splicing. Le posizioni rimanenti (anche il punto di ramificazione A) possono essere occupate da una larga varietà di nucleotidi, anche se sono preferiti quelli indicati.

Le distanze tra le sequenze consenso sono altamente variabili ma il branch point è più vicino al 3'ss che al 5'ss

Lo splicing in trans

Due esoni che si trovano in due molecole distinte di RNA vengono unite in un singolo mRNA

Sebbene piuttosto raro avviene su quasi tutti gli mRNA dei tripanosomi, e sulla porzione 5' di tutti gli mRNA del nematode *C. elegans*



| TYPE OF RNA | FUNCTION |
|----------------------|--|
| mRNAs | messenger RNAs, code for proteins |
| rRNAs | ribosomal RNAs, form the basic structure of the ribosome and catalyze protein synthesis |
| tRNAs | transfer RNAs, central to protein synthesis as adaptors between mRNA and amino acids |
| snRNAs | small nuclear RNAs, function in a variety of nuclear processes, including the splicing of pre-mRNA |
| snoRNAs | small nucleolar RNAs, used to process and chemically modify rRNAs |
| Other noncoding RNAs | function in diverse cellular processes, including telomere synthesis and the transport of proteins into the ER |

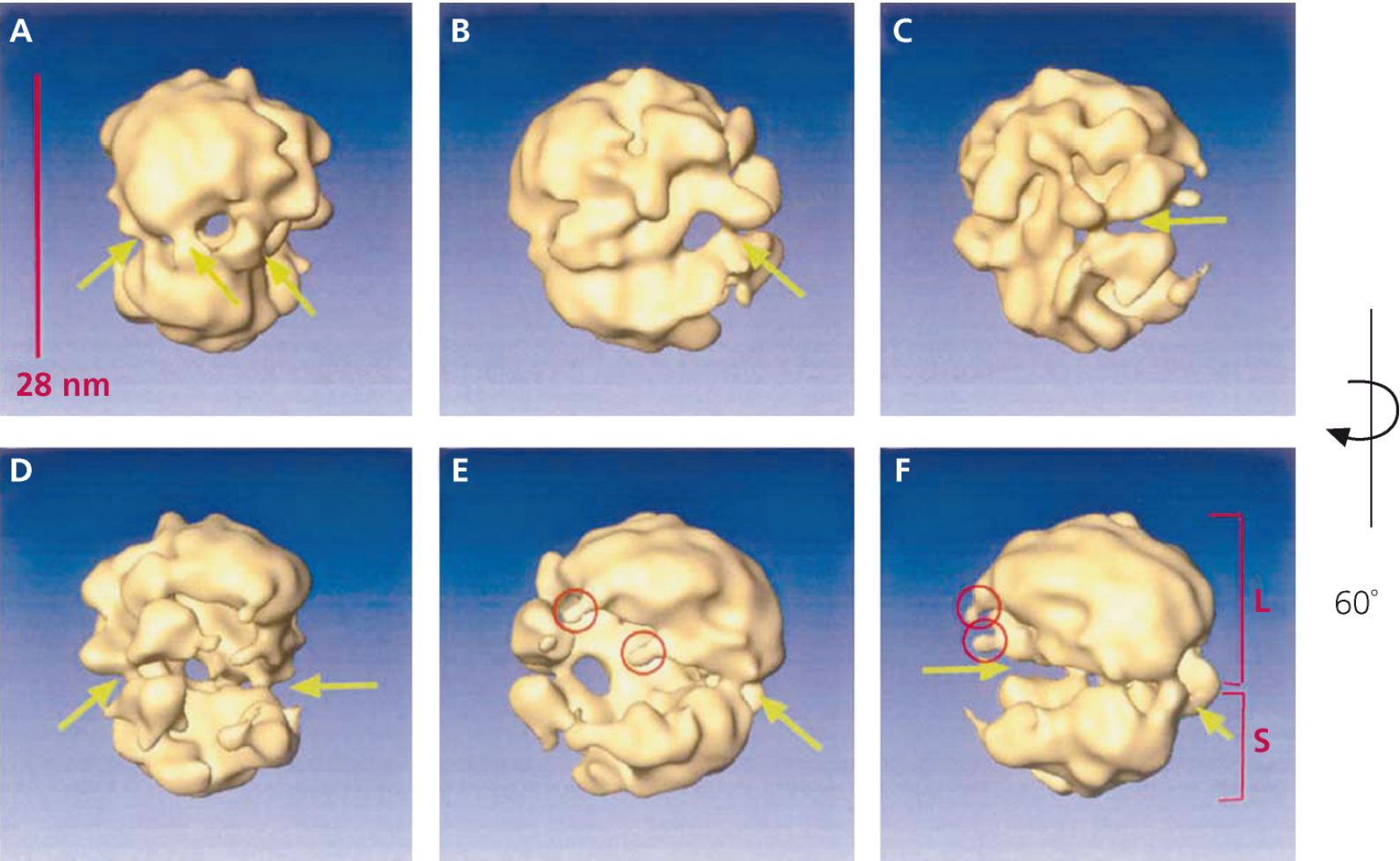
Cinque piccoli RNA nucleari (**snRNA**: small nuclear RNAs) partecipano alla reazione di splicing:

U1, U2, U4, U5, U6

Ciascuno di questi piccoli RNA (lungi 100-300 nt) forma un complesso con diverse proteine.

Questi complessi RNA-proteine sono detti piccole ribonucleoproteine nucleari (**snRNPs**: small nuclear ribonucleoproteins)

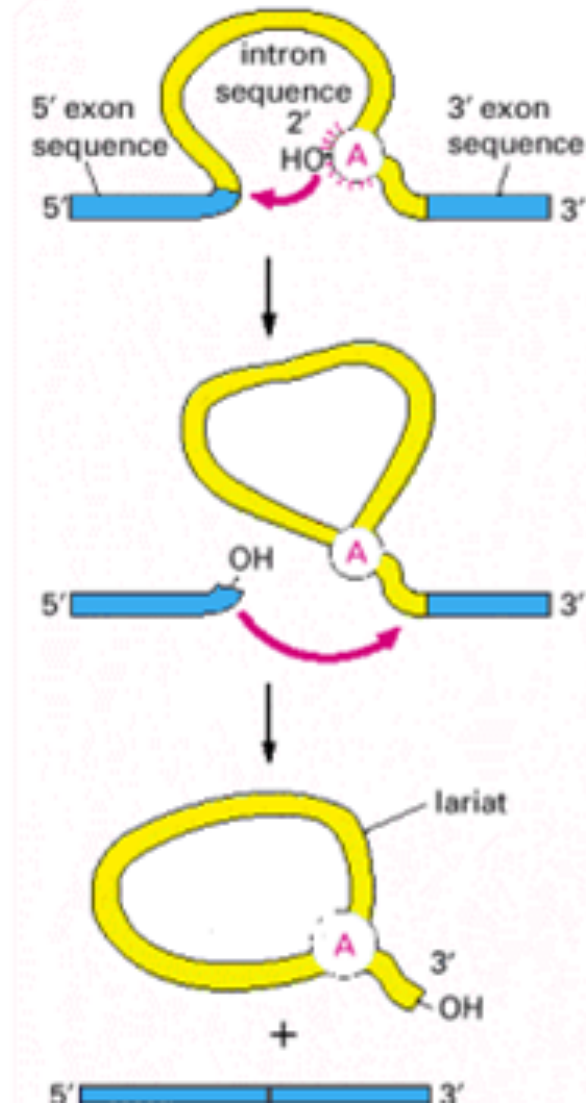
Lo splicing dell'RNA è eseguito da un grande complesso ribonucleoproteico chiamato **spliceosoma**



Lo spliceosoma è costituito da circa 150 proteine e 5 snRNA.

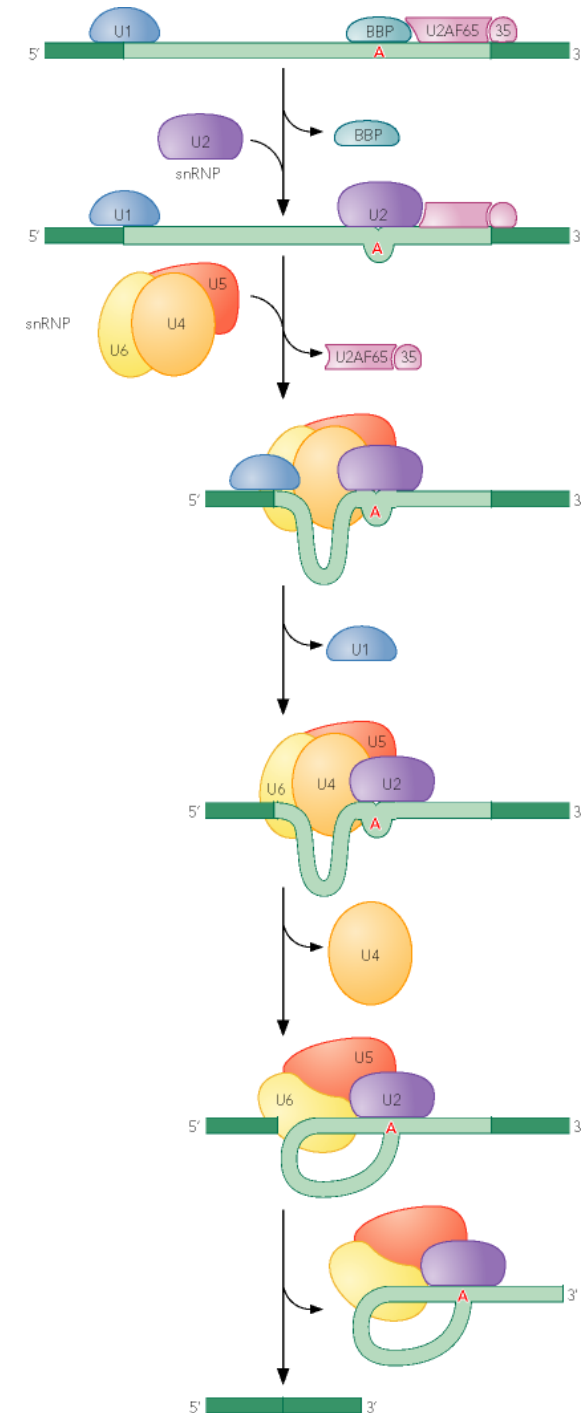
Molte delle funzioni dello spliceosoma sono svolte dai suoi componenti a RNA:

- Riconoscono le sequenze ai confini introne-esone
- Mantengono vicine le estremità degli esoni
- Partecipano alla catalisi della reazione di splicing



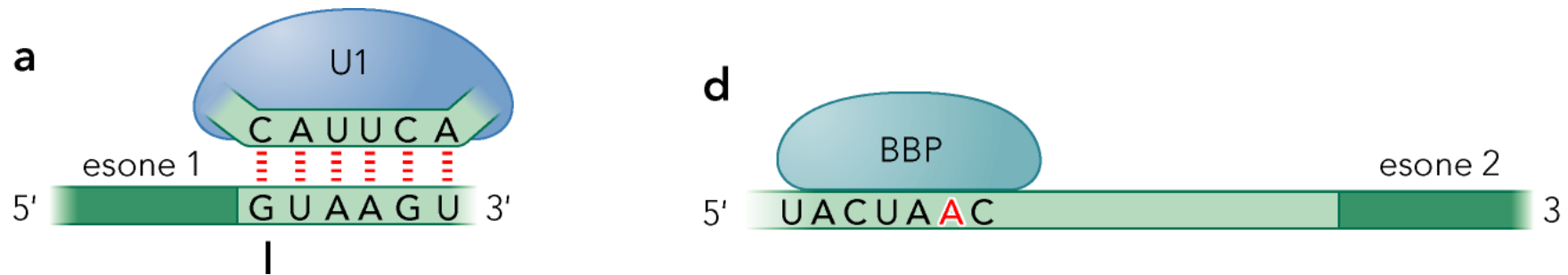
Le fasi della reazione di splicing mediata dallo spliceosoma

Lo spliceosoma ha una composizione diversa nelle varie fasi



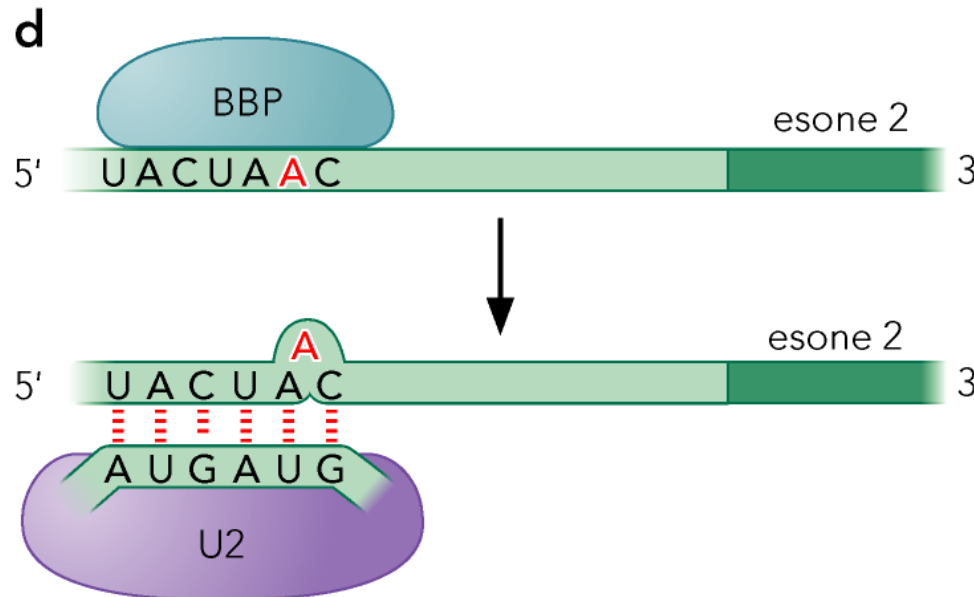
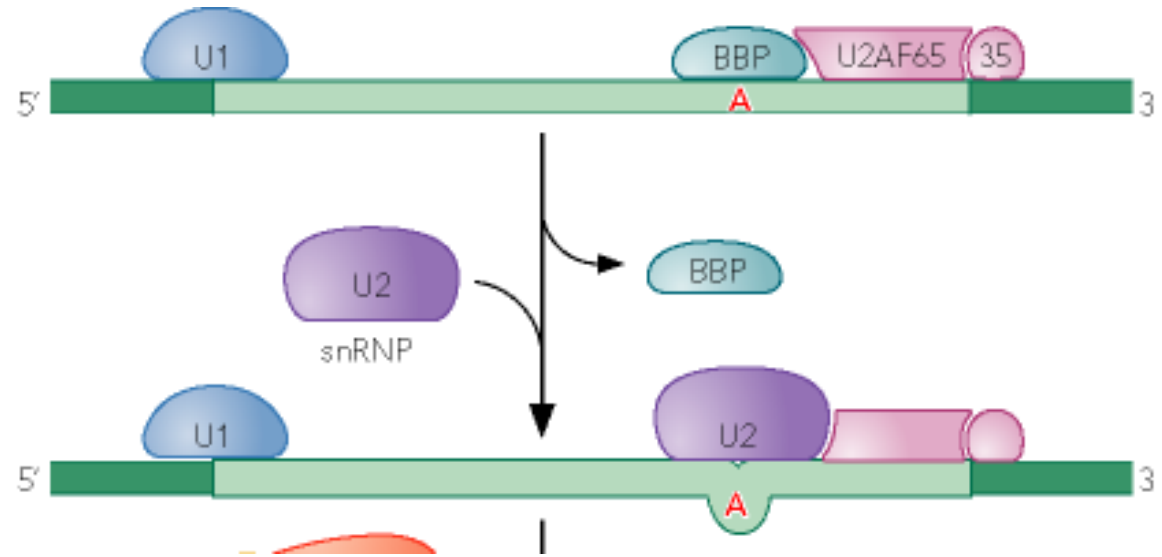


1) Il sito di splicing al 5' viene riconosciuto dalla **snRNP U1** attraverso l'appaiamento di basi del suo snRNA e del pre-mRNA



La **BBP** (proteina che lega il punto di ramificazione, *Branchpoint Binding Protein*) e la proteina **U2AF** (Fattore ausiliario di U2) riconoscono il punto di ramificazione

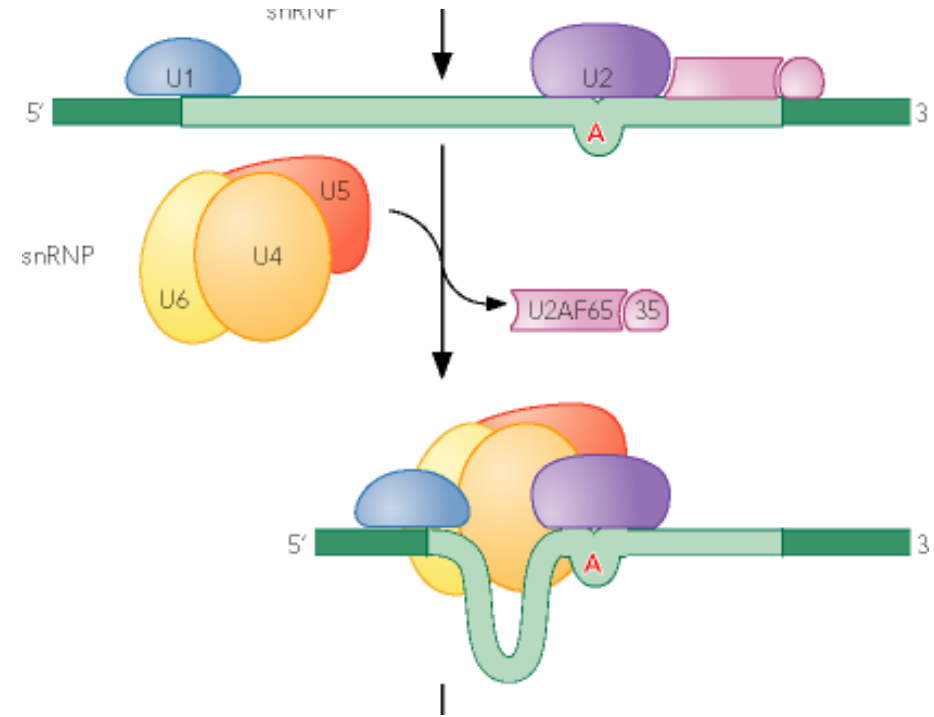
2) La **snRNP U2** si lega al punto di ramificazione con l'aiuto di U2AF, e rimuove BBP



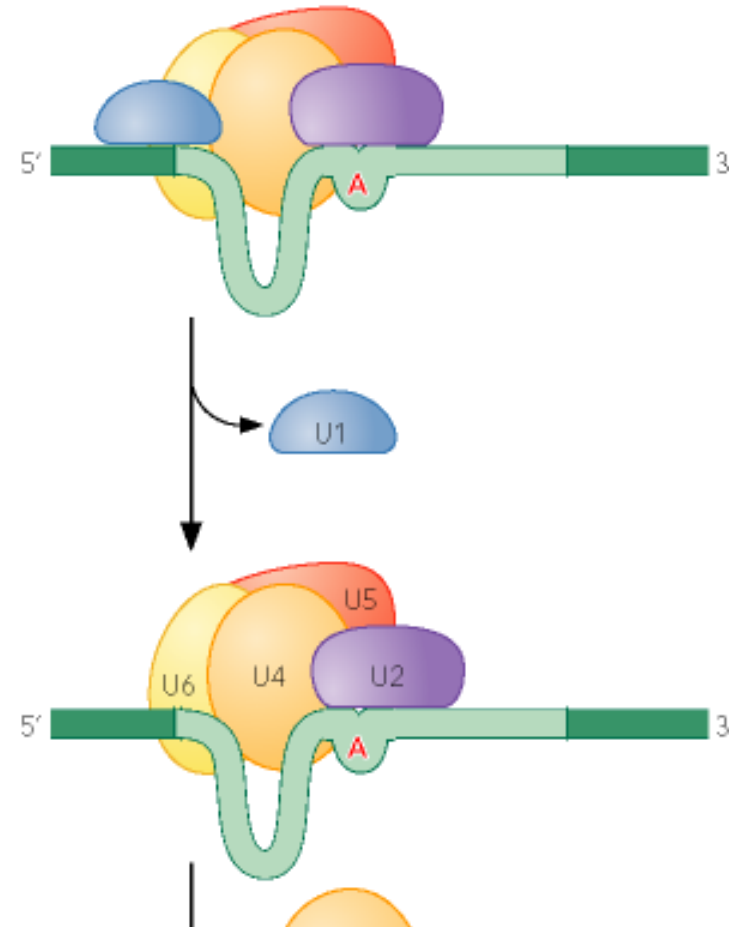
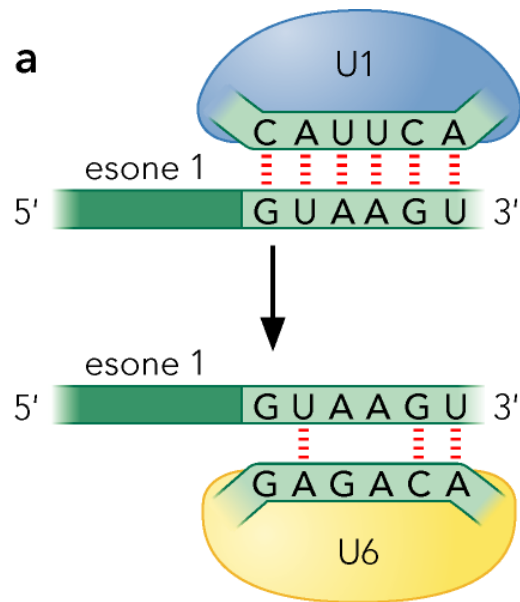
L'appaiamento di basi tra l'snRNA U2 e il punto di ramificazione è tale che il **residuo A** del punto di ramificazione viene spinto fuori dal segmento risultante a doppia elica di RNA e forma una **protuberanza a singolo nucleotide**

3) La “tripla” snRNP U4/U6 U5 entra nella reazione.

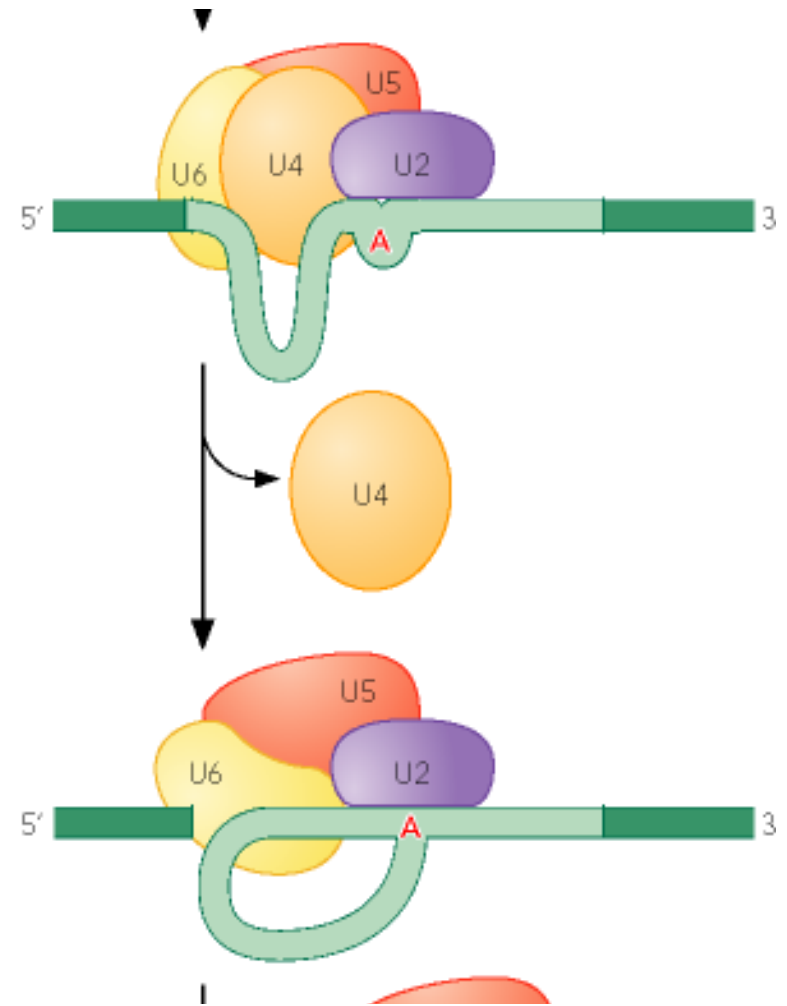
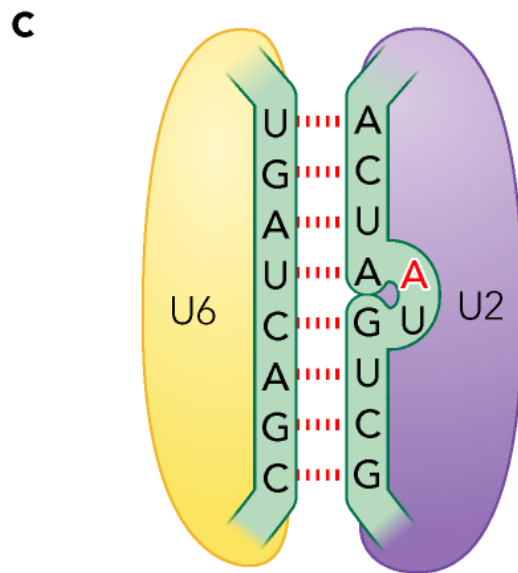
In questa snRNP tripla gli snRNA U4 e U6 sono tenuti saldamente insieme da interazioni di coppie di basi, mentre la snRNP U5 è legata in maniera più lassa da interazioni proteina-proteina.



4) **U1 lascia il complesso e U6 lo rimpiazza al 5' ss**



5) **U4 viene rilasciato** dal complesso permettendo a **U6** di interagire con **U2**

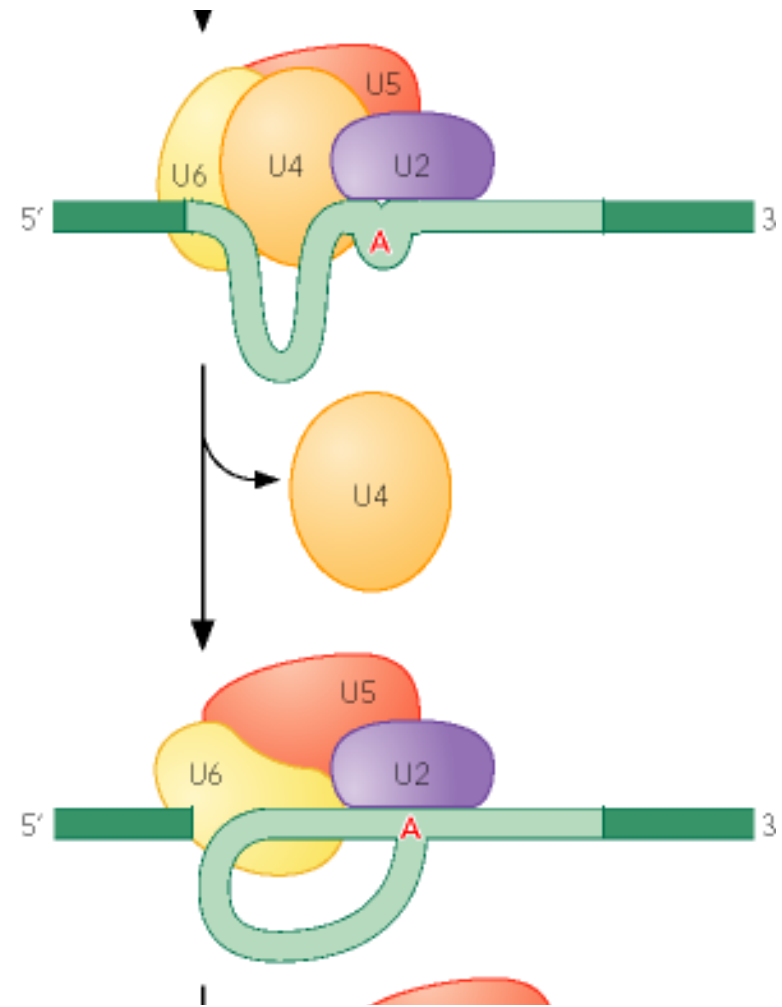


5) **U4 viene rilasciato** dal complesso permettendo a **U6 di interagire con U2**

Il **riarrangiamento** avvicina le porzioni di U6 e U2 che vanno a formare il sito attivo: il riarrangiamento innesca la catalisi

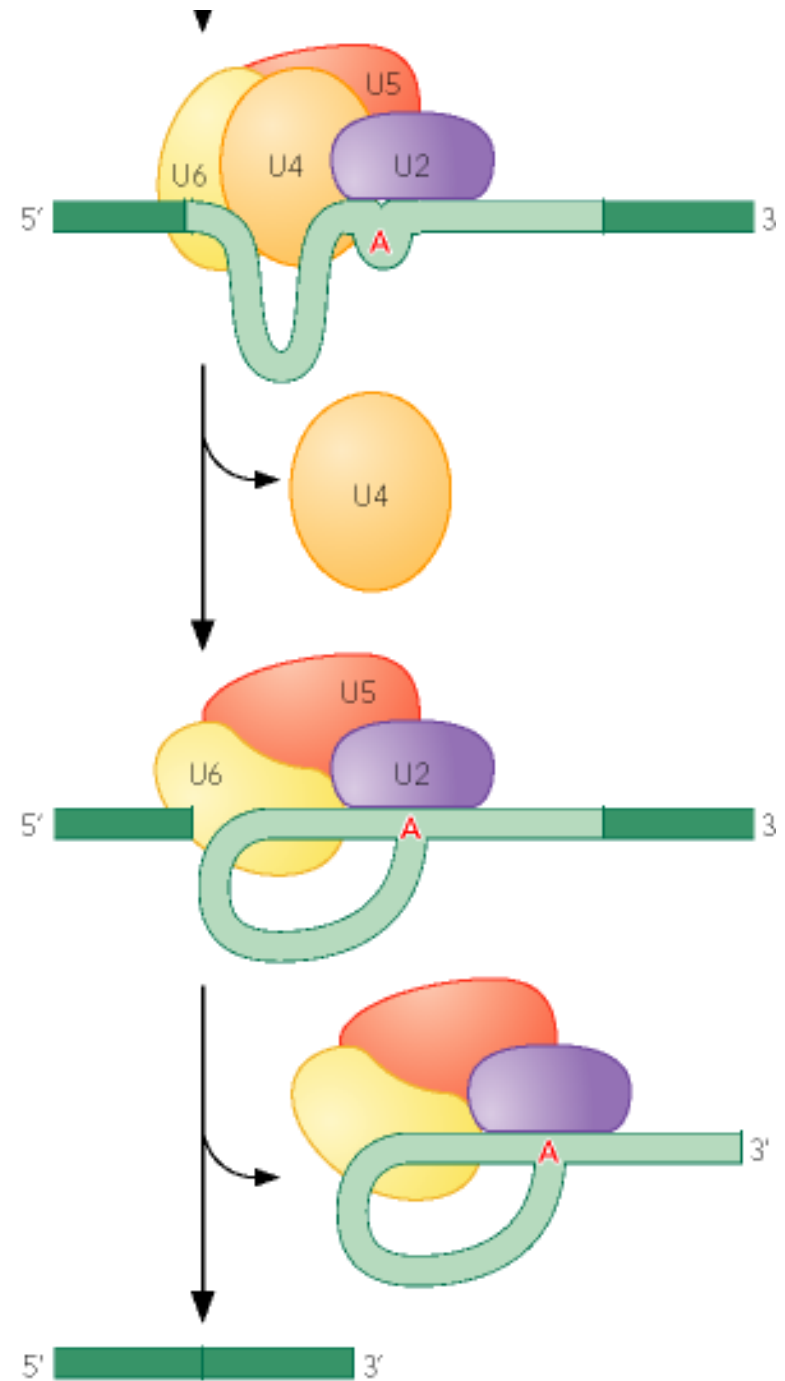
Il riarrangiamento stesso assicura che il substrato sia posizionato in maniera corretta.

La formazione del sito attivo avvicina il sito di splicing al 5' ed il punto di ramificazione, facilitando la prima reazione di transesterificazione.



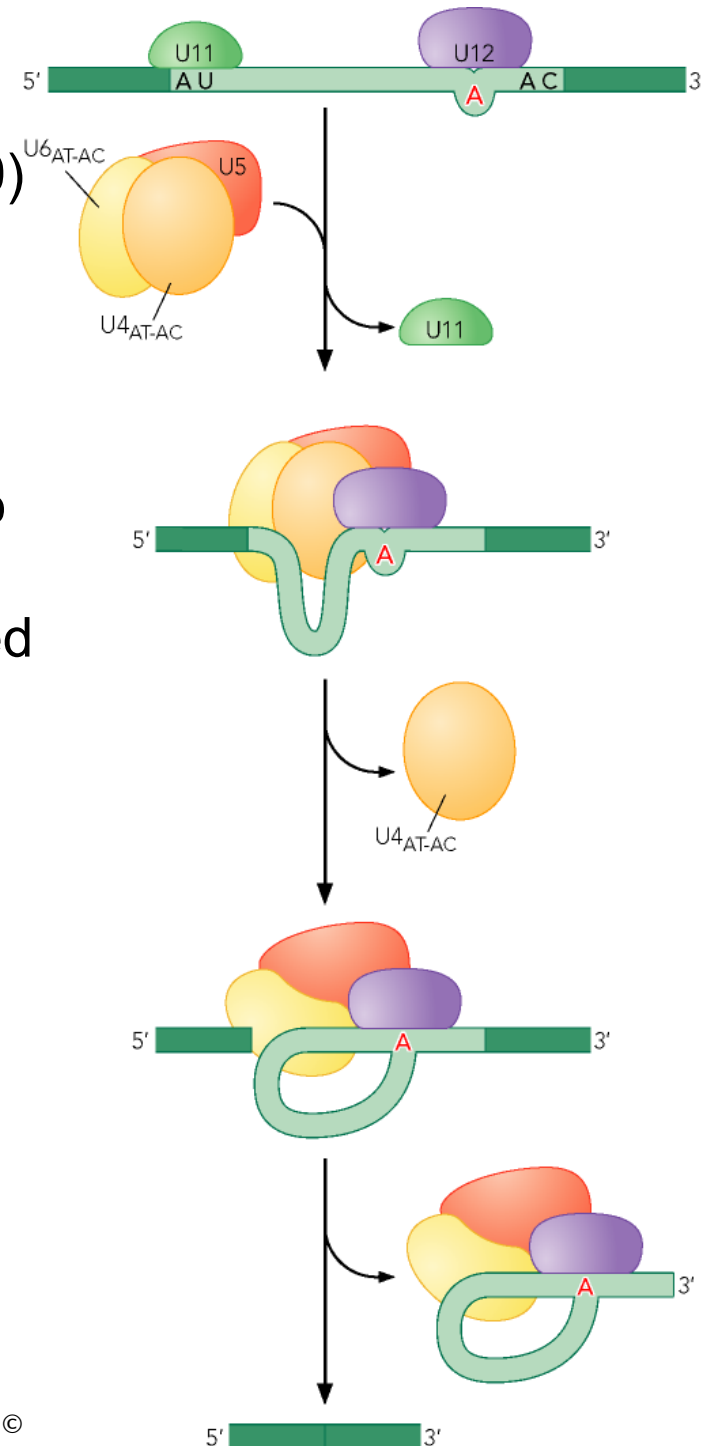
La seconda reazione di transesterificazione è supportata da U5 che aiuta ad avvicinare i due esoni

Le snRNPs rimangono legate al cappio, ma vengono rilasciate in seguito a degradazione del cappio stesso



Un gruppo ristretto di introni (circa 1 su 1000) in **piante e mammiferi** è caratterizzato da **sequenze consenso diverse** da quelle presenti nella maggior parte degli introni.

Per questi introni lo splicing è compiuto dallo **spliceosoma minore (o AT-AC)** che è composto da alcuni **componenti specifici** ed **alcuni in comune** con lo spliceosoma maggiore.



Molti dei riarrangiamenti che avvengono nello spliceosoma richiedono idrolisi di ATP (**energia**)

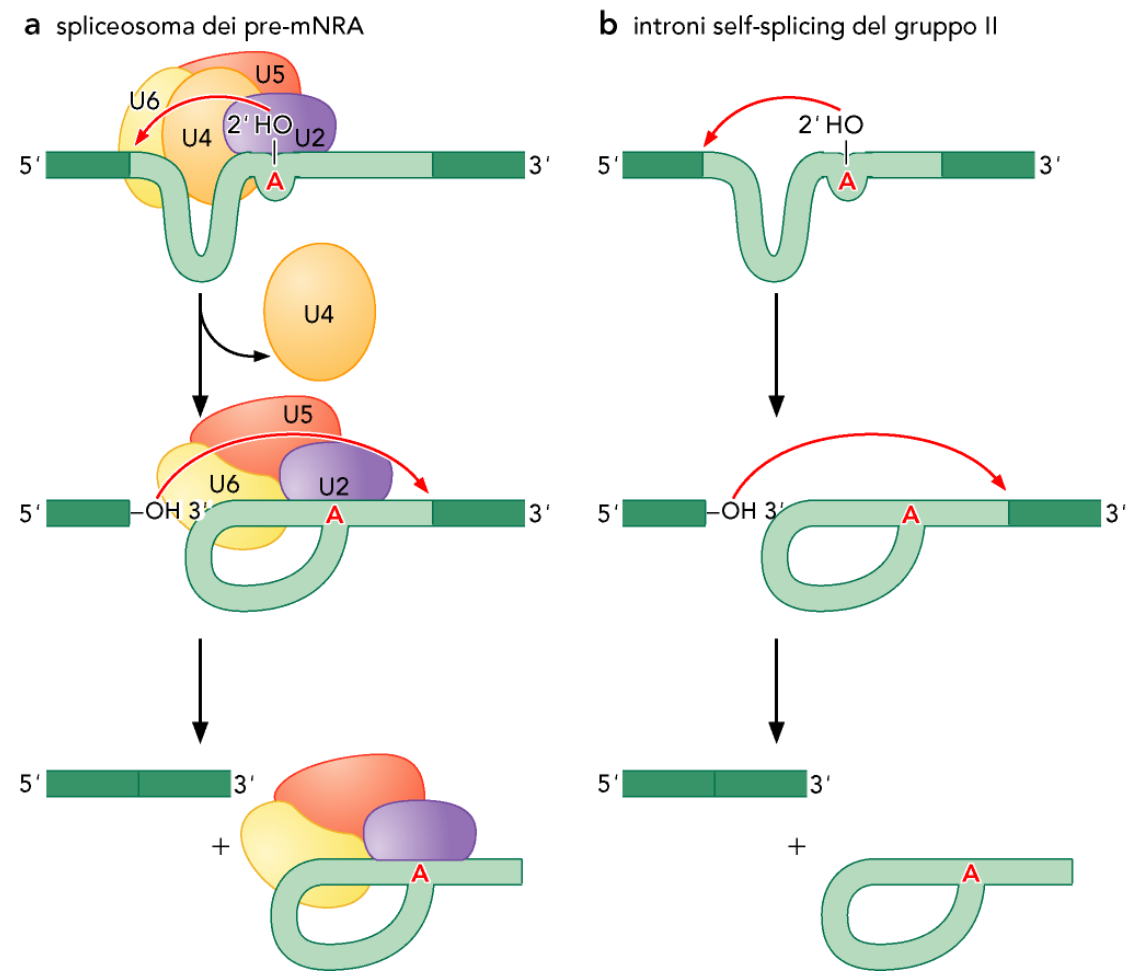
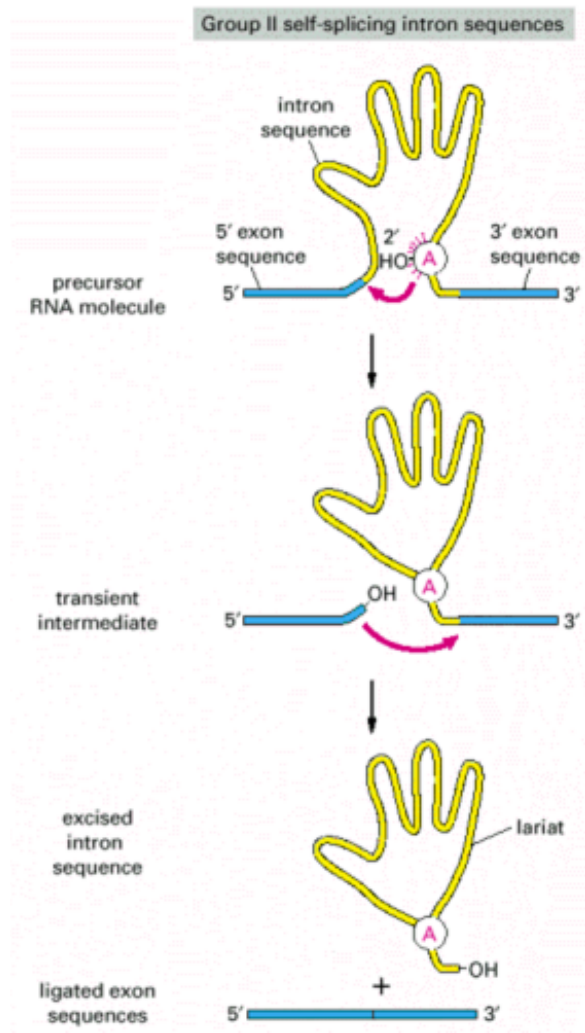
Il macchinario ed il meccanismo di splicing sono molto complicati: come si sono evoluti?

Non sarebbe stato più semplice unire gli esoni in una singola reazione invece di utilizzarne due?

Introni self-splicing (autosplicing)

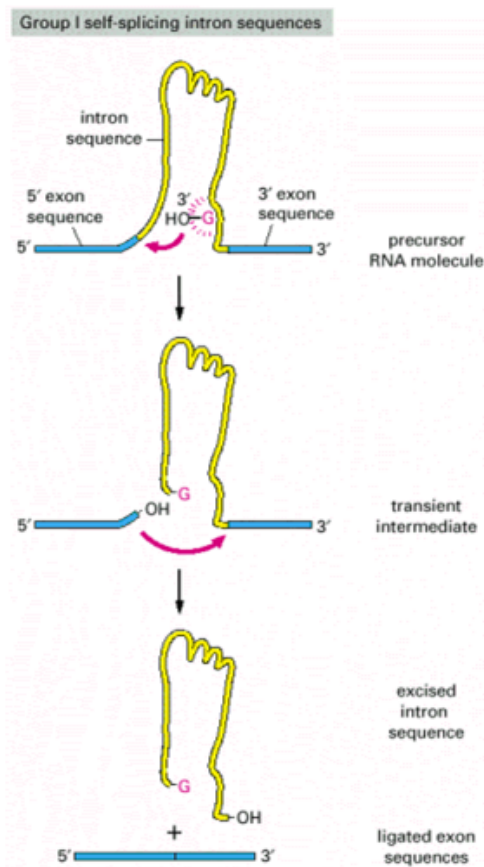
Introni di gruppo II

Rari, alcuni geni degli organelli degli eucarioti e alcuni geni dei procarioti

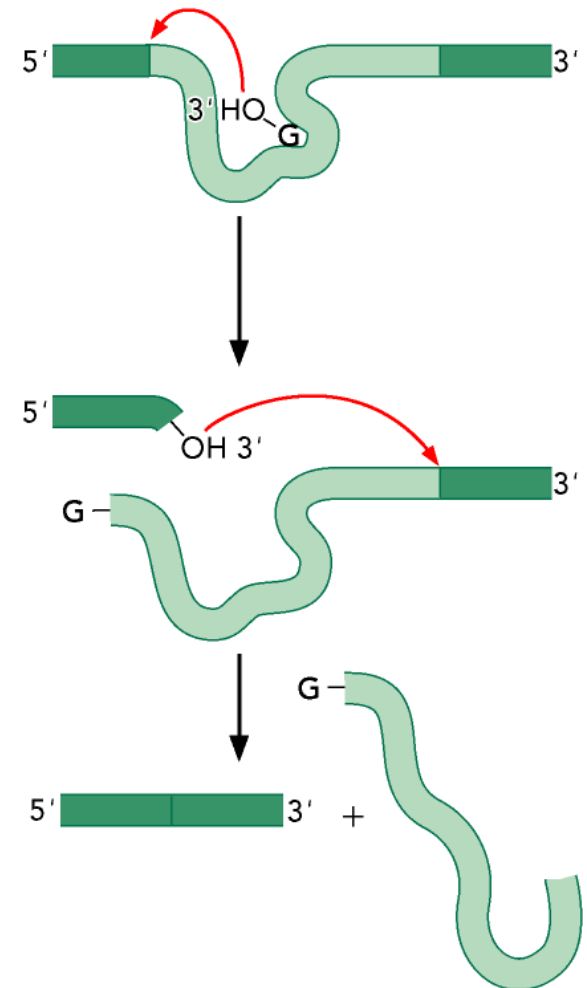


Introni di gruppo I

Rari, rRNA nucleari di alcuni eucarioti, geni degli organelli e qualche gene procariotico

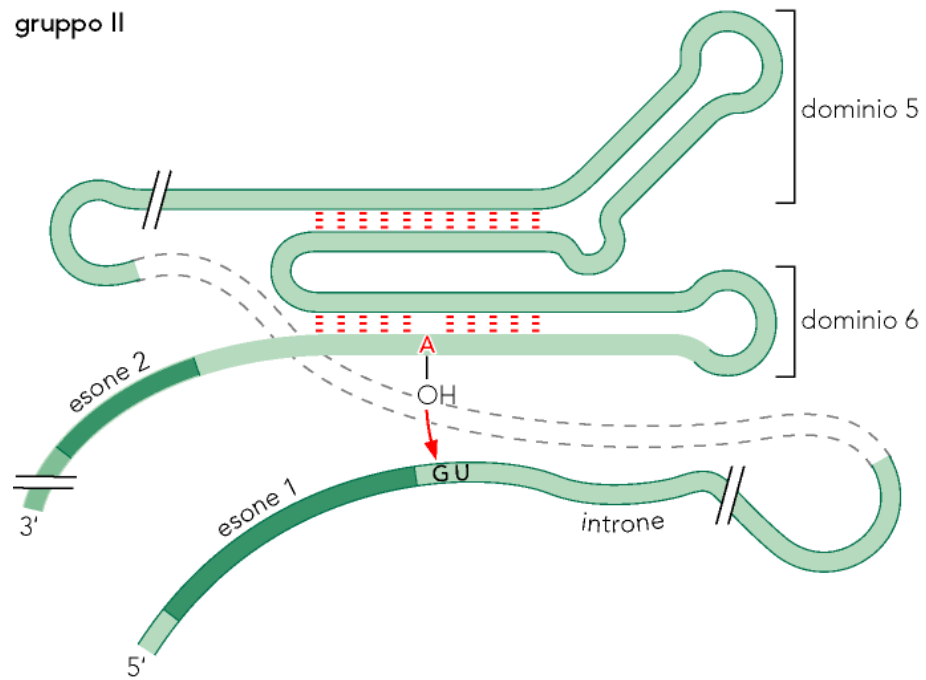
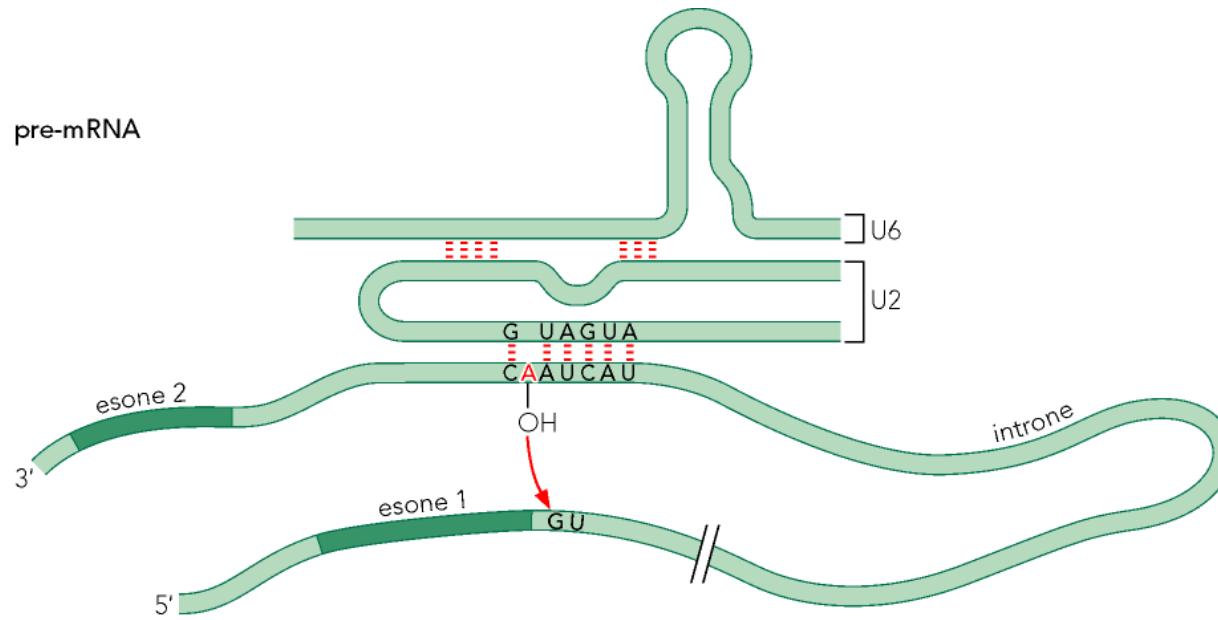


c introni self-splicing del gruppo I



Perché “inventare” il meccanismo di splicing nucleare invece dell'autosplicing?

Perché l'**evoluzione** degli introni di gruppo I e II è **fortemente limitata** da tutti i requisiti di sequenza e struttura necessari per fare autocatalisi: nello splicing nucleare sono richieste invece solo poche sequenze *in cis* sull'introne (ma molte componenti proteiche ed a RNA *in trans*!!)



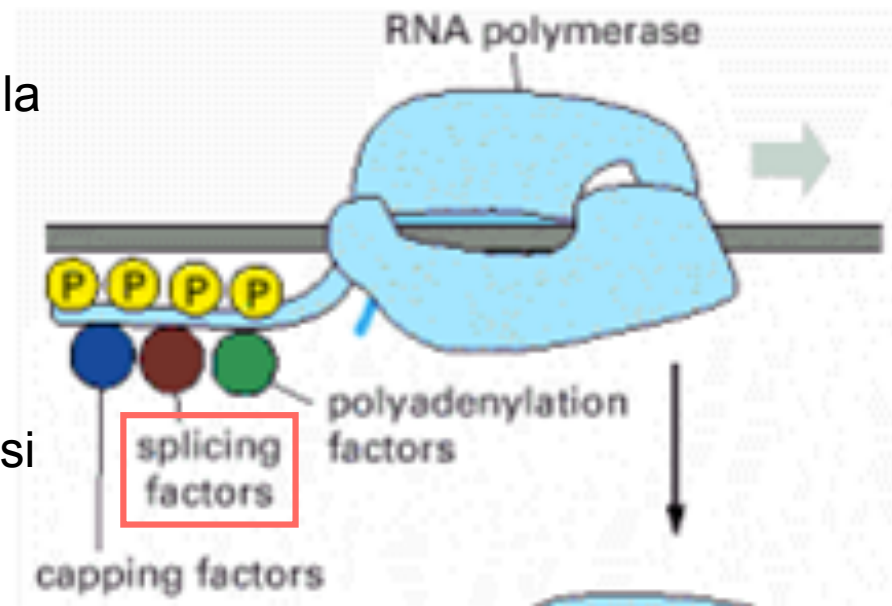
L'esone medio è lungo 150 nt, l'introne medio 3000 nt
(ma vi sono introni di 800 000 nt!)

Come fa lo spliceosoma a trovare i siti di splicing in
maniera affidabile?

I meccanismi di fedeltà propri dello spliceosoma sono integrati da due strategie aggiuntive che fanno aumentare l'accuratezza dello splicing

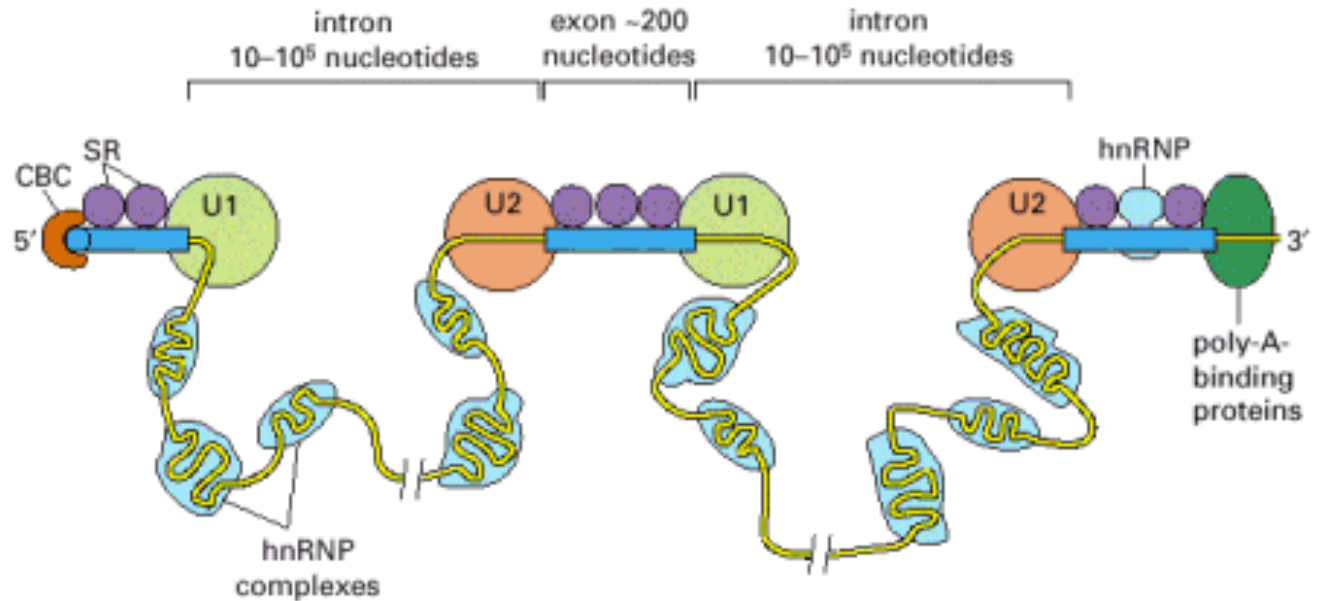
- 1) Le prime fasi dello splicing avvengono mentre le molecole sono sintetizzate dalla RNA polimerasi II. Man mano che la trascrizione procede, il CTD fosforilato porta parecchi componenti dello spliceosoma e questi componenti sono trasferiti direttamente dalla polimerasi all'RNA mentre è ancora in fase di sintesi

Questa strategia aiuta la cellula a tenere il conto di introni ed esoni: lo spliceosoma si trova davanti ad un solo possibile 3'ss perché i siti più a valle non sono ancora stati sintetizzati.



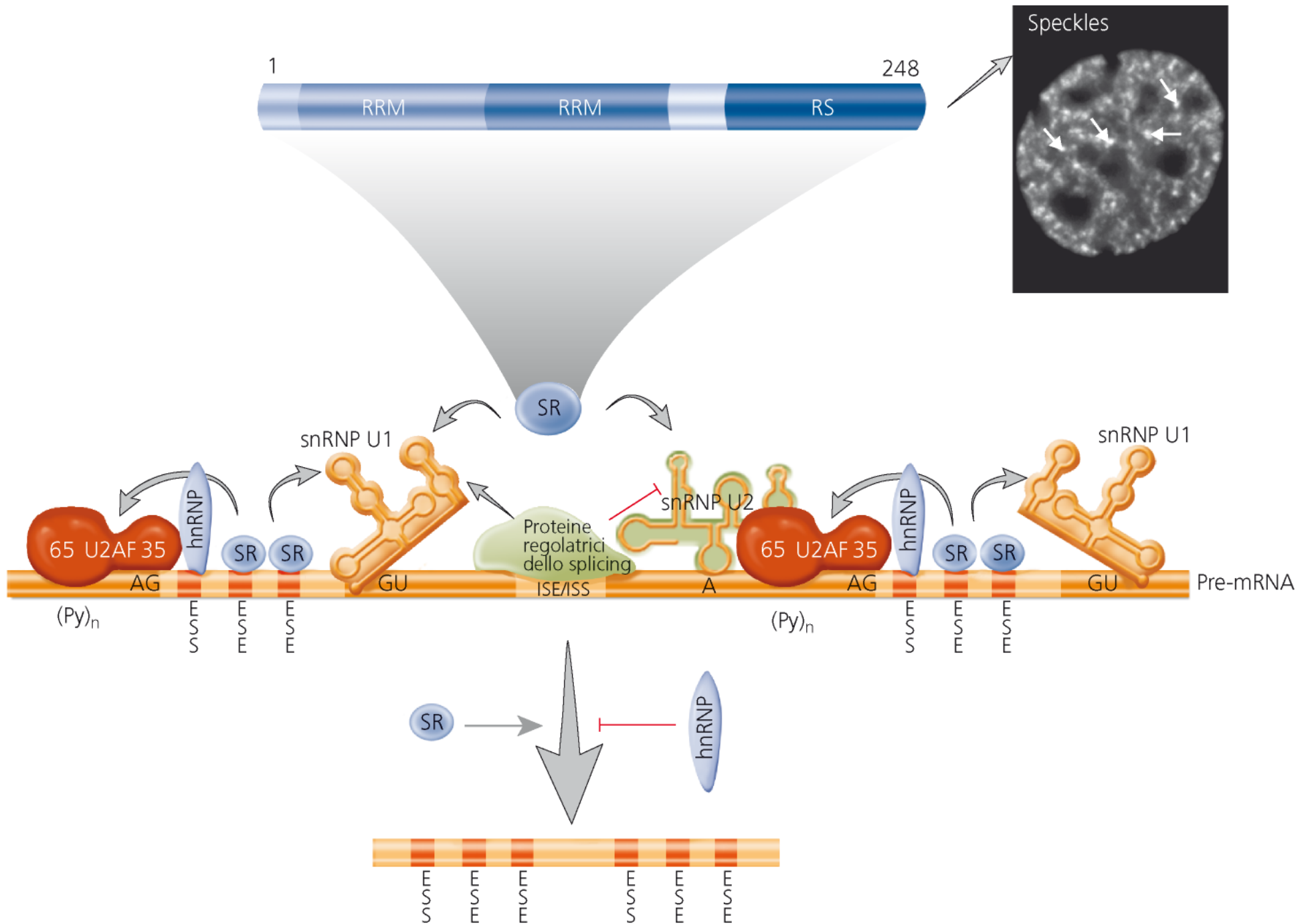
RNA splicing

2) L'ipotesi della definizione degli esoni

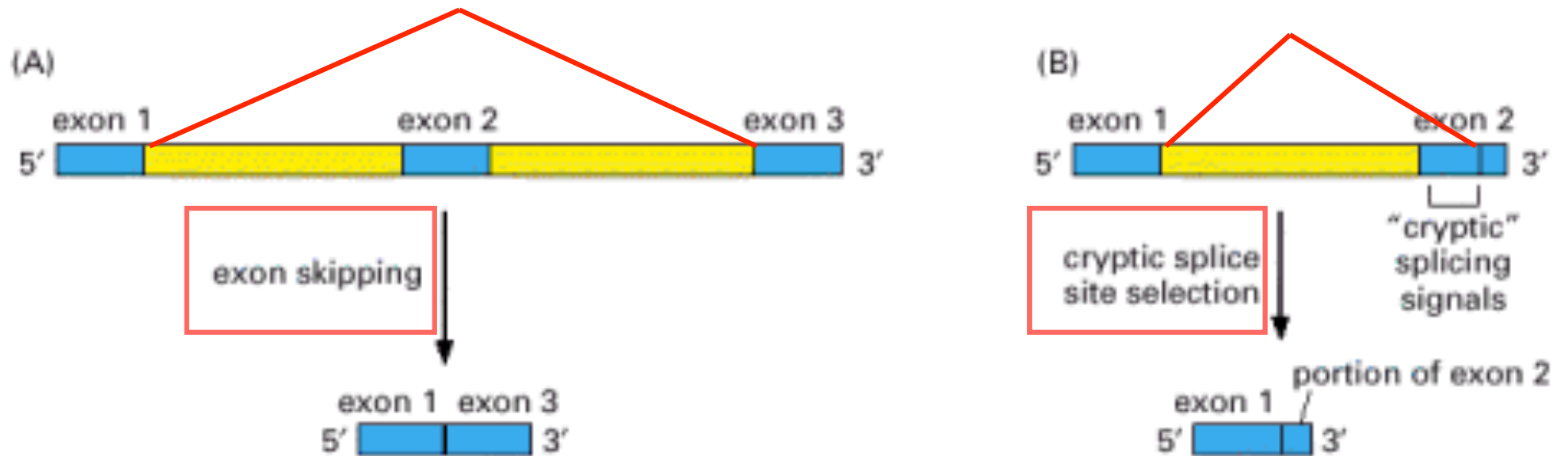


Demarcazione degli esoni da parte delle **proteine SR**, avviene **cotrascrizionalmente**, iniziando dal CBC (complesso che lega il cap) al 5'. hnRNPs si legano agli introni (ma possono legare anche esoni)

ESE: Enhancers di splicing esonici



RNA splicing

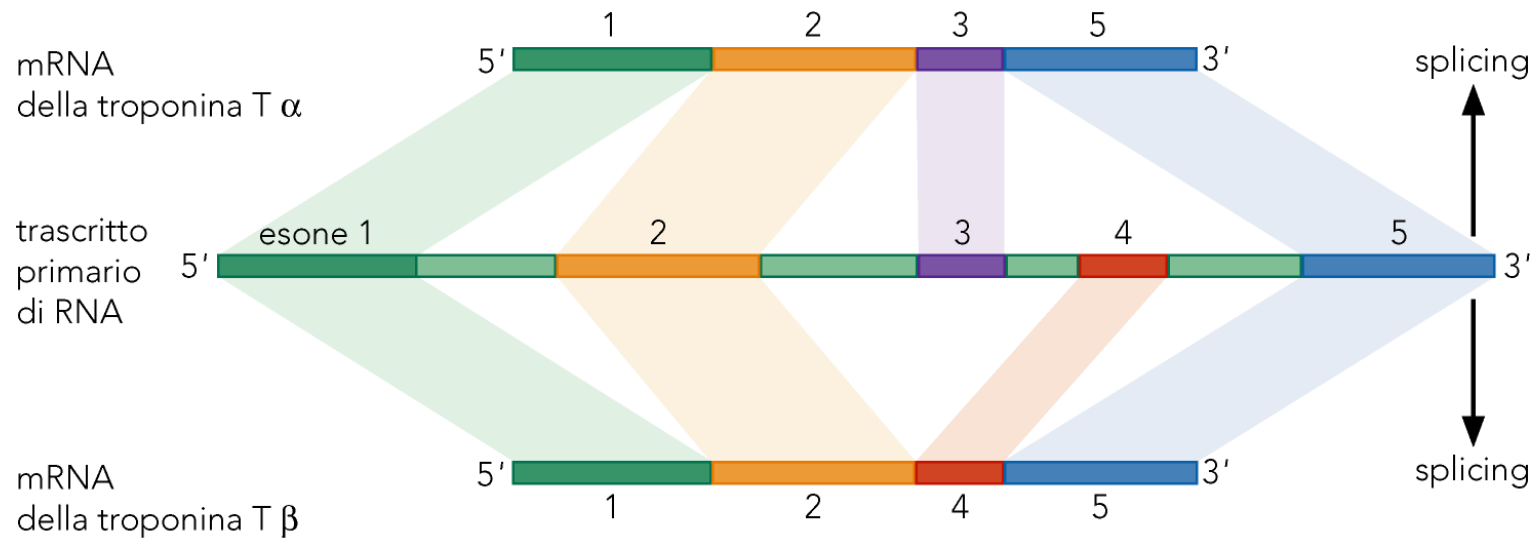


Due tipi di errori di splicing.

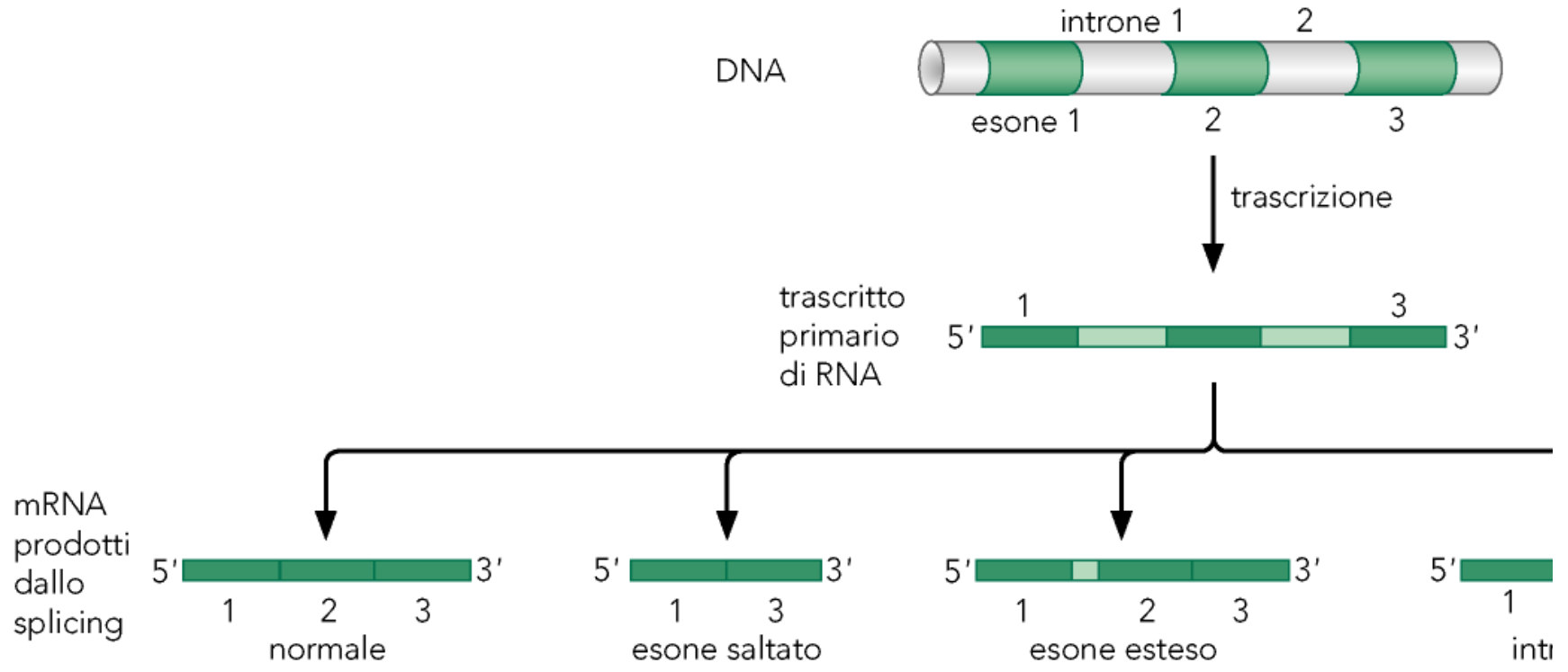
- Lo splicing dell'RNA mostra una notevole plasticità: cambiamenti negli schemi di splicing causati da mutazioni casuali sono stati una via importante nell'evoluzione di geni ed organismi

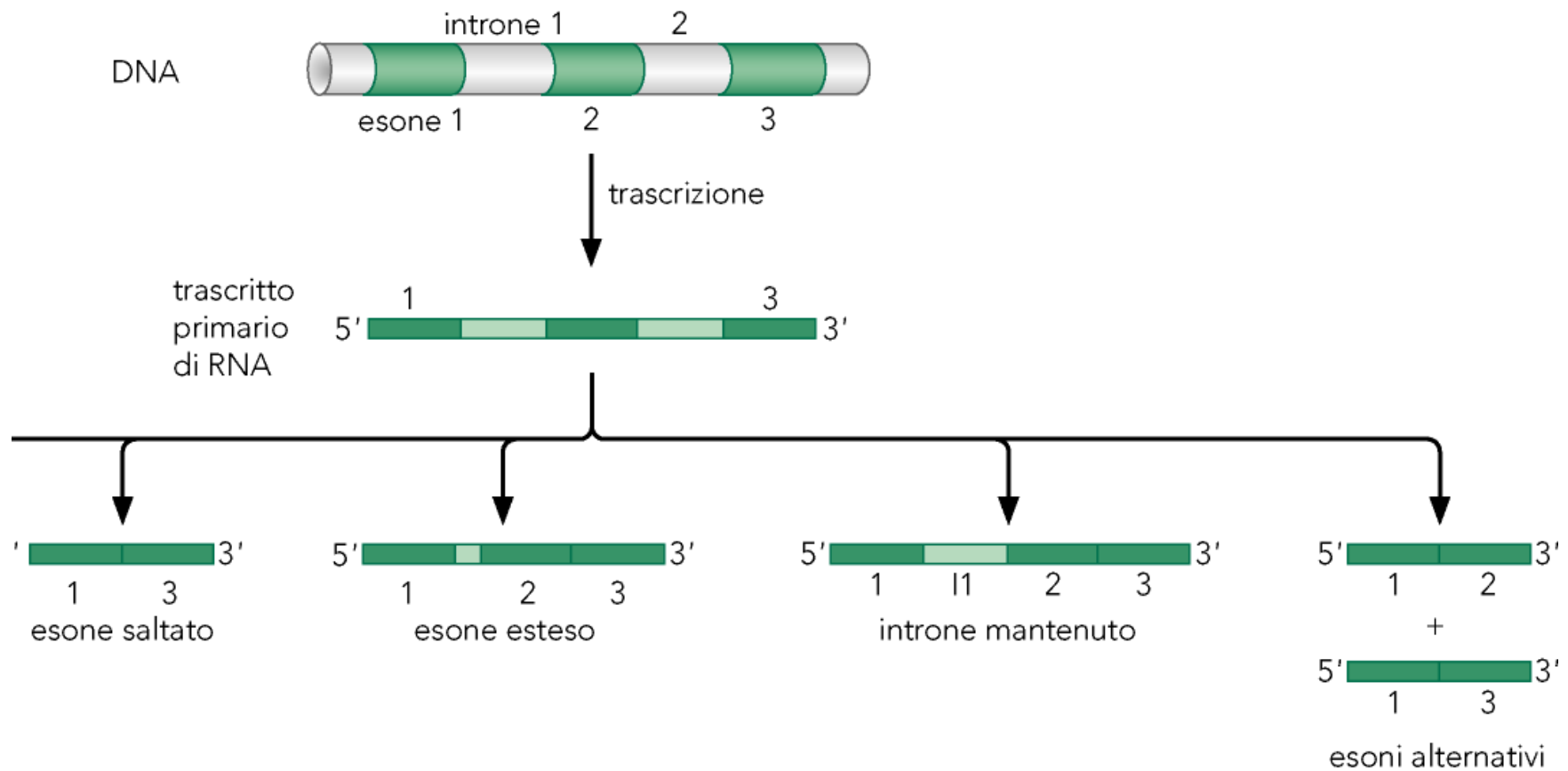
- La cellula può regolare facilmente lo schema di splicing in maniera che forme diverse della proteina siano prodotte in momenti e tessuti diversi: **splicing alternativo**.

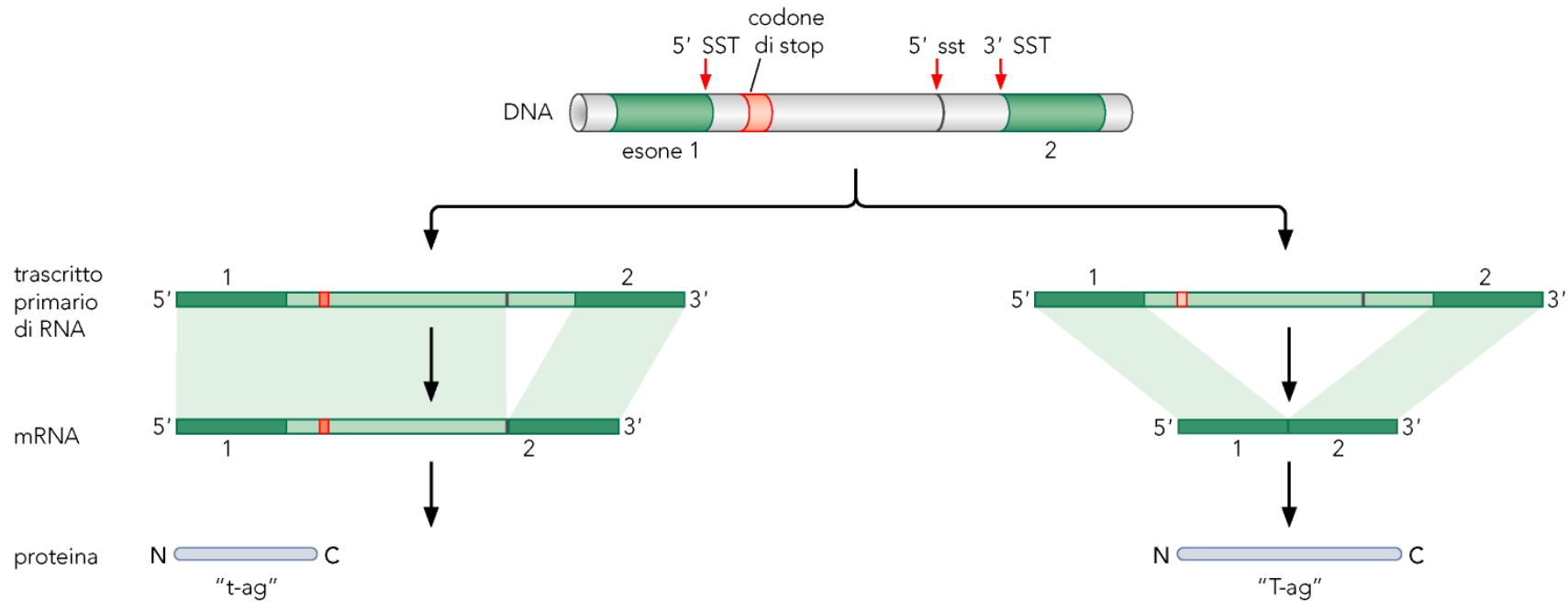
I singoli geni possono dare origine a diversi prodotti grazie allo **splicing alternativo**



Lo splicing alternativo del gene della troponina T





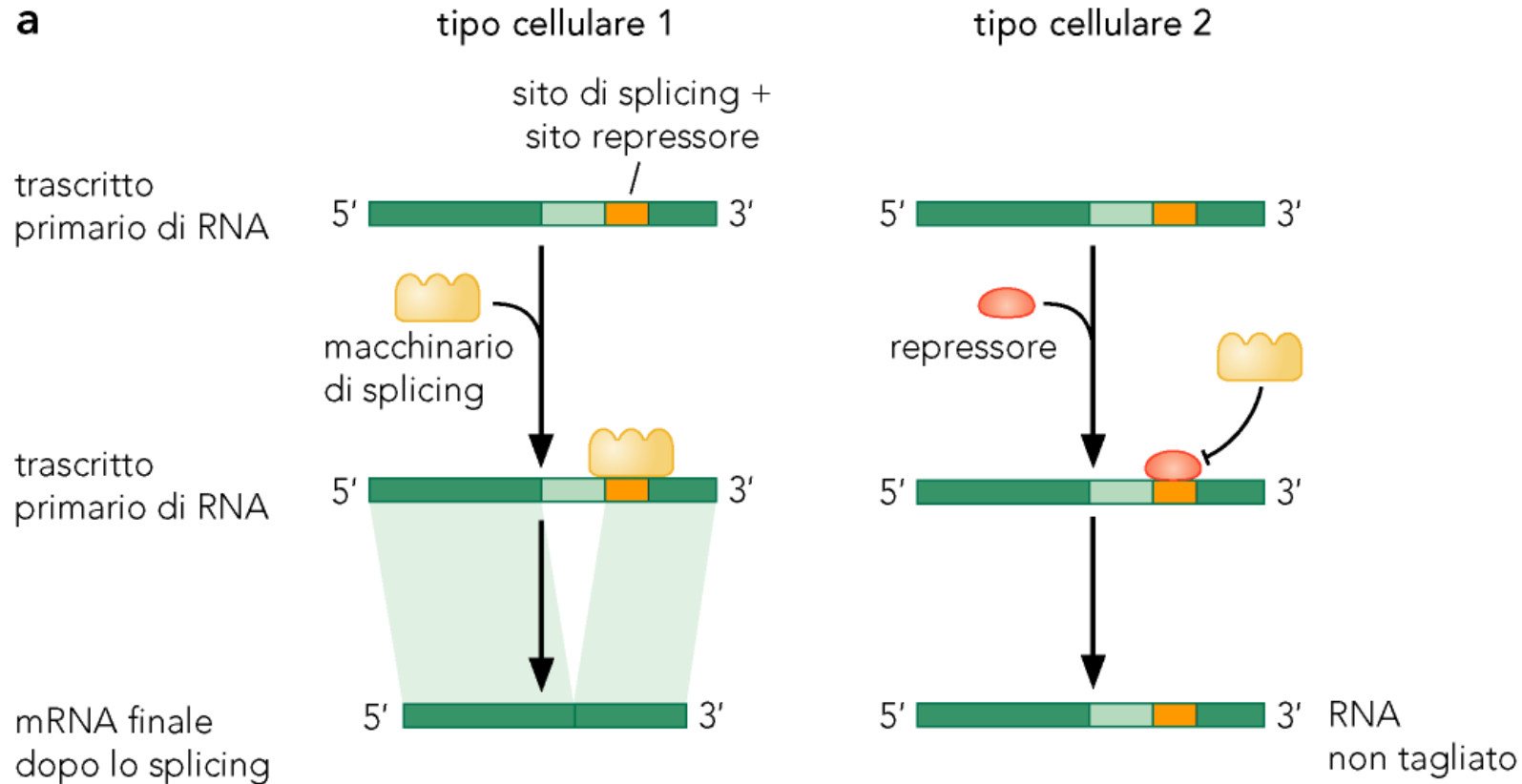


Splicing alternativo dell'antigene T di SV40

Antigene T maggiore induce la trasformazione e il reingresso nel ciclo cellulare

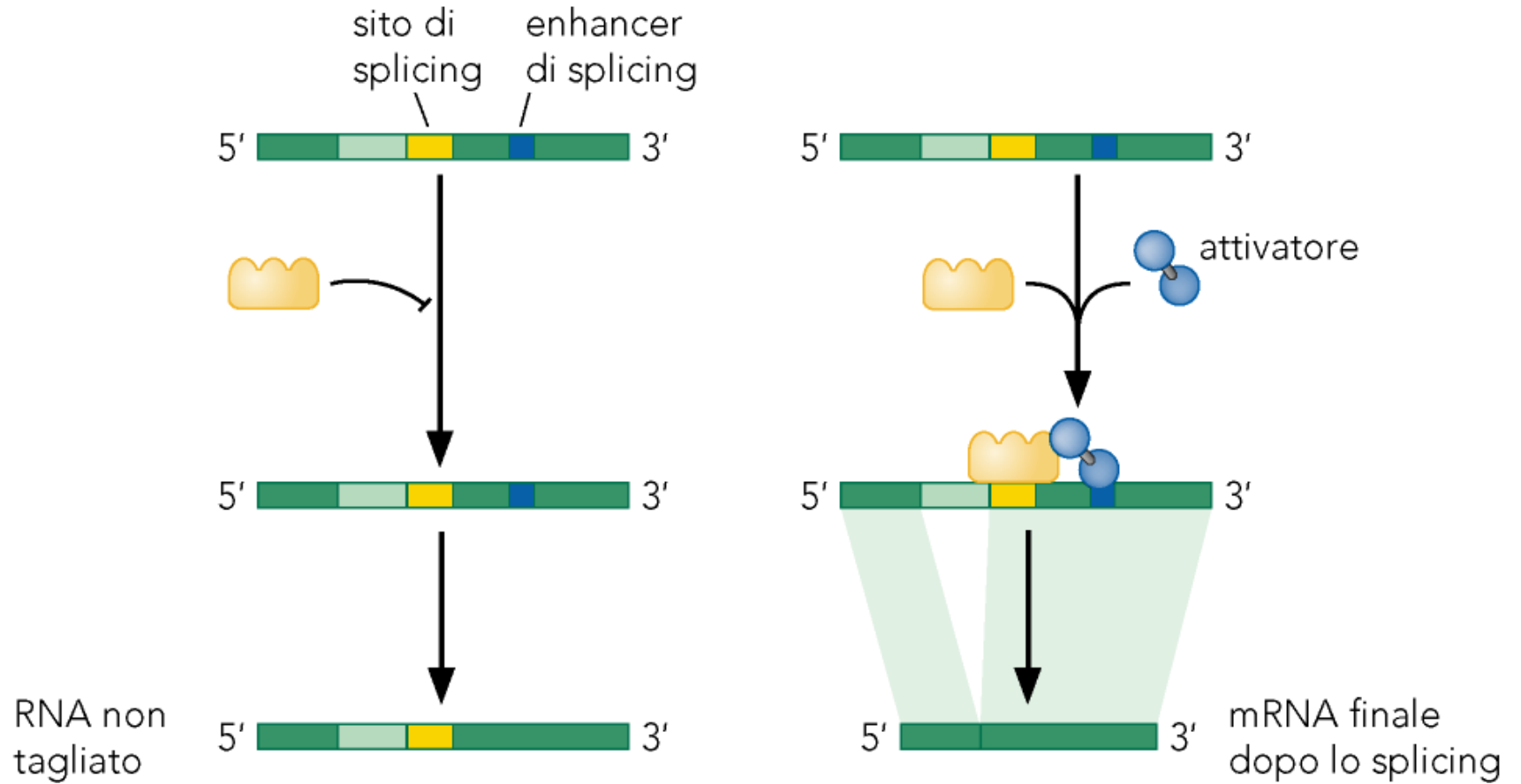
Antigene t minore blocca la risposta apoptotica delle cellule spinte in questo cammino

Lo splicing alternativo è regolato da **attivatori e repressori**



Alcuni esoni alternativi compaiono nell'mRNA a meno che un repressore non ne impedisca lo splicing

b



Altri esoni invece compaiono nell'mRNA solo se un'attivatore specifico ne promuove l'inclusione

RNA splicing

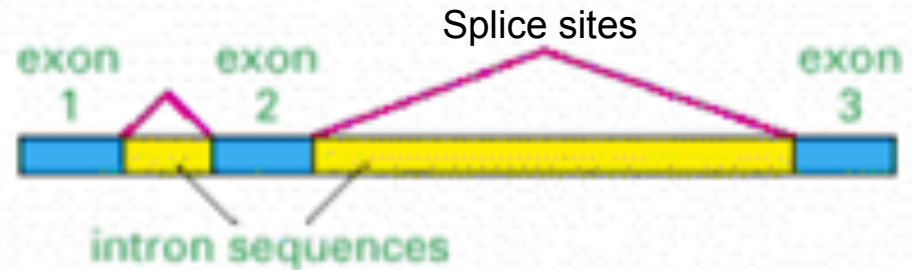
Errori nello splicing del pre-mRNA causano diverse **malattie**

Splicing anormale del trascritto primario di RNA della beta-globina in esseri umani con talassemia beta

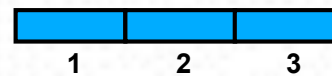
Le frecce nere indicano mutazioni



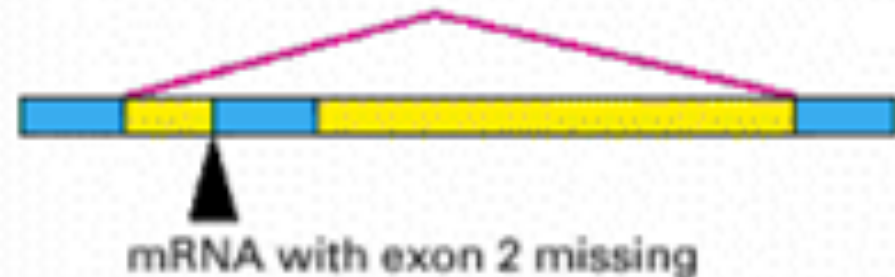
(A) NORMAL ADULT β -GLOBIN PRIMARY RNA TRANSCRIPT



normal mRNA is formed from three exons



(B) SOME SINGLE-NUCLEOTIDE CHANGES THAT DESTROY A NORMAL SPLICE SITE CAUSE EXON SKIPPING

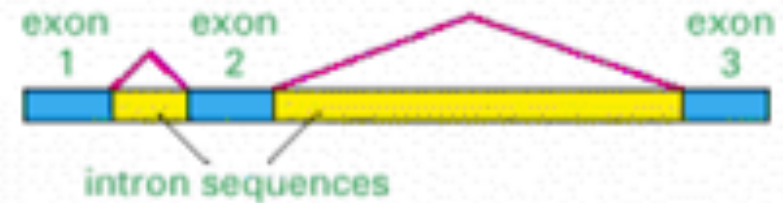


RNA splicing

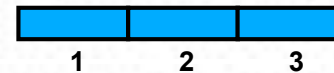
Splicing anormale del trascritto primario di RNA della beta-globina in esseri umani con talassemia beta

Le frecce nere indicano mutazioni

(A) NORMAL ADULT β -GLOBIN PRIMARY RNA TRANSCRIPT



normal mRNA is formed from three exons



(C) SOME SINGLE-NUCLEOTIDE CHANGES THAT DESTROY NORMAL SPLICE SITES ACTIVATE CRYPTIC SPLICE SITES



mRNA with extended exon 3



(D) SOME SINGLE-NUCLEOTIDE CHANGES THAT CREATE NEW SPLICE SITES CAUSE NEW EXONS TO BE INCORPORATED



mRNA with extra exon inserted between exon 2 and exon 3

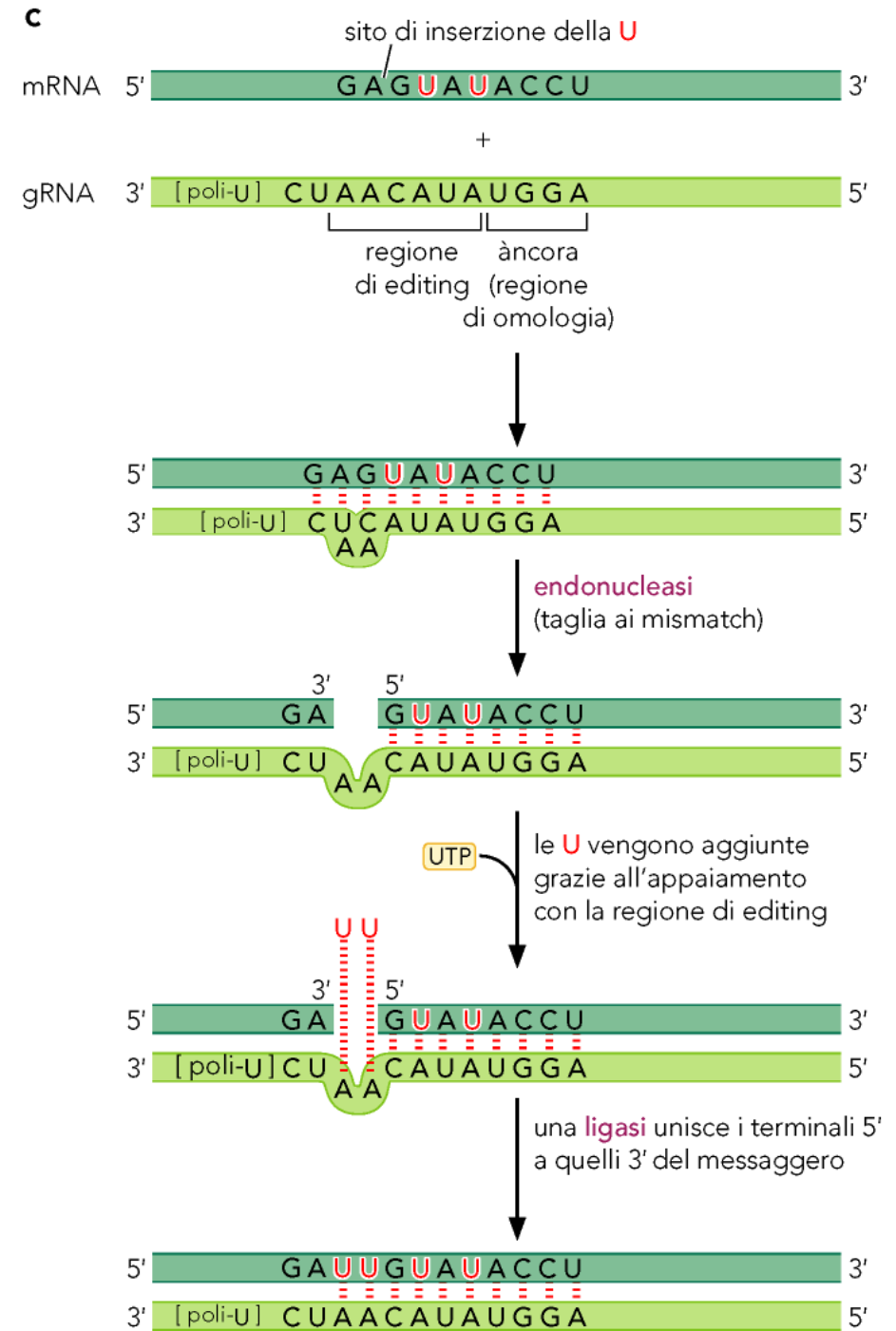
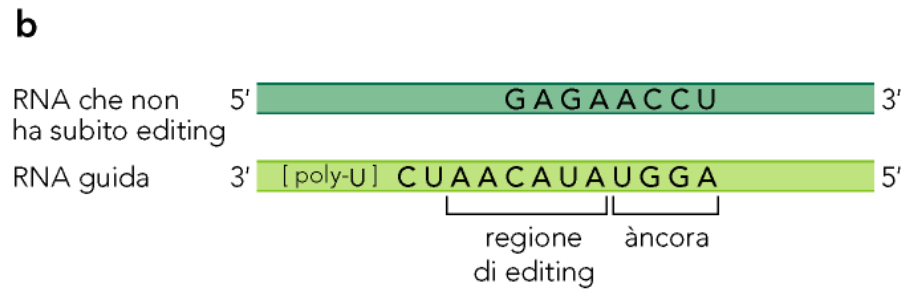
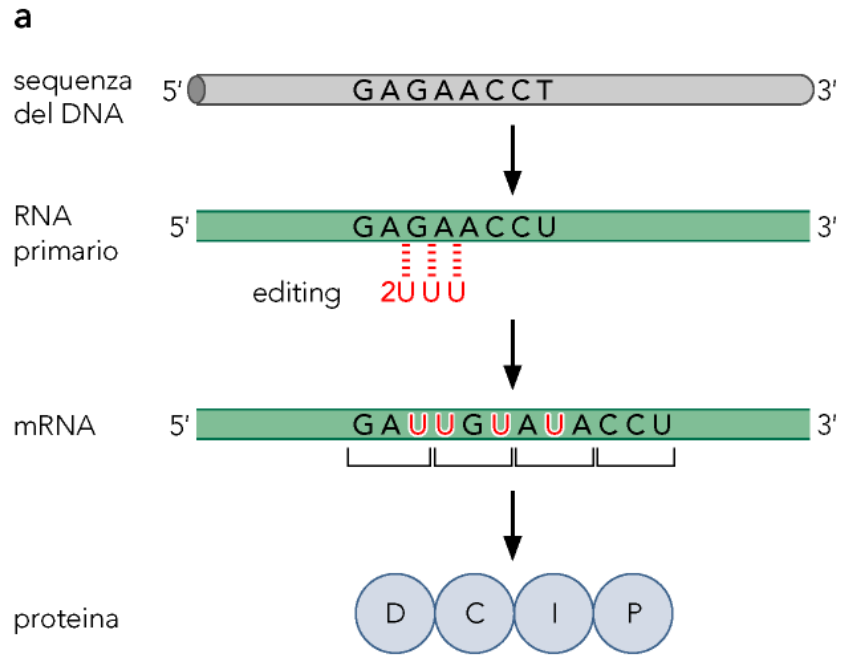


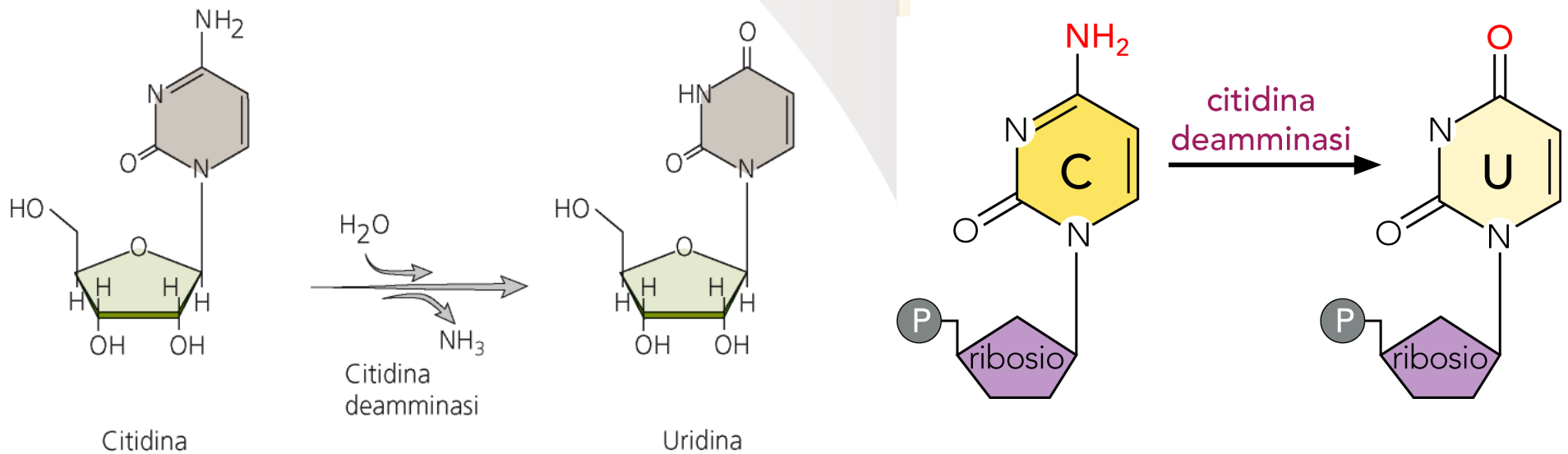
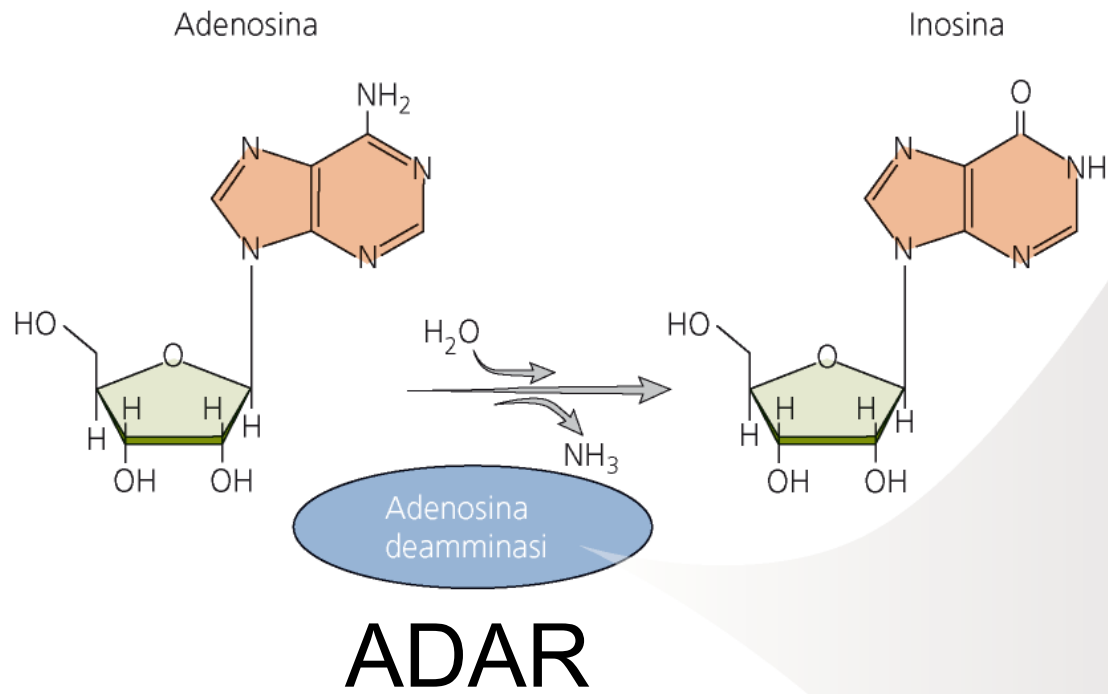
Editing dell'mRNA

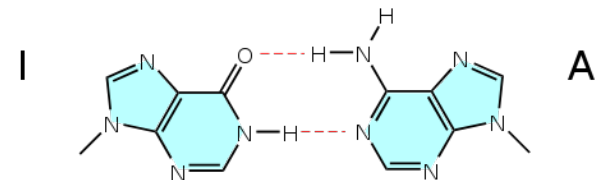
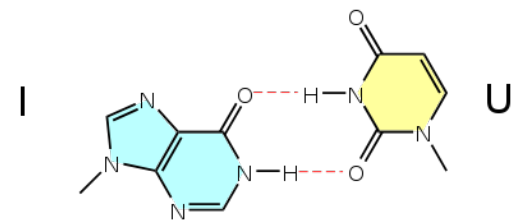
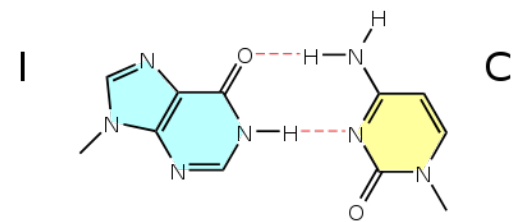
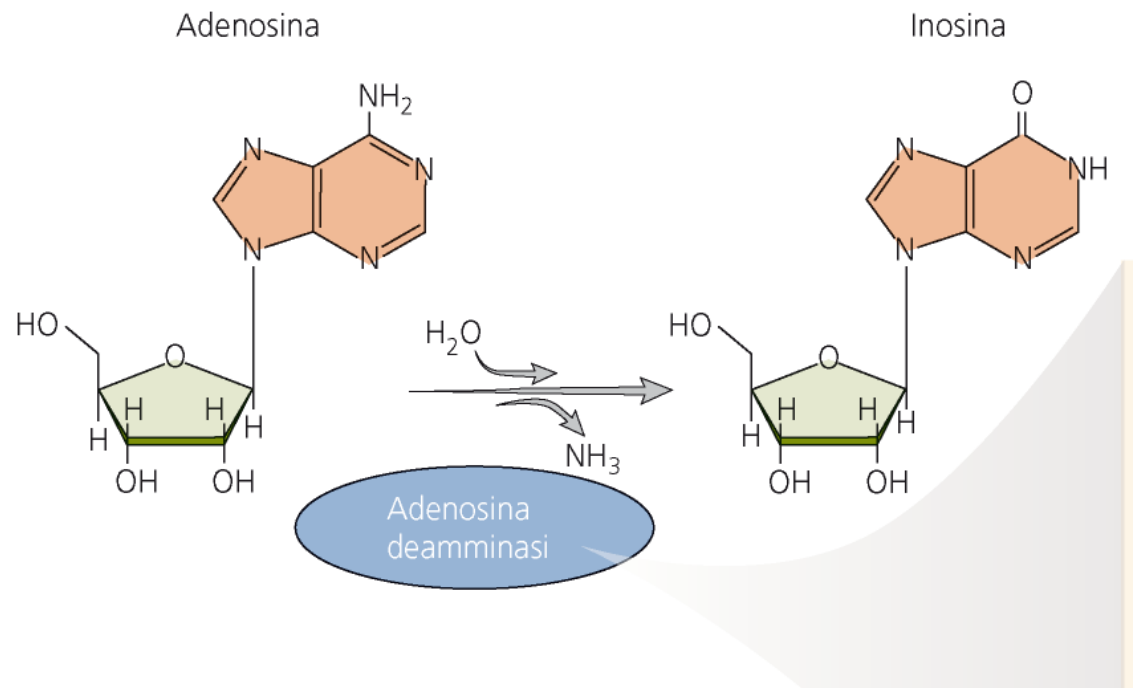
L'editing dell'mRNA rappresenta un altro modo per modificare la sequenza di un mRNA

- Nei protozoi: inserzioni di U nei trascritti mitocondriali
- Nei mammiferi: - Editing da A → I
 - Editing da C → U

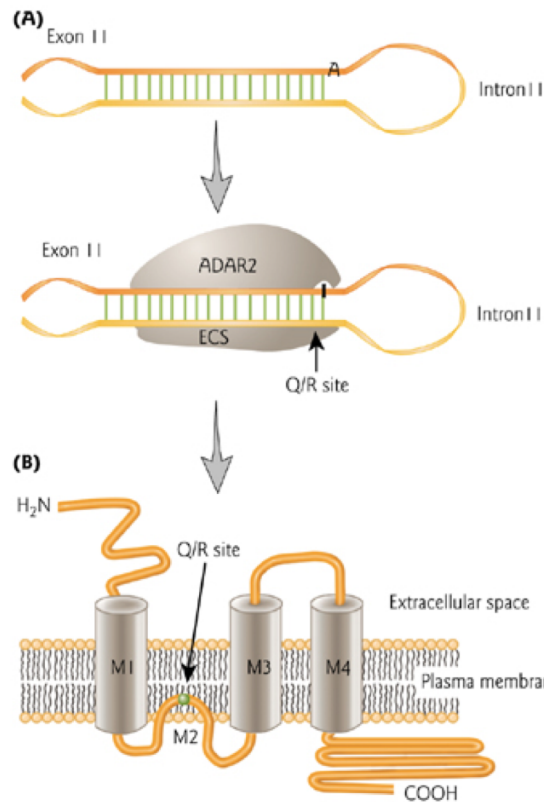








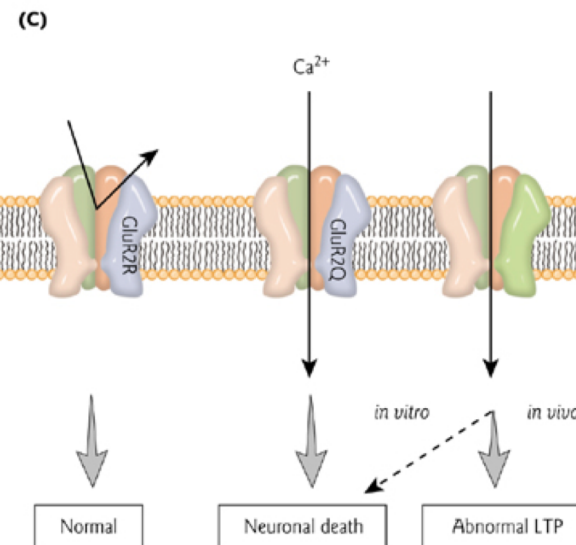
Amyotrophic lateral sclerosis: an RNA editing defect?



ALS: selective motor neurons loss

Only 5-10% cases is familiar, rest is sporadic

Glutamate receptors α -AMPA: high Glutamate concentrations cause cell death

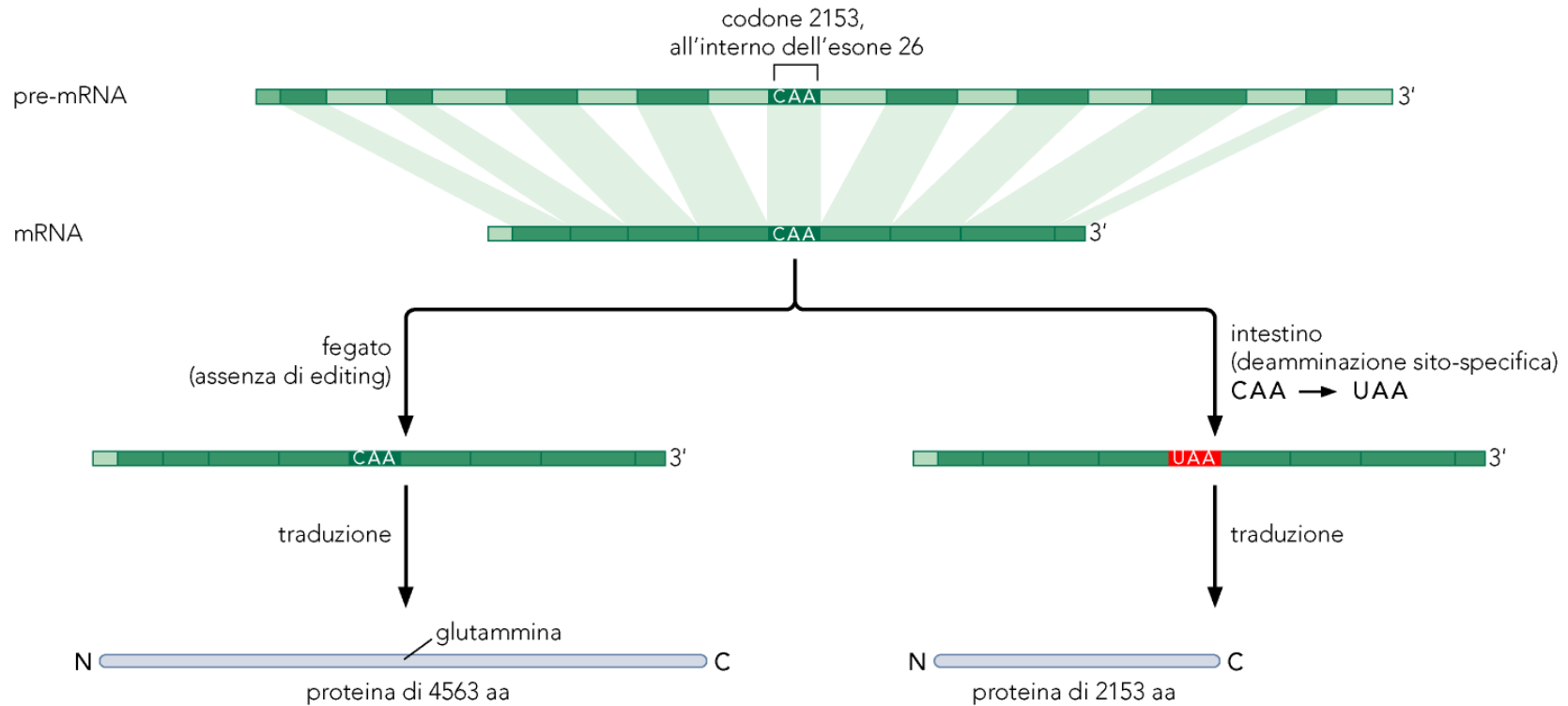


R (edited) \rightarrow low Ca^{2+} conductance

Healthy individuals: 100% editing

ALS: reduction of ADAR2 levels \rightarrow <50% editing, Q, high Ca^{2+} conductance

Editing dell'apolipoproteina umana



Editing *in vitro* con estratti di tessuti di babbuino

