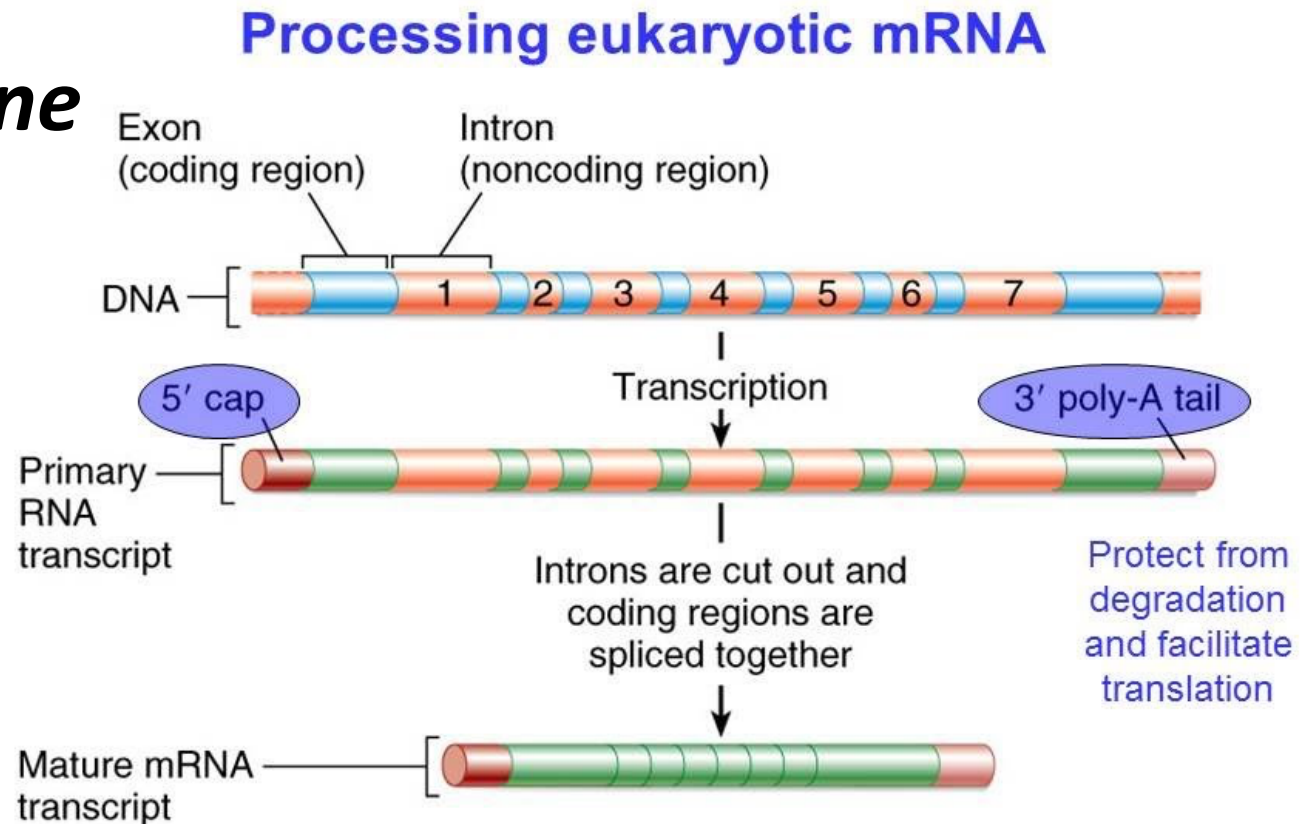


La maturazione ed il processamento dell' RNA

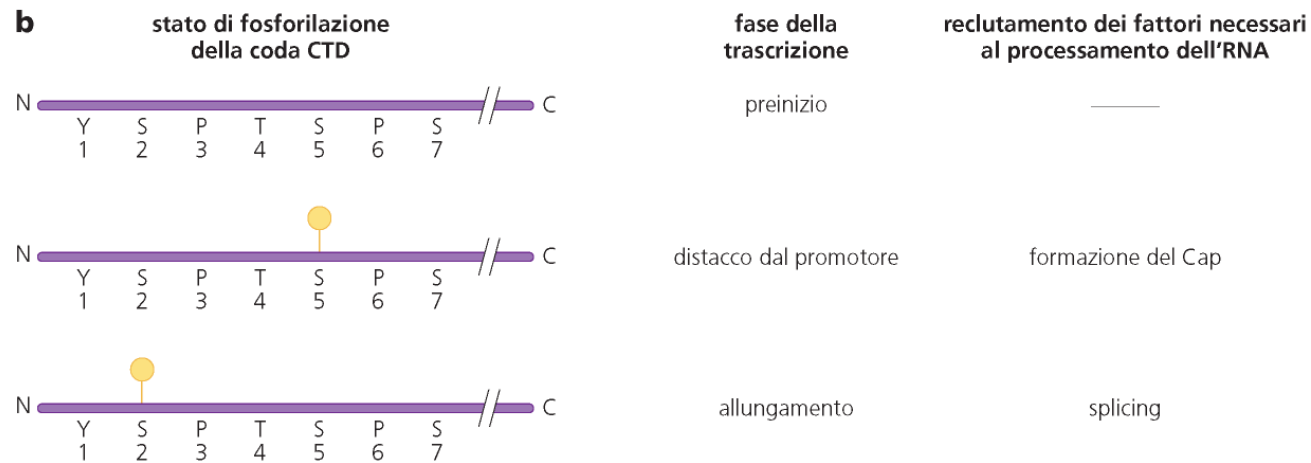
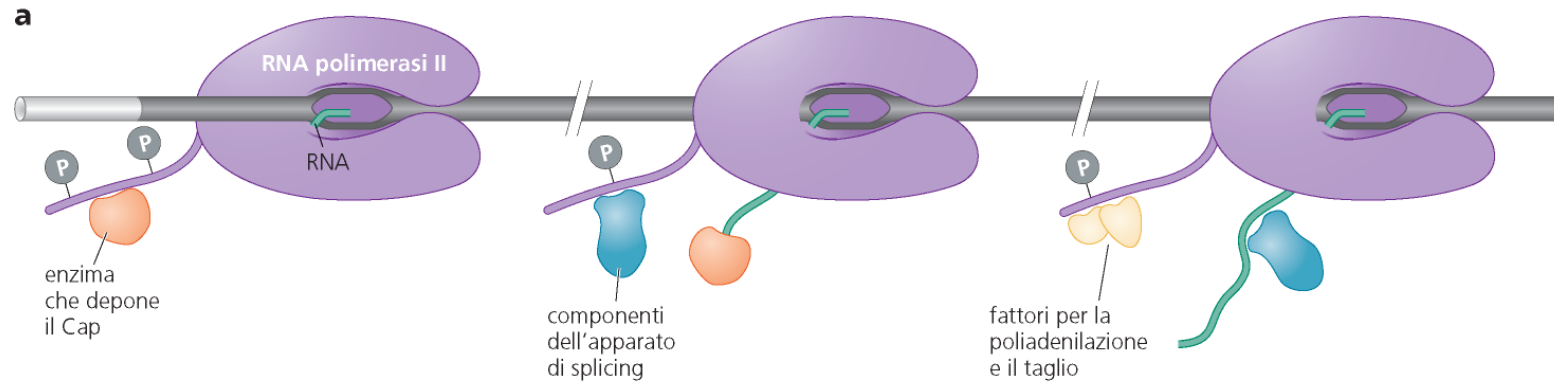
1. Capping

2. Poliadenilazione

3. Splicing



Fattori per la maturazione e processamento del RNA



- *La CTD fosforilata recluta gli enzimi per il capping e per lo splicing*
- *Il capping viene effettuato subito dopo la sua sintesi*

La maturazione ed il processamento dell' RNA

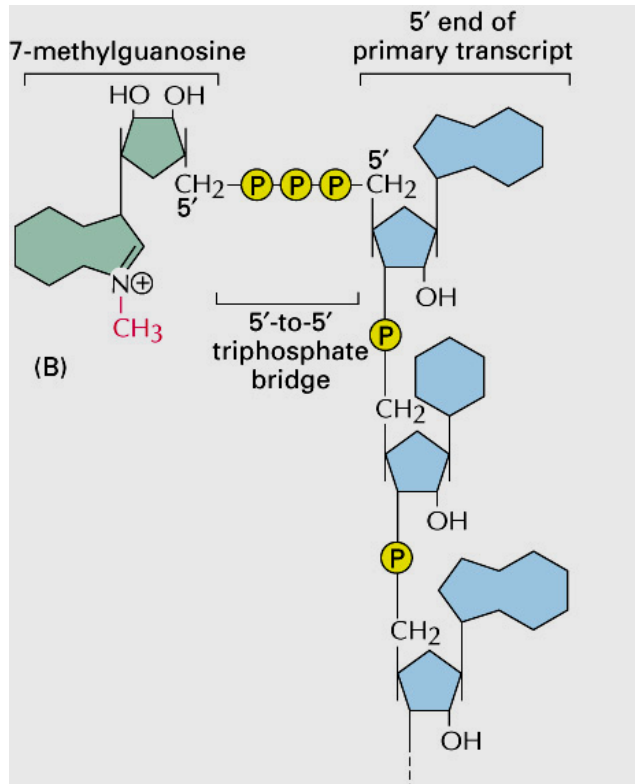
1. Capping

2. Poliadenilazione

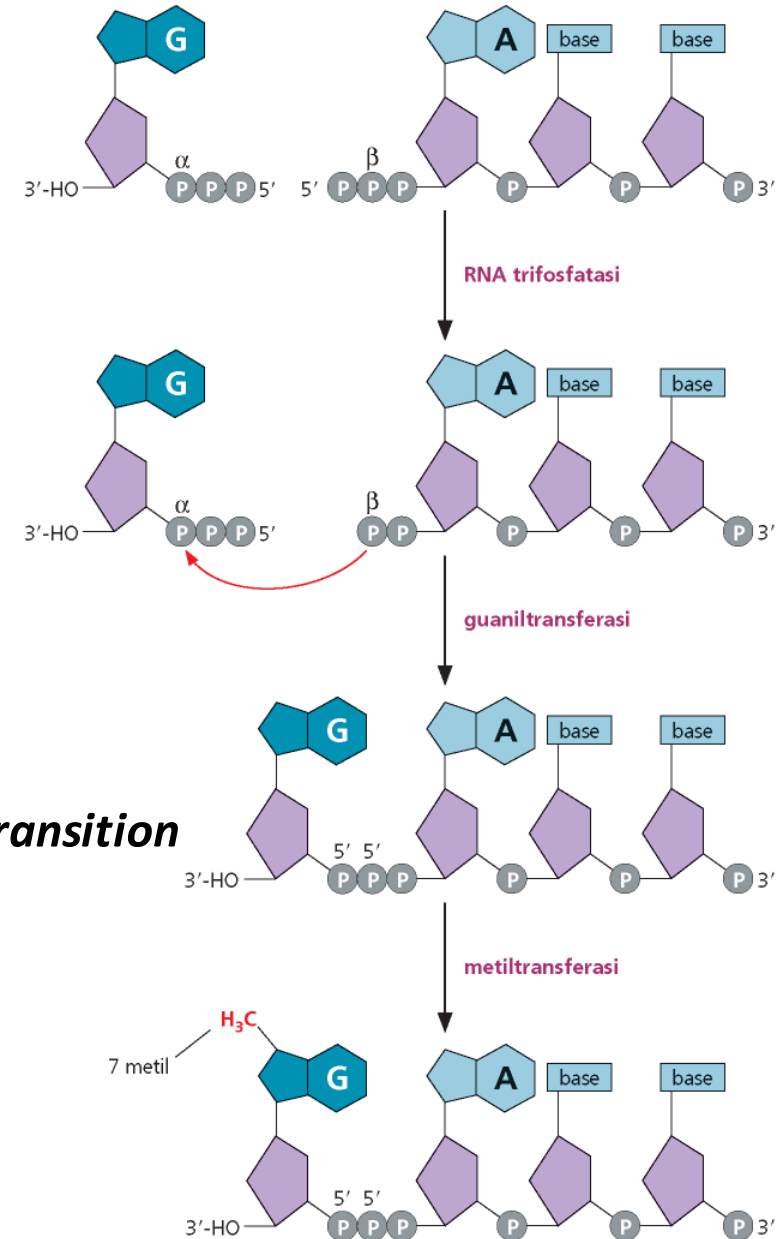
3. Splicing

mRNA capping

7-methyl guanosine at 5' end of mRNA



7-methyl guanosine cap synthesis



- **Timing:** *al interno del canale di uscita dell'RNA; transition initiation-elongation*

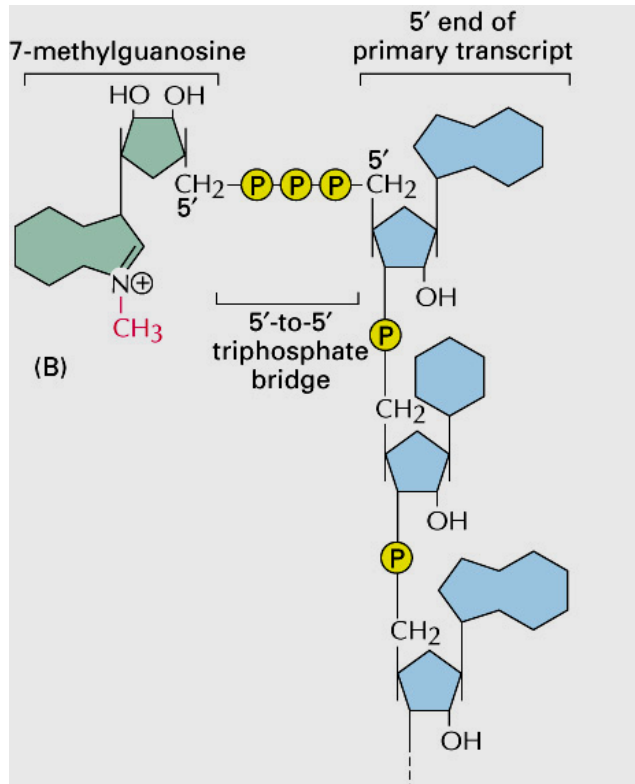
- **Tre enzimi:**

- **Fosfatasi**
- **Guanil transferasi**
- **Metil transferasi**

- **Reclutamento Ribosoma**

mRNA capping

7-methylguanosine at 5' end of mRNA



The 5' caps have four main functions:

1. Regulation of nuclear export
2. Prevention of degradation by exonucleases
3. Promotion of translation
4. Promotion of 5' proximal intron excision.

- *Timing: al interno del canale di uscita dell'RNA; transition initiation-elongation*

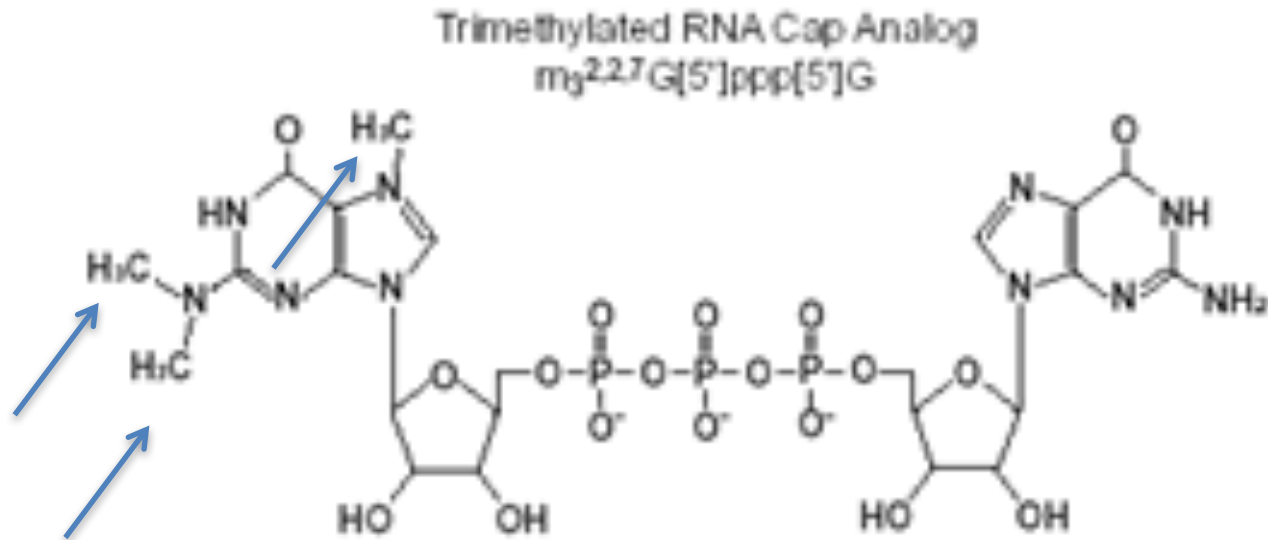
- *Tre enzimi:*

- *Fosfatasi*
- *Guanil transferasi*
- *Metil transferasi*

- *Reclutamento Ribosoma*

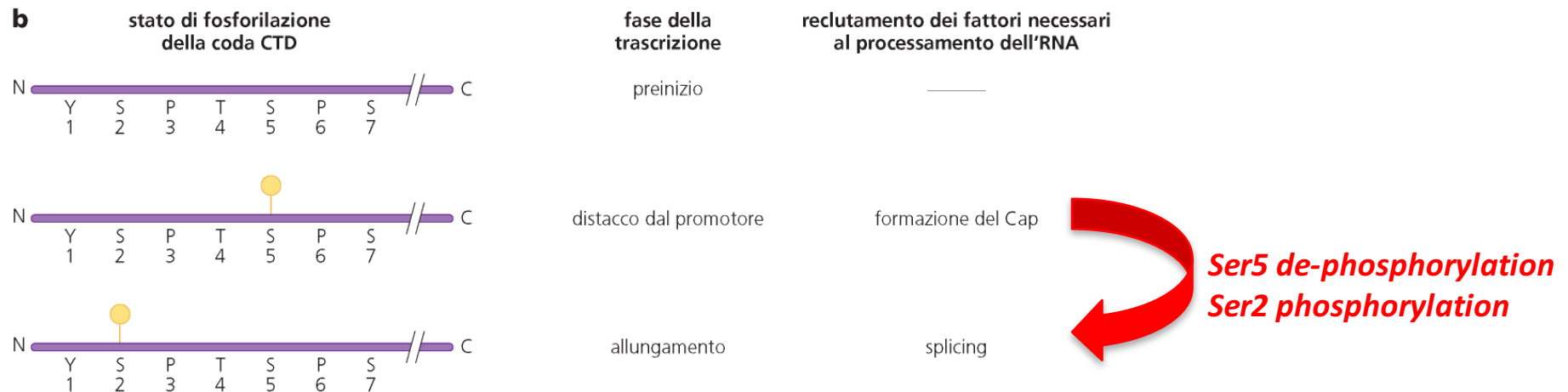
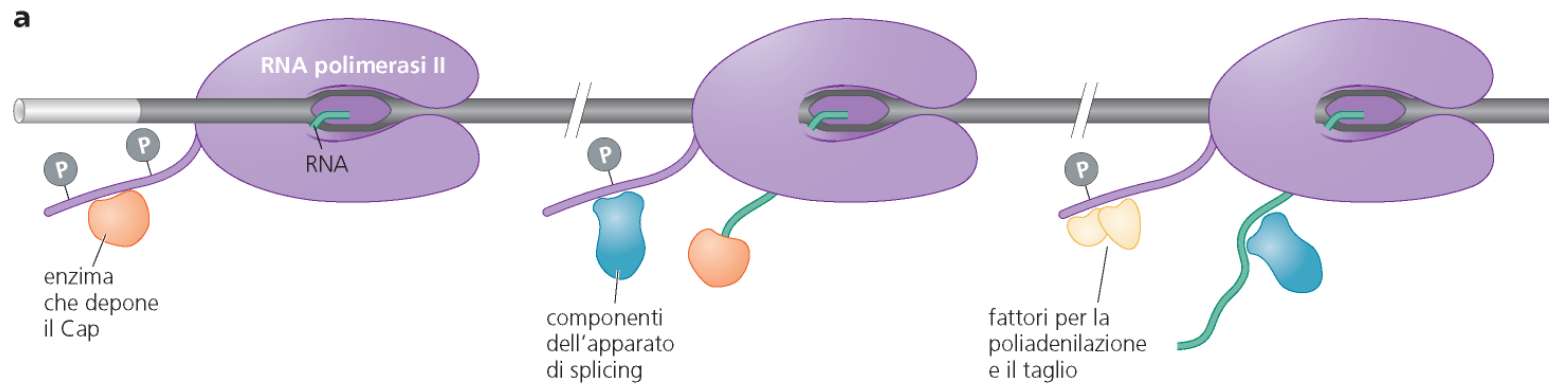
RNA capping

2,2,7-trimethyl guanosine at 5' end of a subgroup of RNAs



Small nuclear RNAs contain unique 5'-caps. snRNAs control splicing, rRNA modifications, and have other regulatory functions. Sm-class snRNAs or telomerase RNA are found with 5'-trimethylguanosine caps

Fattori per la maturazione e processamento del RNA



- *La CTD fosforilata recluta gli enzimi per il capping e per lo splicing*
- *Il capping viene effettuato subito dopo la sua sintesi*

La maturazione ed il processamento dell' RNA

1. Capping

2. Poliadenilazione

3. Splicing

Produzione del 3' terminale di *mRNA* eucariotici

- CTD della RNA Pol II è coinvolto nel reclutamento Degli enzimi necessari per la poliadenilazione
- RNA Pol II raggiunge l'estremità di un gene e produce una mRNA che contiene sequenze specifiche (AUAAA) (GU rich) = "Poli A signal"
- Poli-A signal è riconosciuta da AUAAA e GU rich region
CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor, binds AUAAA) e CSTF (cleavage stimulation factor) binds GU rich sequence
- Reclutamento di proteine che taglia e provoca la poli-adenilazione

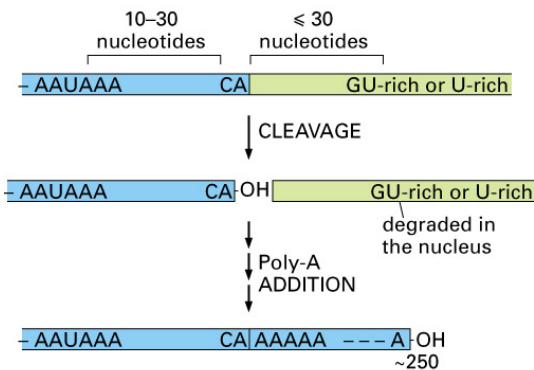
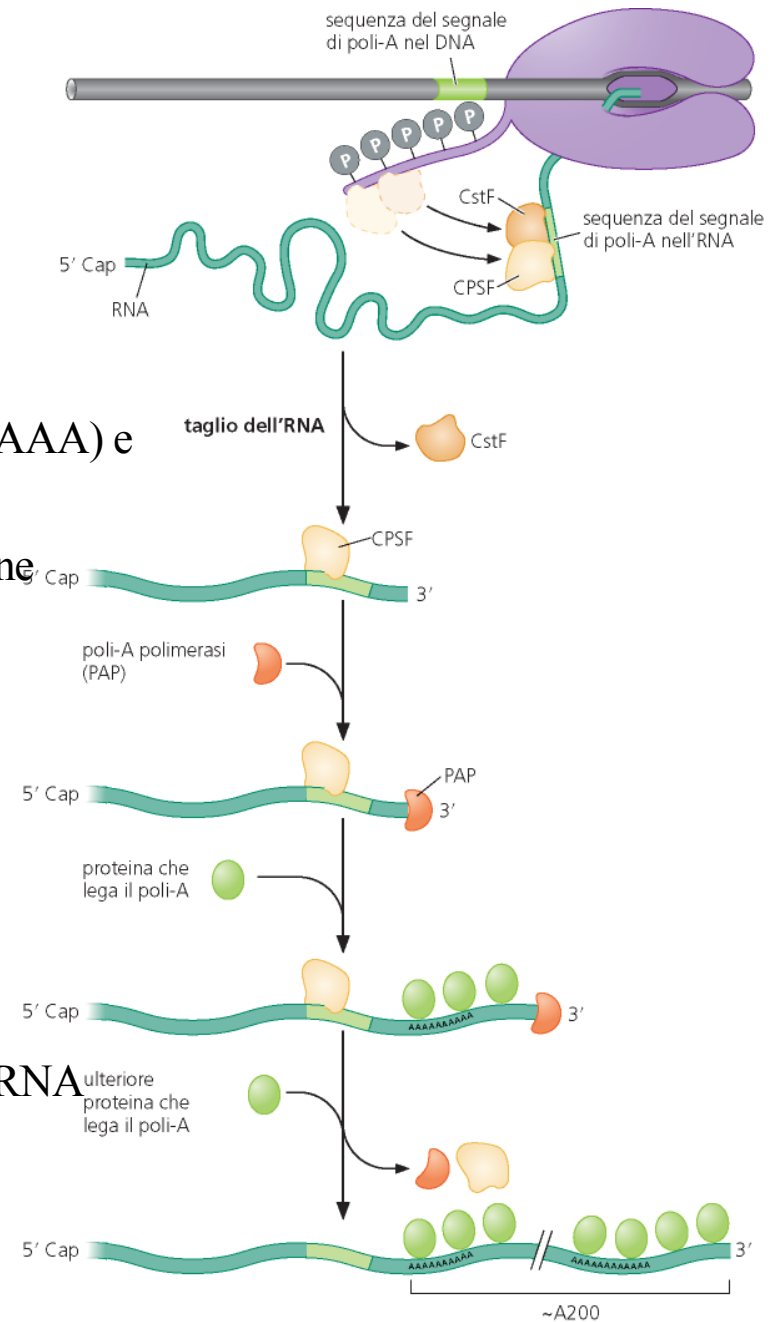
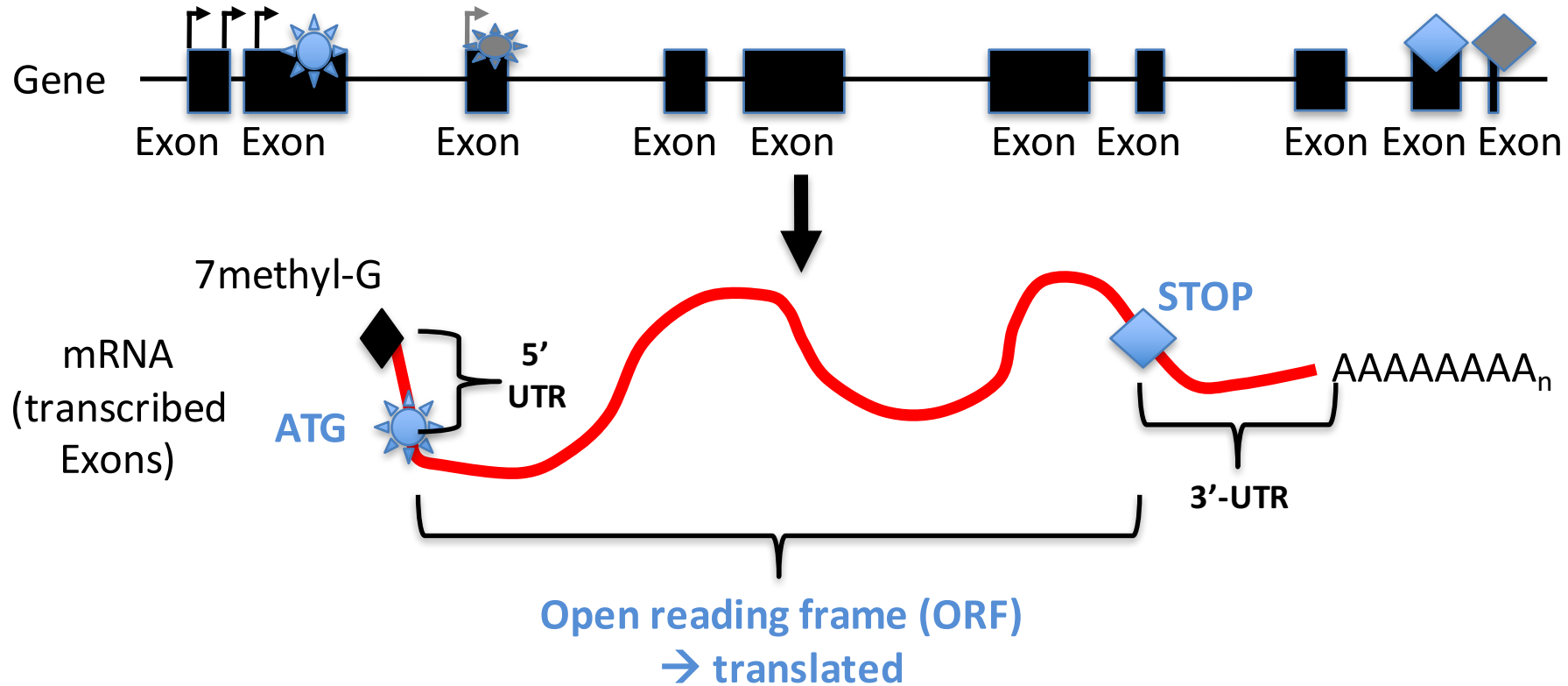


Figure 6-37. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- poli-A polimerasi aggiunge ca. 200 adenine all'estremità 3' dell'RNA (template independent!!!!)
- Export to cytoplasm



Structure of eucaryotic *mRNA* s (after splicing)



- *5'-UTRs and 3'-UTRs are regulatory sequences located in EXONS*
- *Genes can contain multiple transcriptional start sites*
- *Genes can contain multiple transcriptional stop sites*
- *Genes can contain multiple translational start/stop sites*
- *Genes can perform alternative **splicing** to generate mRNAs with different exon combinations*

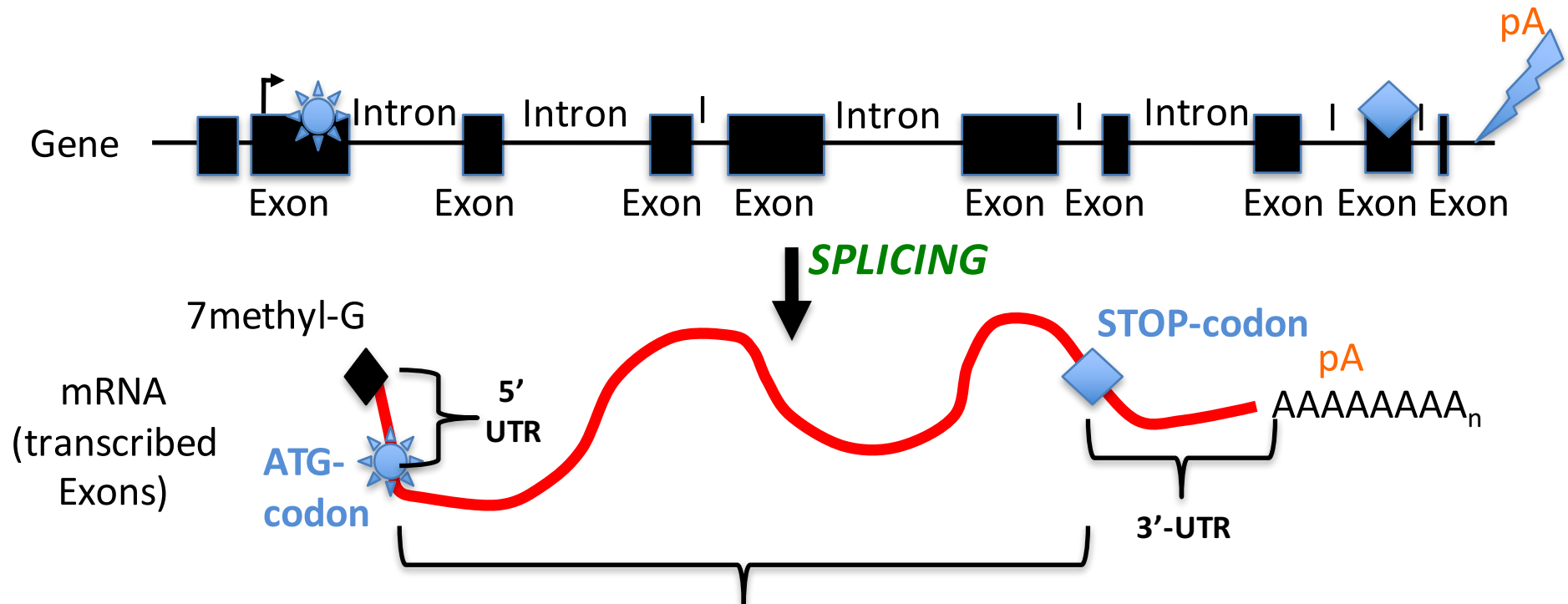
La maturazione ed il processamento dell' RNA

1. Capping

2. Poliadenilazione

3. Splicing

La maturazione ed il processamento dell' RNA

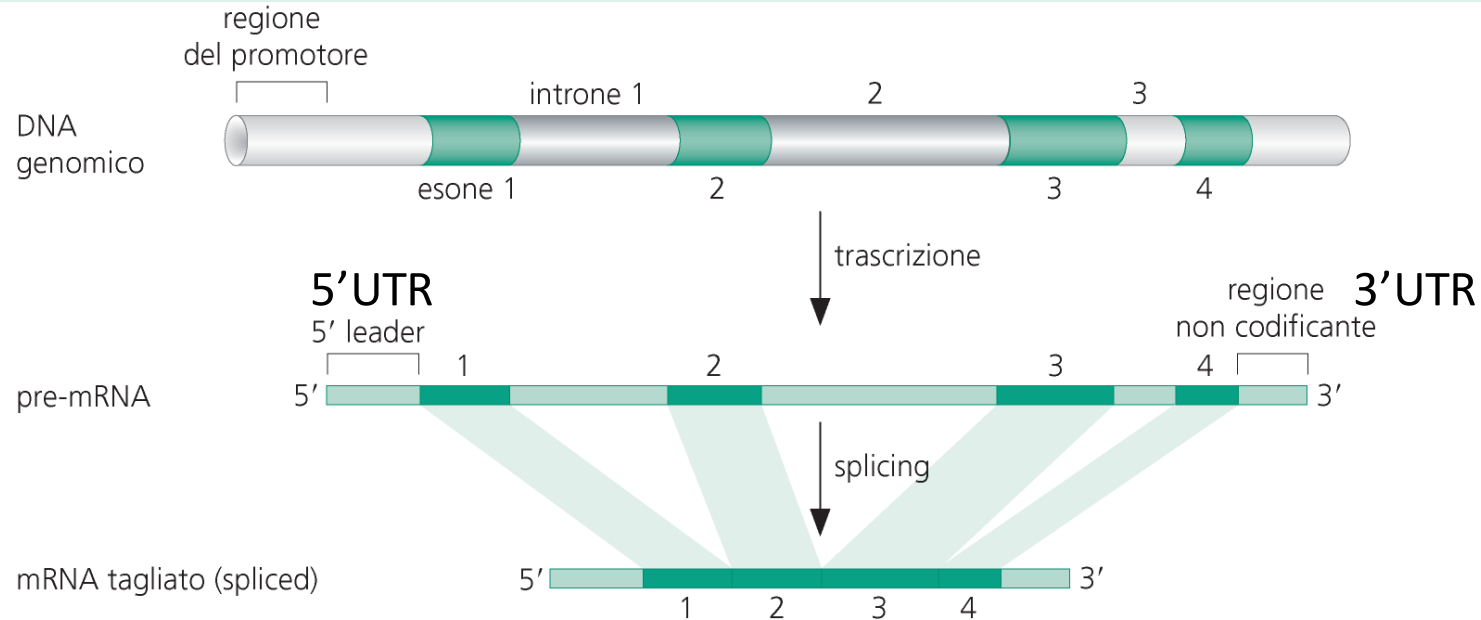


Open reading frame (ORF)

Consists of 1 ore more exons that encode codon triplets for translation

Nobel Prize: 1993: Richard J. Roberts and Phillip A. Sharp

Lo splicing dell' RNA

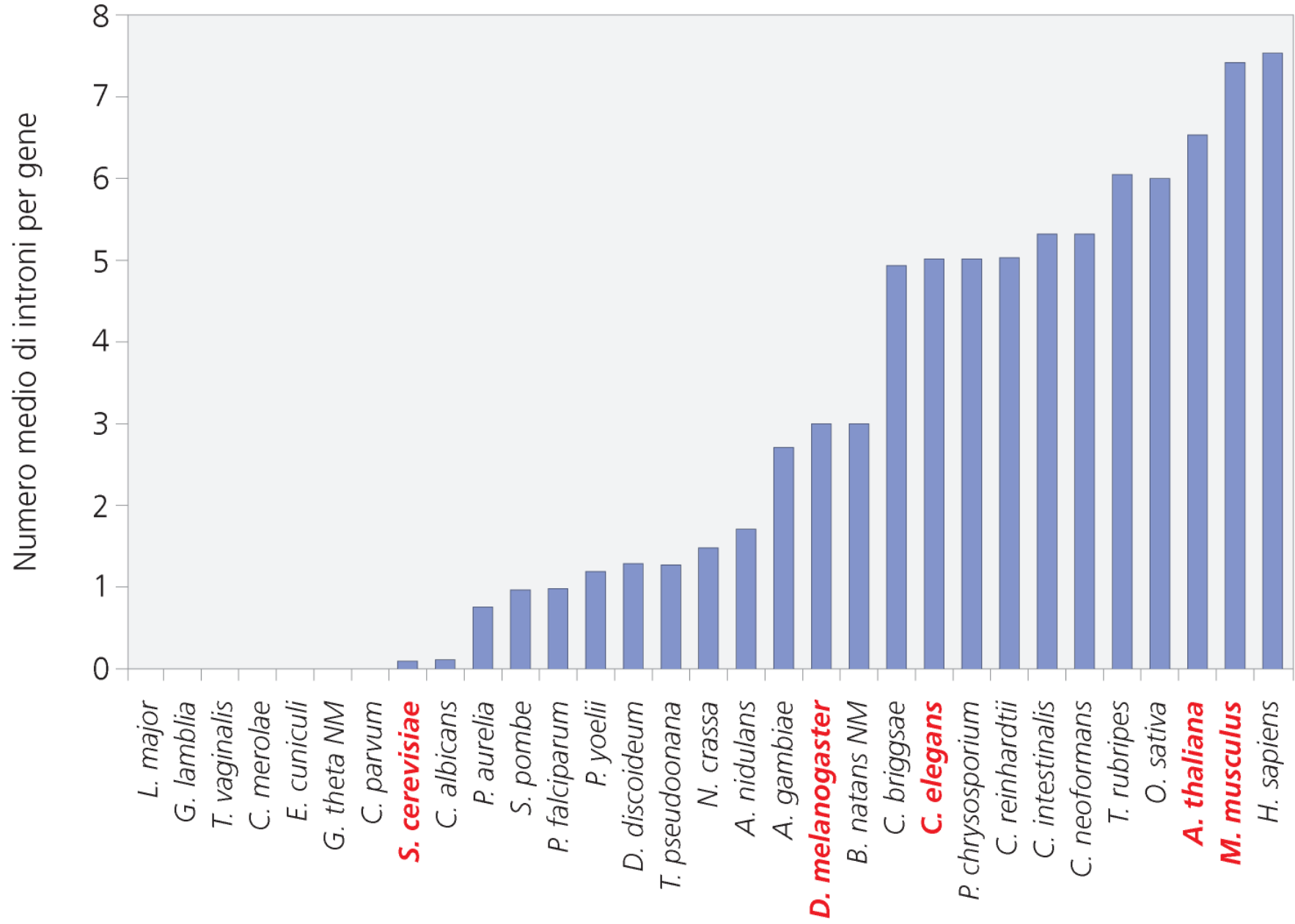


Facts:

- Genes can have 0 – hundreds of introns (human Titin gene: 363 introns)
- In general exons are short; introns much longer (- 800kb)
- Human diidrofolate gene: 31kb primary transcript – 2 kb Exons
- Intron number increase with organismal complexity
- Exons can be re-shuffled: 1 gene encodes for many proteins (D. melanogaster: 38000 different gene products)

UTR: untranslated regions.

Intron – number increases with organismal complexity

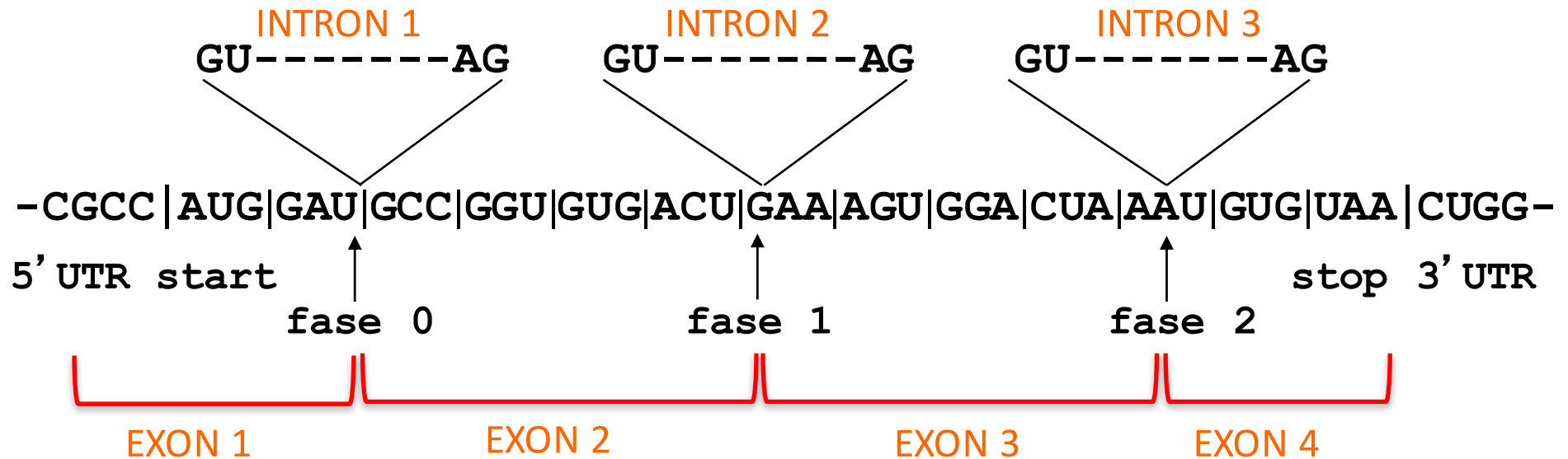


Introns are much longer than exons

Table 1: Distributions of exons and introns in the human genome.

Chromosome #	# exons	# CDS	# Exons/CDS	Total length			Chr size	Percentage chromosome coverage		
				Exon	Intron	Intergenic		Exon	Intron	Intergenic
1	23142	2638	8.77	3875221	98581047	133648421	226828929	1.7%	43.5%	58.9%
2	17996	1854	9.71	3149964	92858836	156883277	238349289	1.3%	39.0%	65.8%
3	13885	1472	9.43	2293750	80024879	126803820	195073306	1.2%	41.0%	65.0%
4	8696	984	8.84	1521583	54556782	130957378	187239983	0.8%	29.1%	69.9%
5	10270	1253	8.19	1933044	65819403	120455397	177696509	1.1%	37.0%	67.8%
6	11599	1311	8.85	1993015	62095322	111732660	169212327	1.2%	36.7%	66.0%
7	23482	2782	8.44	3992669	146636300	191048387	310210944	1.3%	47.3%	61.6%
8	8241	954	8.64	1463965	52160535	99345053	143297300	1.0%	36.4%	69.3%
9	9182	1092	8.41	1562214	43699083	74393969	117790386	1.3%	37.1%	63.2%
10	10534	1068	9.86	1632399	60701092	80144146	132016990	1.2%	46.0%	60.7%
11	12951	1626	7.96	2284232	50164599	81679898	130908954	1.7%	38.3%	62.4%
12	12580	1344	9.36	1981954	51916604	84057127	129826379	1.5%	40.0%	64.7%
13	3945	464	8.50	727009	25822933	70677638	95749578	0.8%	27.0%	73.8%
14	6899	1088	6.34	1287718	35976339	59707457	87191216	1.5%	41.3%	68.5%
15	8375	893	9.37	1423397	35284829	51259381	81992482	1.7%	43.0%	62.5%
16	10284	1163	8.84	1729490	34244476	49598682	79932432	2.2%	42.8%	62.1%
17	14185	1524	9.31	2333931	40538632	44058568	79376966	2.9%	51.1%	55.5%
18	3464	389	8.90	600558	24659491	53390676	74658403	0.8%	33.0%	71.5%
19	12726	1697	7.49	2382645	22829029	32919221	55878340	4.3%	40.9%	58.9%
20	6814	837	8.14	1091177	26355258	39539865	59424990	1.8%	44.4%	66.5%
21	2732	354	7.71	465274	12250680	24664020	33924367	1.4%	36.1%	72.7%
22	5186	736	7.04	906427	17831000	20156815	34352072	2.6%	51.9%	58.7%
X	8743	1089	8.02	1619151	58326743	106478054	152118949	1.1%	38.3%	70.0%
Y	654	93	7.03	114107	2947229	19003795	24649555	0.5%	12.0%	77.1%
Total	246565	28705	8.59				3017700646			

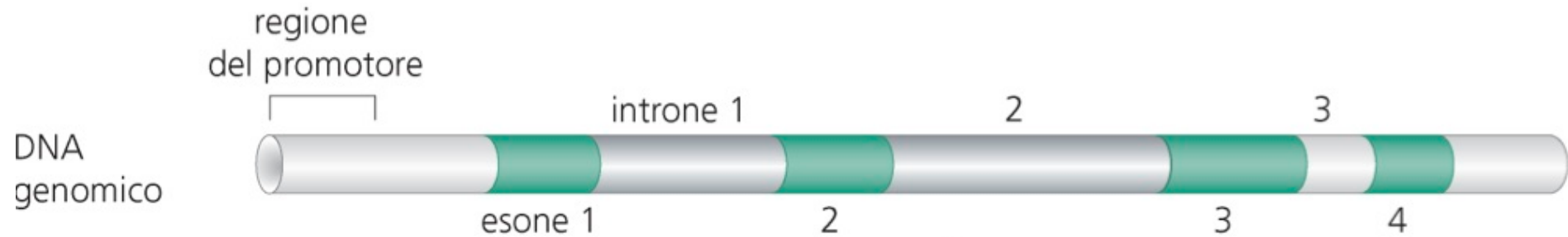
Splicing e presico



Nonostante alcuni introni possono essere posizionati nel segmento 5' UTR o nel segmento 3' UTR, in genere essi si trovano nell'interno della sequenza codificante o **CDS** (coding determining sequence) costituita dalle triplette codoniche. Essi possono quindi separare esattamente un codone dal successivo (**fase 0**), o situarsi all'interno di un codone, separando il primo nucleotide dagli altri due (**fase 1**) o i primi due dal terzo (**fase 2**). Si osservano tutti e tre i casi, più spesso in fase 0 (circa 50% dei casi), poi in fase 1 (circa 30%), meno spesso in fase 2 (circa 20%).

La fase degli introni riveste importanza nei fenomeni di splicing alternativo, dove deve essere coerente per non causare la perdita della cornice di lettura corretta.

HOW DOES SPLICING WORK??

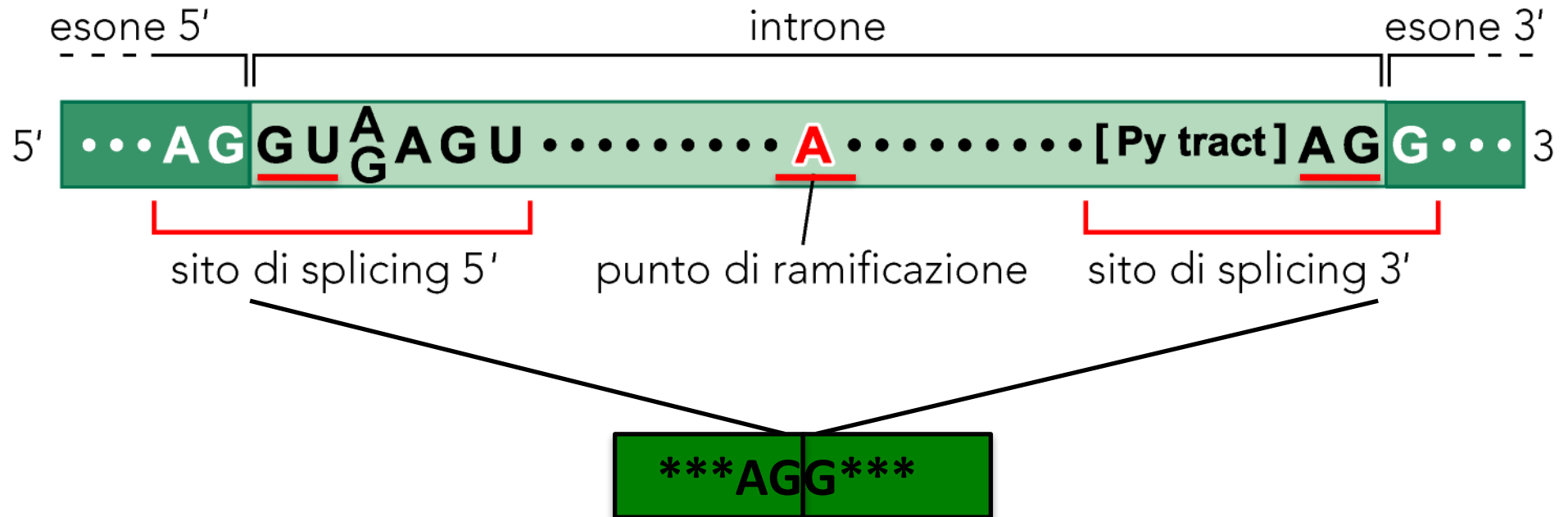


Lets brake up the problem:

- 1. Come vengono distinto essoni dagli introni?***
- 2. Come vengono untiti i essoni in modo preciso?***
- 3. In che ordine vengono untiti l essoni?***

Sequenze consenso per gli introni

THE GU-AG rule



→ Sito di splicing 5' or sito donatore (5' splice site, splice donor site)

→ Sito di splicing 3' or sito accettore (3' splice site, splice acceptor site)

→ Punto di ramification (branch point site)

— → present in ALL introns, exonic splice site sequences are more variable

→ GU-AG rule defines intron boundaries

The GU-AG rule

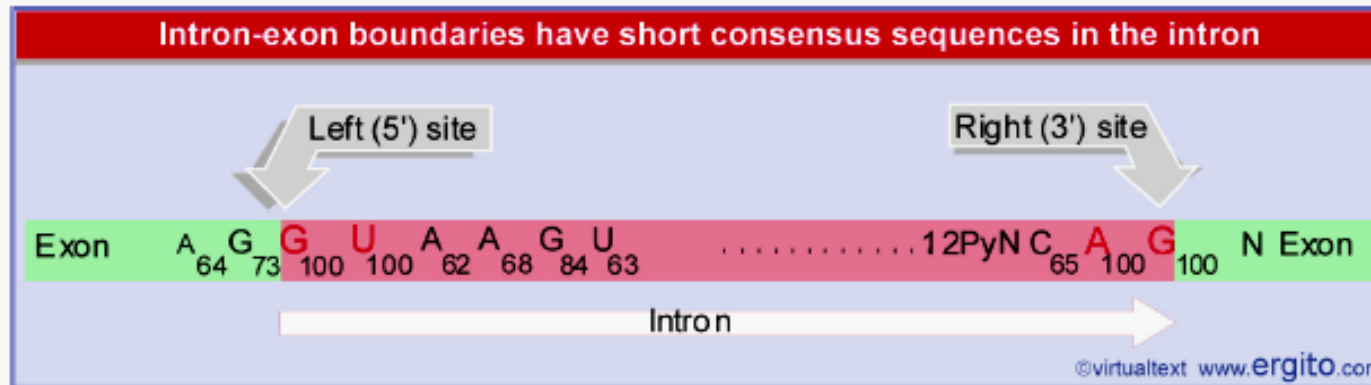
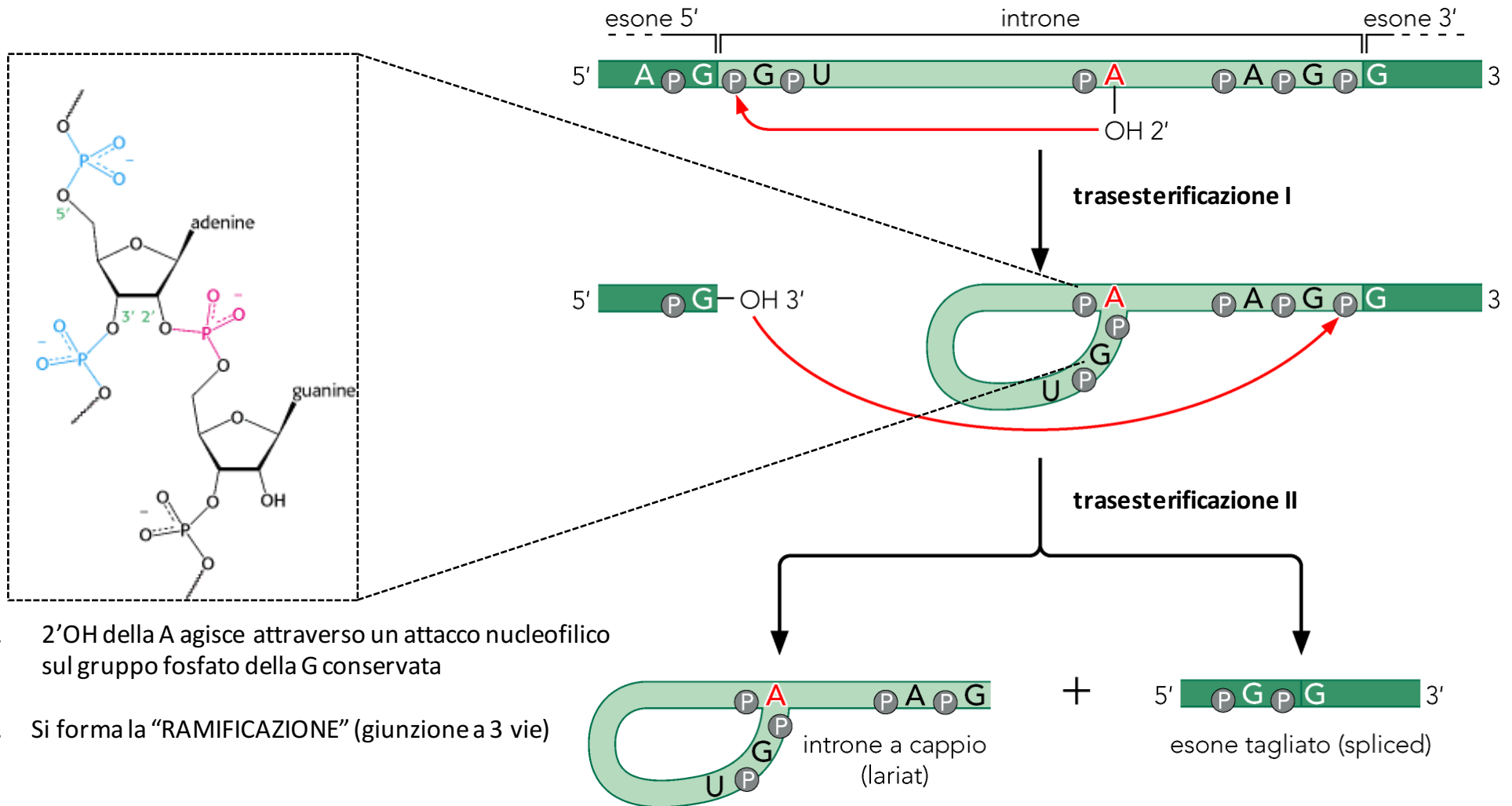


Figure 24.3 The ends of nuclear introns are defined by the GU-AG rule.

- Un'alta conservazione si trova solo immediatamente all'interno degli introni alle giunzioni presunte. Questo identifica la sequenze di un introne generico come **la regola : GU##AG:** o **GT-AG.**
- I due siti hanno sequenze diverse e definiscono la terminazione degli introni direzionalmente .

Il meccanismo dello splicing



1. 2'OH della A agisce attraverso un attacco nucleofilo sul gruppo fosfato della G conservata
2. Si forma la "RAMIFICAZIONE" (giunzione a 3 vie)
3. Essone G-3'OH (donor) agisce attraverso un attacco nucleofilo sul gruppo fosfato dell introne G (acceptor)
4. No ATP investment !!!

Definition of the branch point site

- Il branch point site nei **lieviti** è conservato ed la sequenza **consenso** è **UACUAAC..**
- Il branch site si trova **18-40 nucleotidi a monte del 3' splice site.**
- gli eucarioti superiori hanno sequenze correlate (cryptic sites)
- Il ruolo del branch site è di identificare il 3' più vicino come bersaglio per collegarlo al 5' splice site

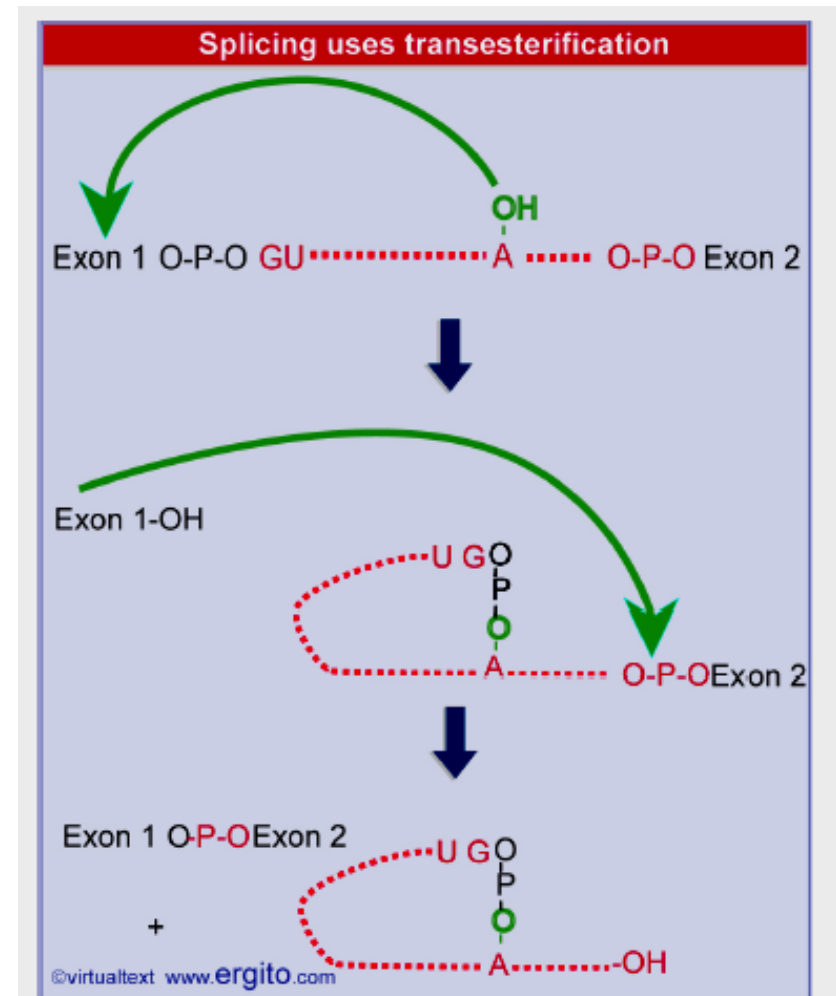


Figure 24.7 Nuclear splicing occurs by two transesterification reactions in which an OH group attacks a phosphodiester bond.

Il macchinario dello spliceosoma

-splicing in vivo-

Complesso costituito da 150 proteine e 5 ncRNAs, consuma ATP!!

Componenti ncRNAs: snRNAs (200-300 nt)

= piccoli RNA nucleari

= small nuclear RNAs

“U1, U2, U4, U5, U6 snRNA”

snRNAs formano complesso con proteine

= piccole ribonucleoproteine nucleare

= small nuclear ribonuclear proteins

= **snRNPs**

Le snRNPs coinvolte nello splicing sono **U1, U2, U5, U4 e U6 snRNPs.**

Ogni snRNP contiene un solo snRNA e alcune (<20) proteine.

Un nucleo strutturale comune per ogni snRNP consiste in un gruppo di 8 proteine.

spliceosoma

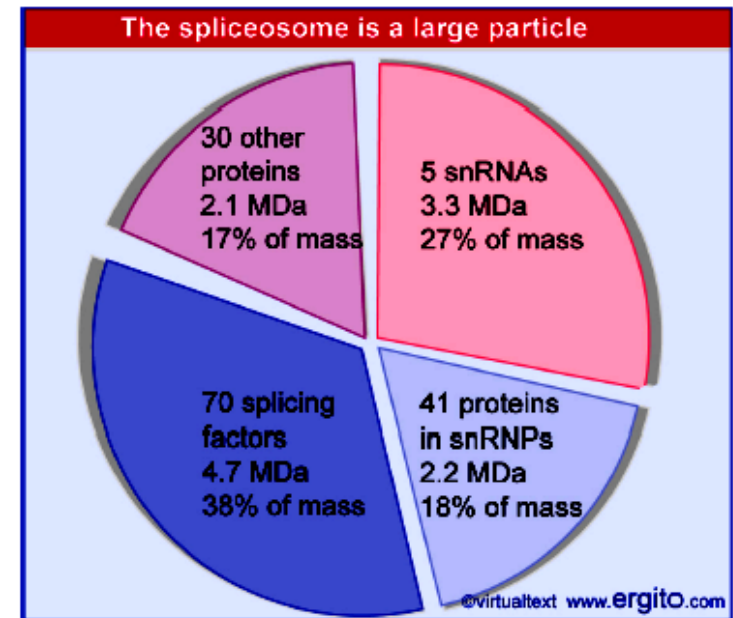
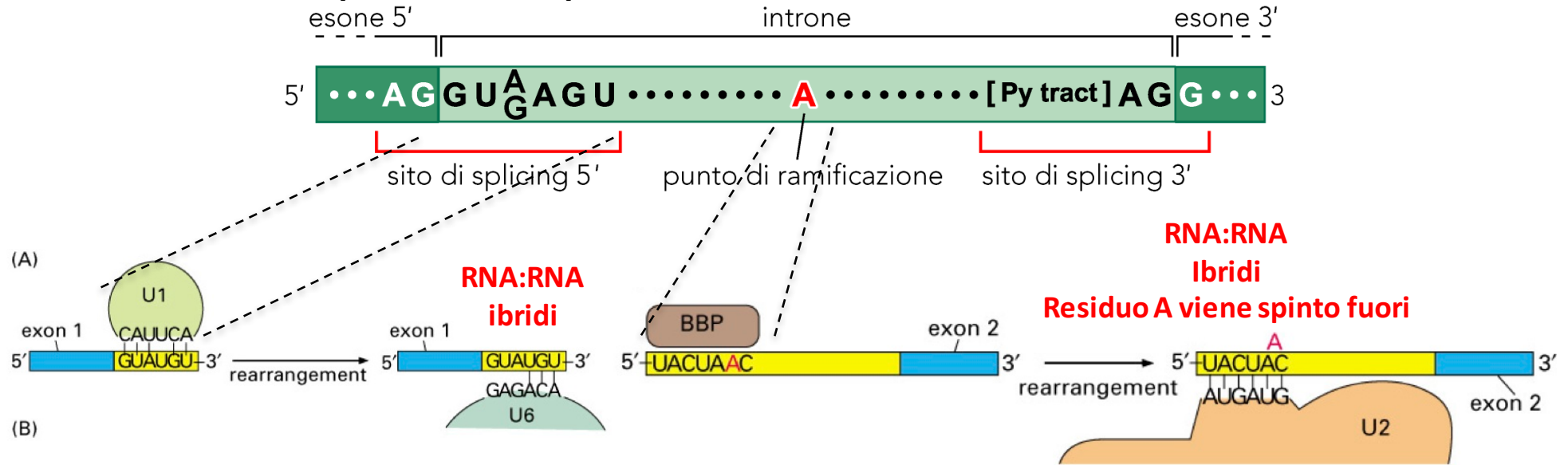


Figure 24.8 The spliceosome is ~12 MDa. 5 snRNAs account for almost half of the mass. The remaining proteins include known splicing factors and also proteins that are involved in other stages of gene expression.

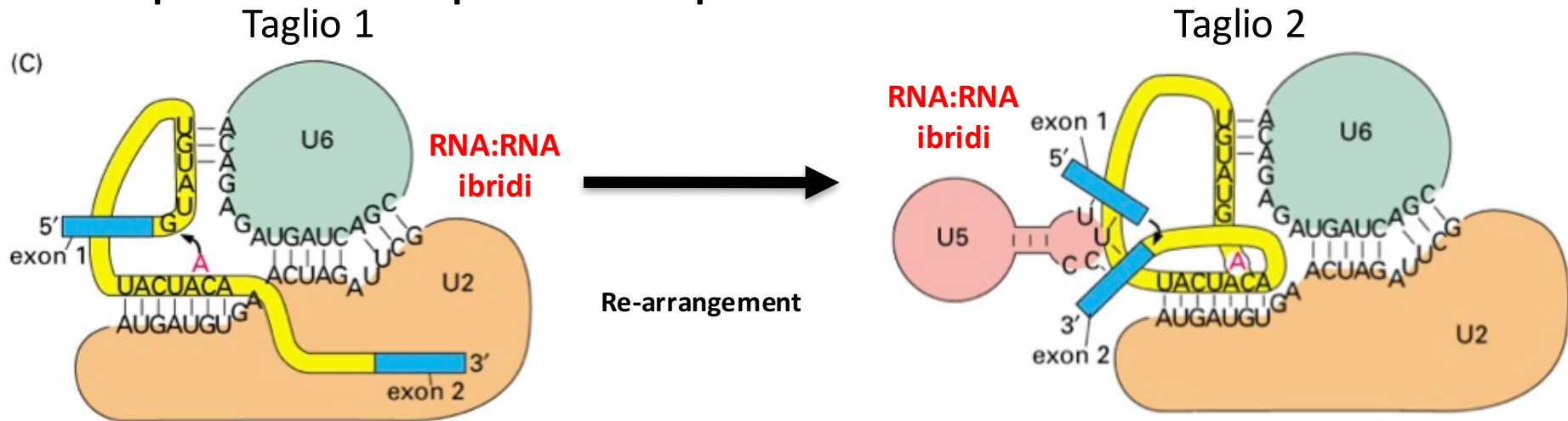
Riarrangiamenti e catalisi all'interno dello splicosoma

yeast

1. Riconoscimento splice donor e punto di ramificazione

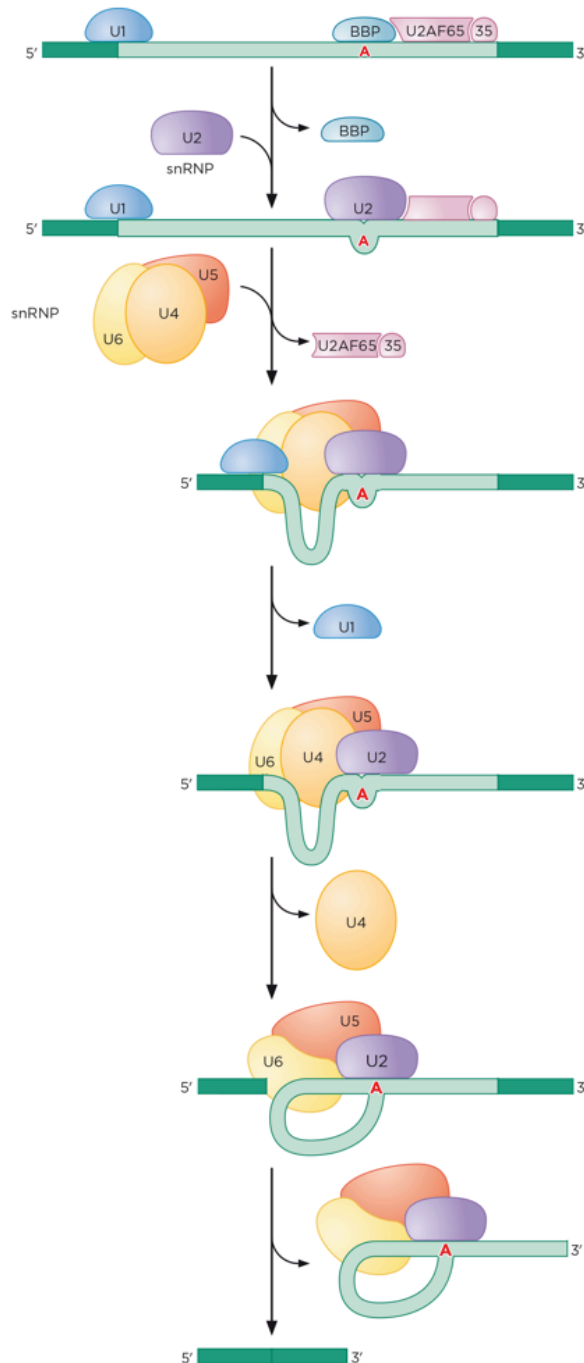


2. snRNPs portano vicino splice donor e punto di ramificazione



3. snRNPs catalizzano il taglio e la giunzione dell'RNA

Le vie dello splicing: CANNONICAL SPLICING



E: *early complex*:

U1 snRNP riconosce splice-donor (RNA:RNA ibiridi)

U2AF subunits si legano al Py-track (65) e splice acceptor (35)

BBP si lega al branch point e interagisce con U2AF65

A: *complex A*:

U2 snRNP riconosce branch point site (RNA:RNA ibiridi e aiuto da U2AF); BBP va via

Presentazione del A per nucleophilic attack

B: *complex B*:

U4, U5, U6 snRNPs si uniscono al complesso

U1 snRNPs esce e U6 snRNP lo rimpiazza

U2AF esce dal complesso

C: *complex C*:

Riarrangiamento innesca la catalisi:

U4 snRNPs esce, permettendo la interazione tra U2 ed U6 snRNP

Formazione del sito attivo

Transesterificazione I: branch site point – splice donor

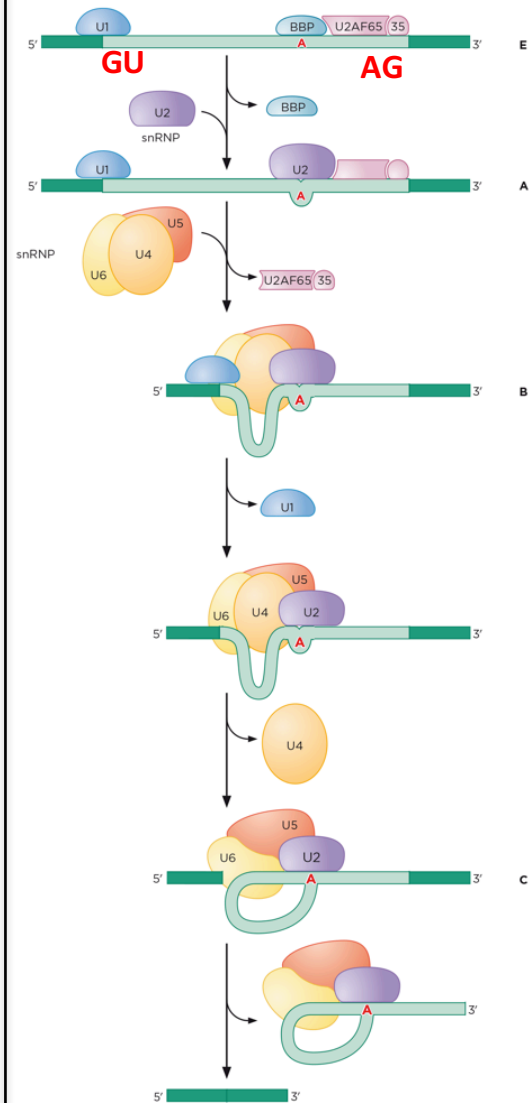
Transesterificazione II: U5 snRNP supporta ligazione splice donor

c Splice acceptor

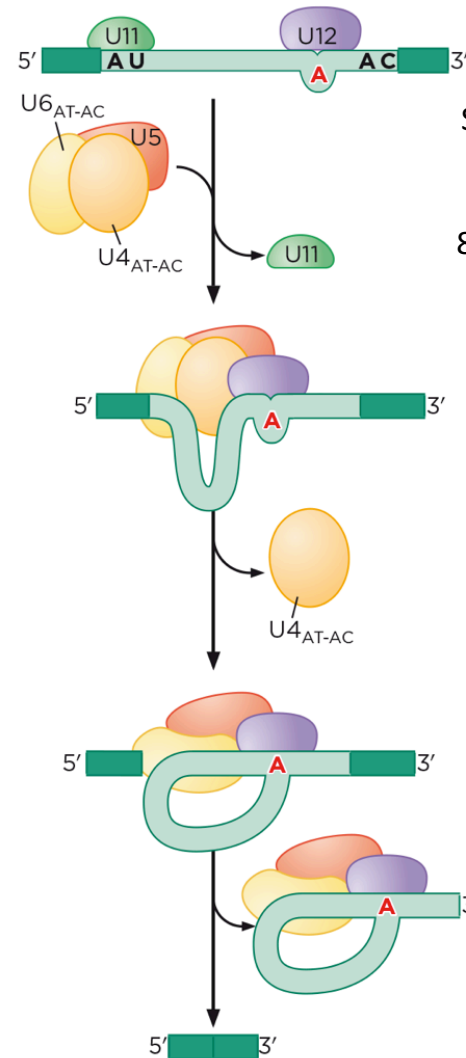
Splicosome disassembly and exit of RNA is supported by RNA helicases

2 tipi di splicosome

Splicosoma maggiore (major Spliceosome)



Splicosoma minore (minor spliceosome)



Sequence di riconoscimento diverse
Costituenti diversi
800 geni umano contengono minor introns

Mechanismo conservato

Self-splicing introns: autocatalytic splicing

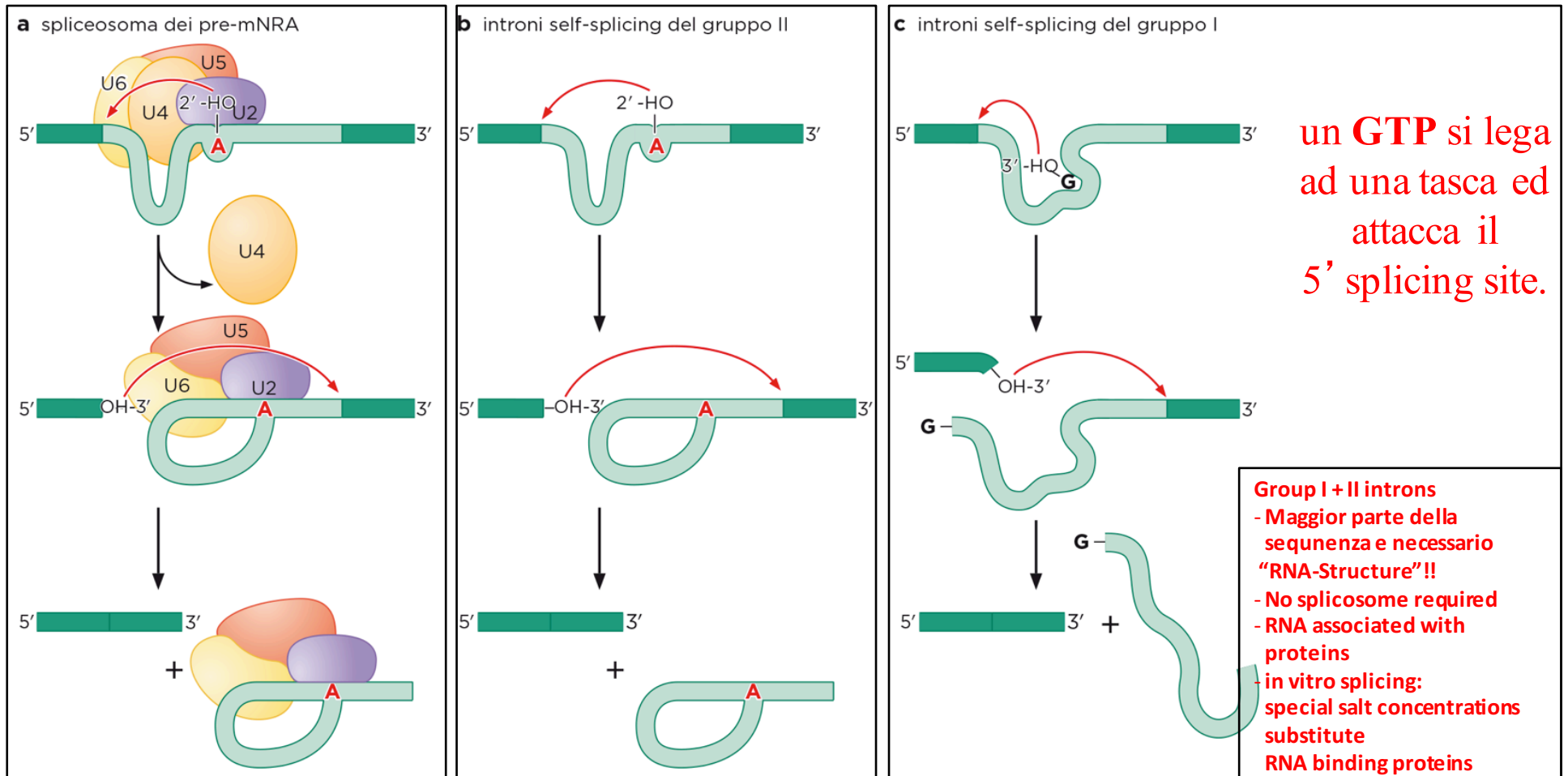


TABELLA 14.1 Le tre classi dello splicing dell'RNA

Classe	Diffusione	Meccanismo	Macchinario catalitico
Pre-mRNA nucleari	Molto comuni; si trovano nella 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 (ribozima)
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

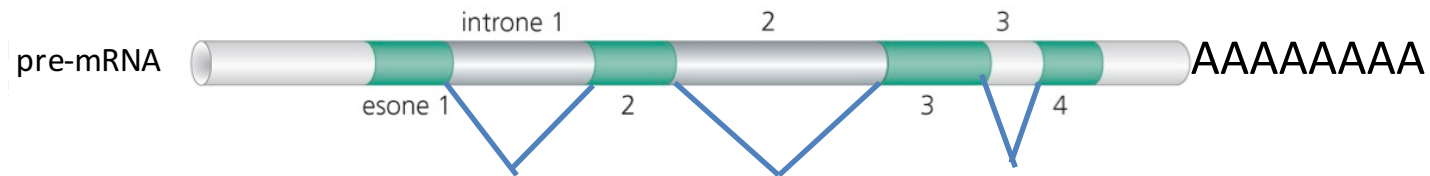
Long!!!

400-1000 nt

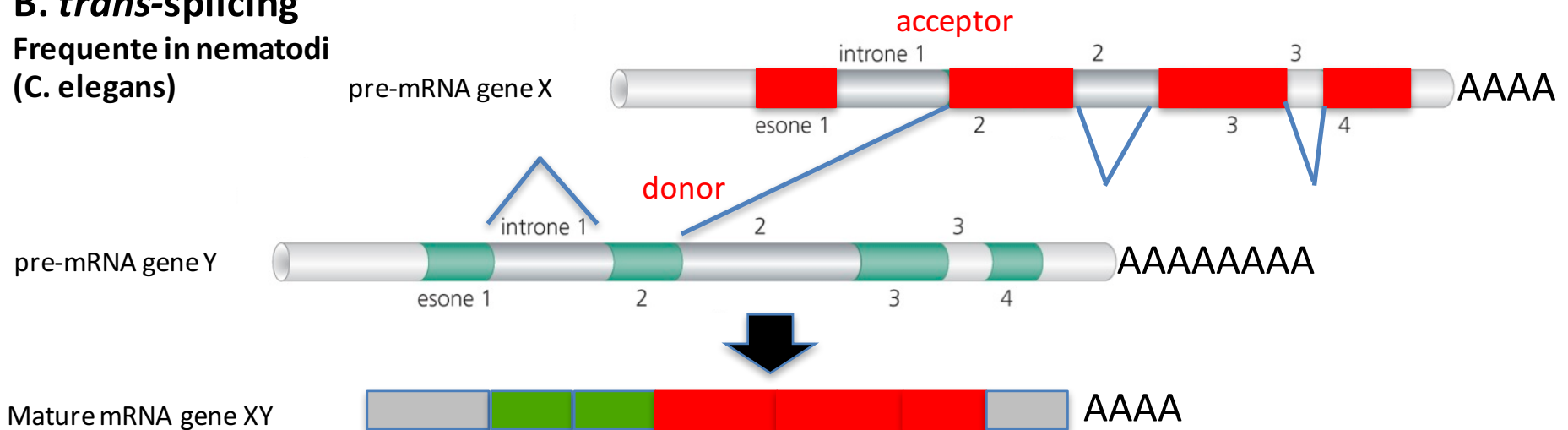
400-1000 nt

Principali varianti di Splicing

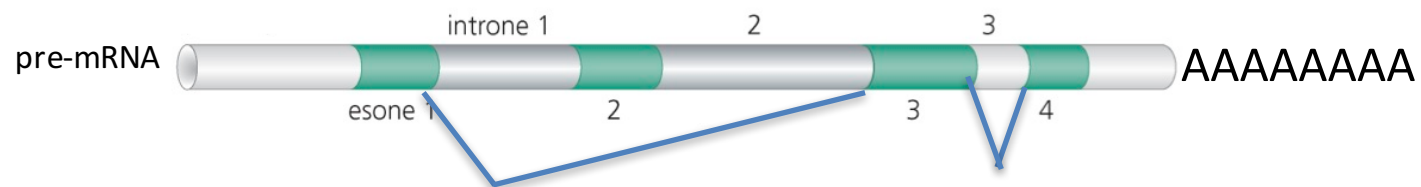
A. Classic splicing *in cis*



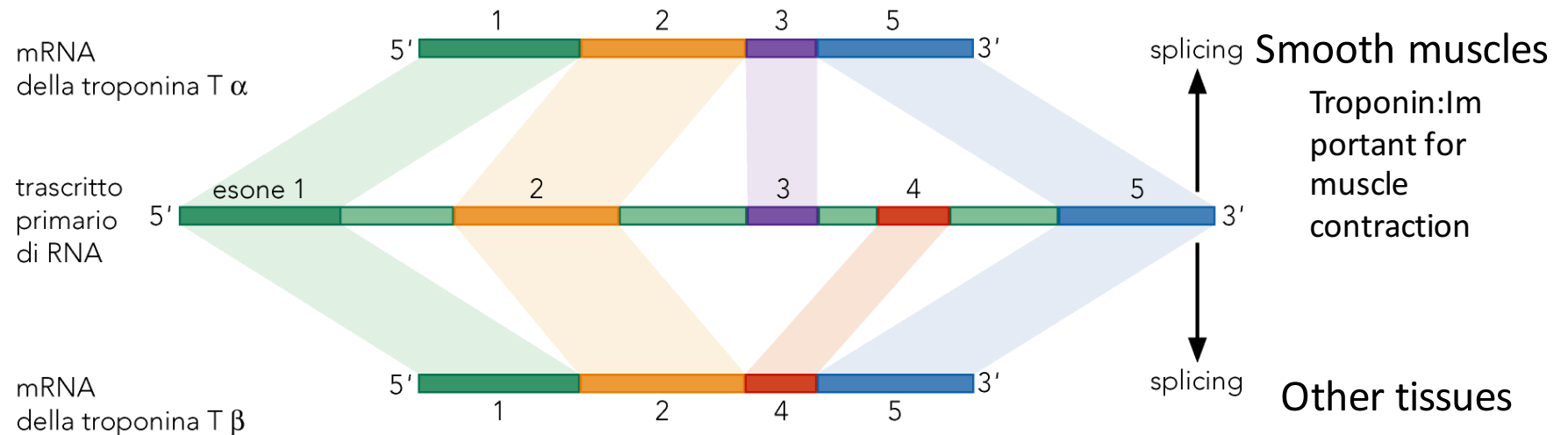
B. *trans*-splicing Frequente in nematodi (*C. elegans*)



C. Alternative splicing



Splicing alternativo – Alternative Splicing



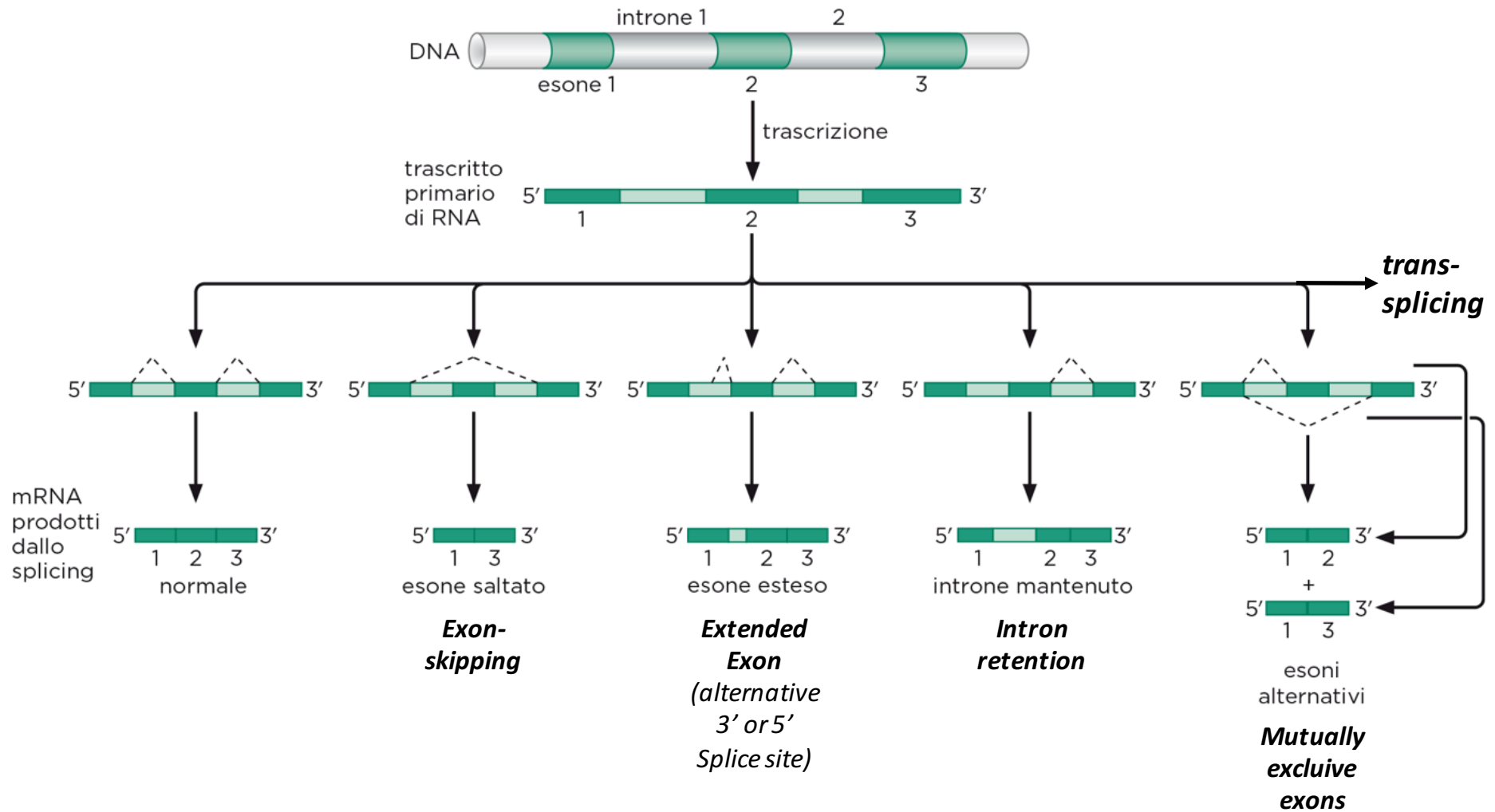
- Il gene troponina T dà luogo a due forme con due esoni diversi: o il 3 o il 4
- In genere le alternative possono essere **costitutive** o **regolate**

Relevance of alternative splicing:

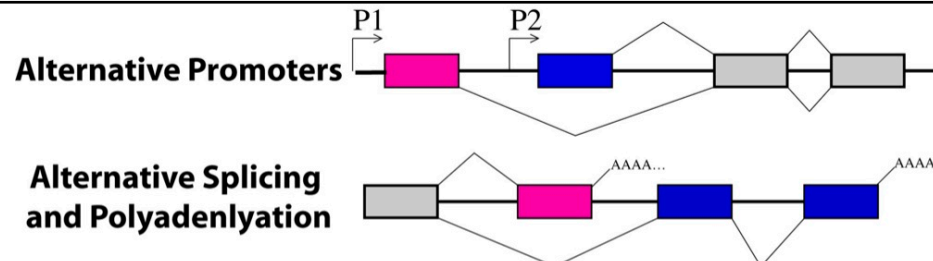
- 90% of human genes encode splicing variants
- 40% of drosophila genes encode splicing variants
- 1 – 38000 splicing variants per gene reported

INCREASE OF GENETIC COMPLEXITY

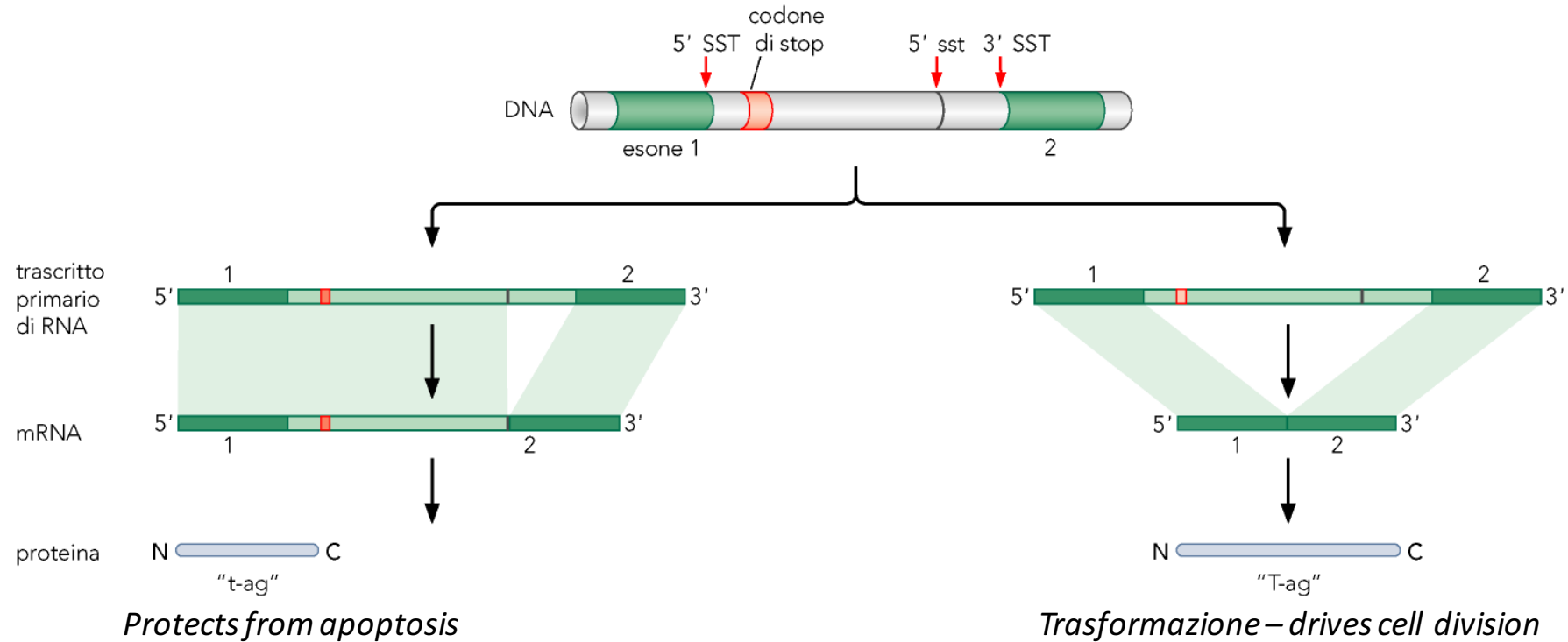
5 modi di processare un RNA



Additional ways to obtain transcript variants with different exon content



Esempio di Splicing alternativo – Il virus di scimmia SV40



L' antigene T del virus della scimmia SV40 ha due 5' splicing site alternativi (5' SST e 5' sst).

5' sst da luogo a un trascritto più lungo con uno stop codon (t-antigen)

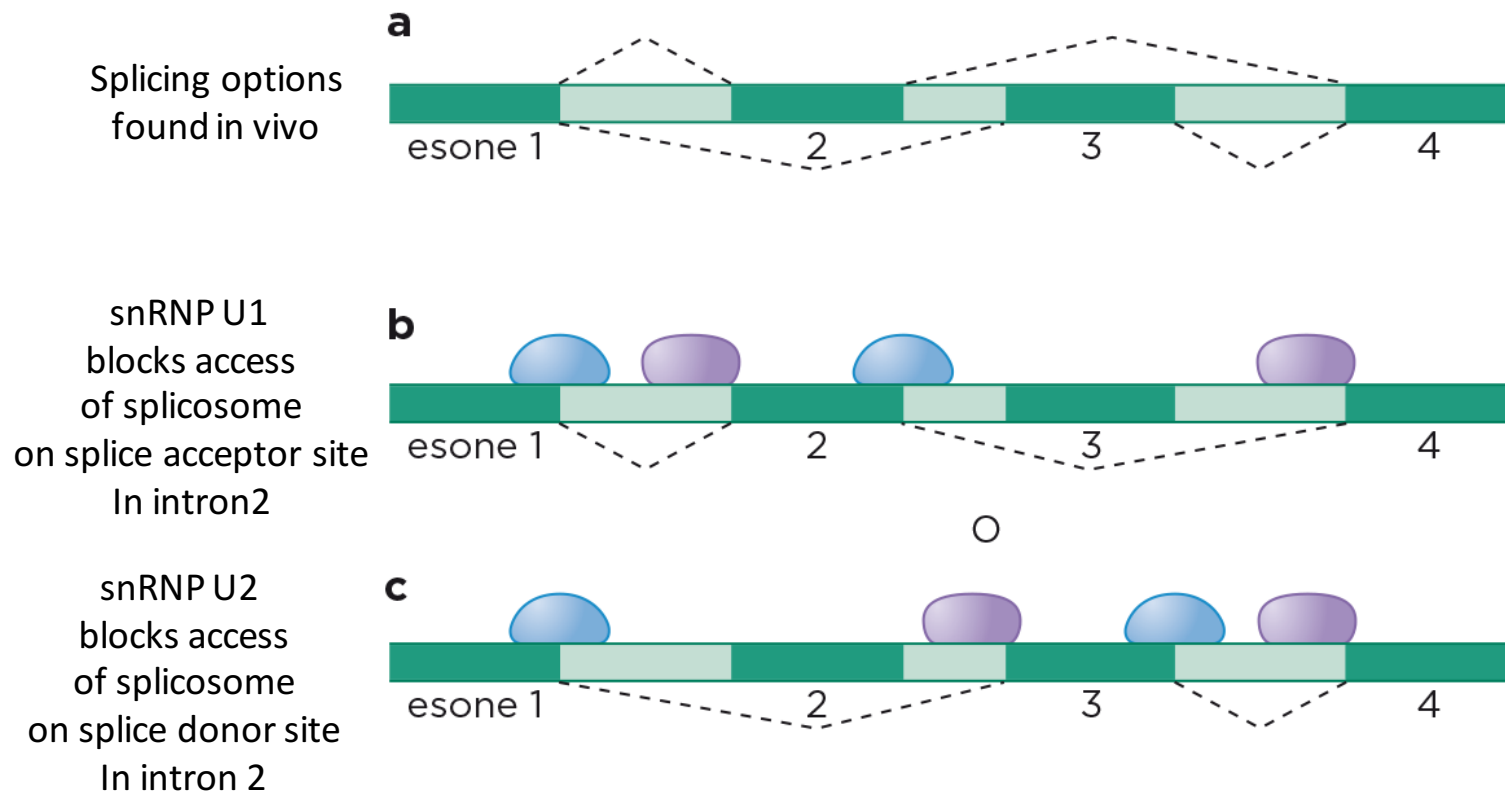
5' SST and un trascritto più corto e peptide più lungo (T-ag)

Il rapporto tra i due è regolato dai livelli della proteina di splicing SF2/ASF → livello alto

SF2/ASF: 5' SST usage → piu t-ag mRNA (si lega al 3' exon e aiuta assemblaggio del splicosoma)

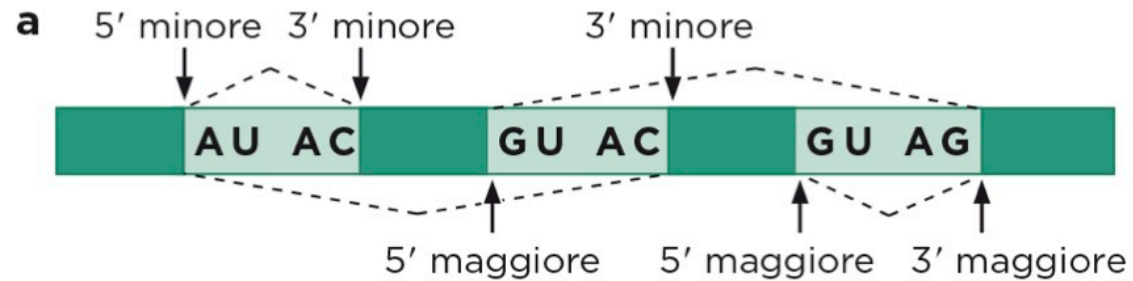
Meccanismi per garantire uno splicing mutualmente esclusivo I

L'ingombro sterico – sterical hindrance

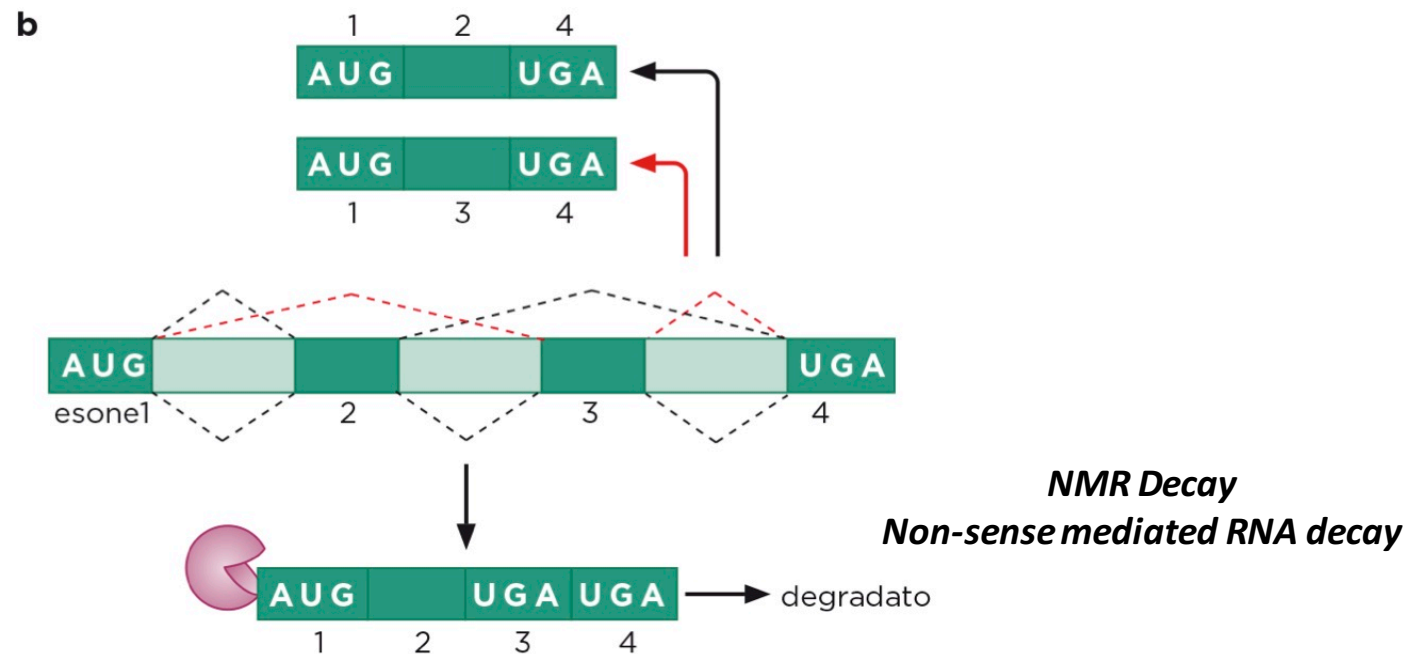


Meccanismi per garantire uno splicing mutualmente esclusivo II + III

Combinazione major and minor spliceosome introns



Decadimento mediata da un codone nonsense "anticipato"



Esempio di splicing alternativo regolato

Activators and repressors can regulate exon usage:

RNA sites bound by splicing regulators are called: ^a

ESE: exonic splicing enhancer

ESS: exonic splicing silencer

ISE: intronic splicing enhancer

ISS: intronic splicing enhancer

Examples for splicing regulators:

SR Protein:



RRM domain

RS domain

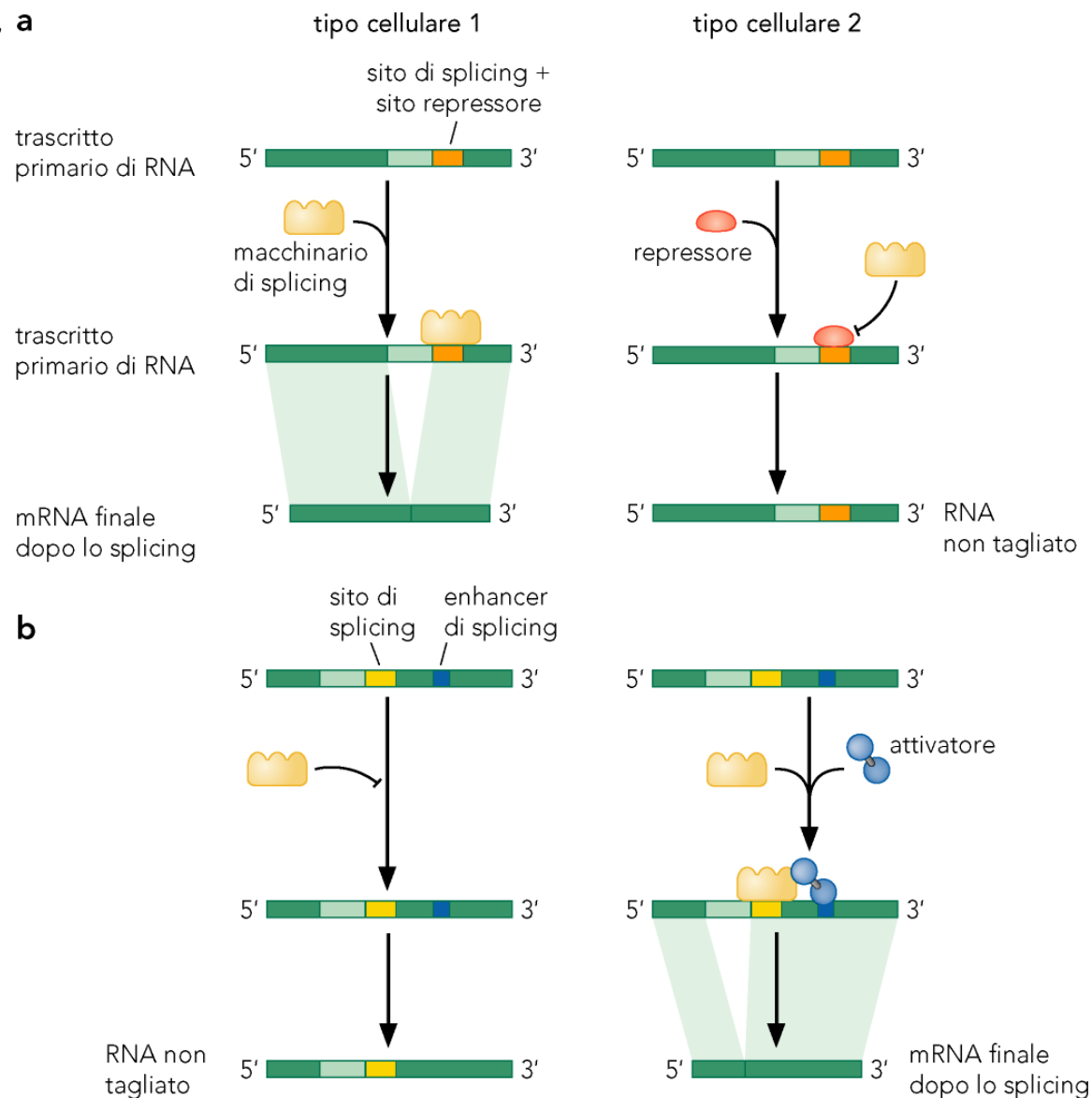
Binds ESE/ISE

Recruits splicosome

hnRNPs:

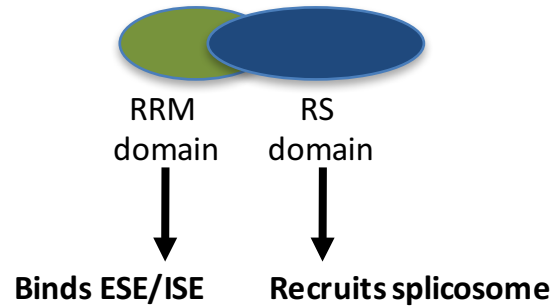
Recruit splicosome or

Block splicing sites



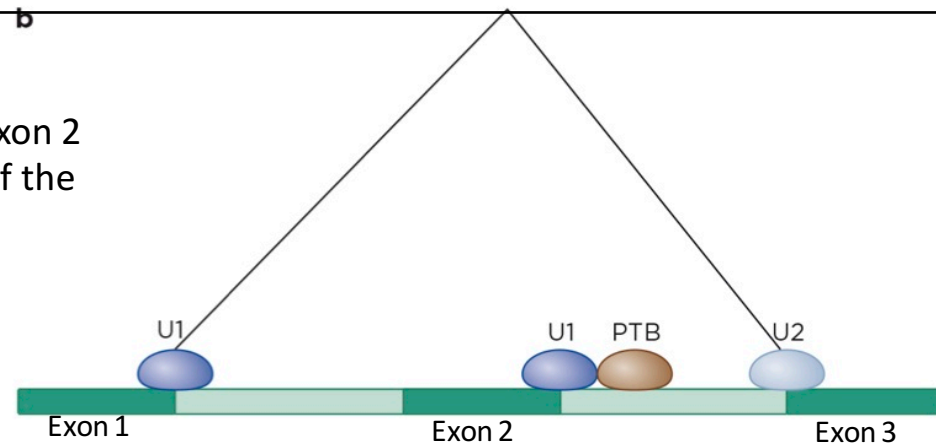
Esempio di splicing alternativo regolato

SR Protein:



PTB:

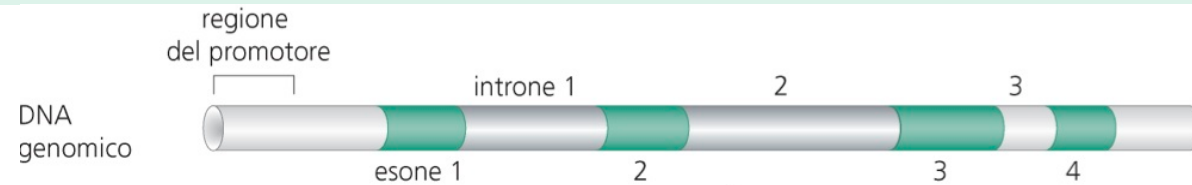
- Binds to intron sequence downstream of exon 2
- Interacts with U1 and blocks the assembly of the Splicosome
- Splice donor of intron2 is inactive
- upstream exon 2 will be skipped



hnRNPs:

- Recruit splicosome or
- Block splicing sites

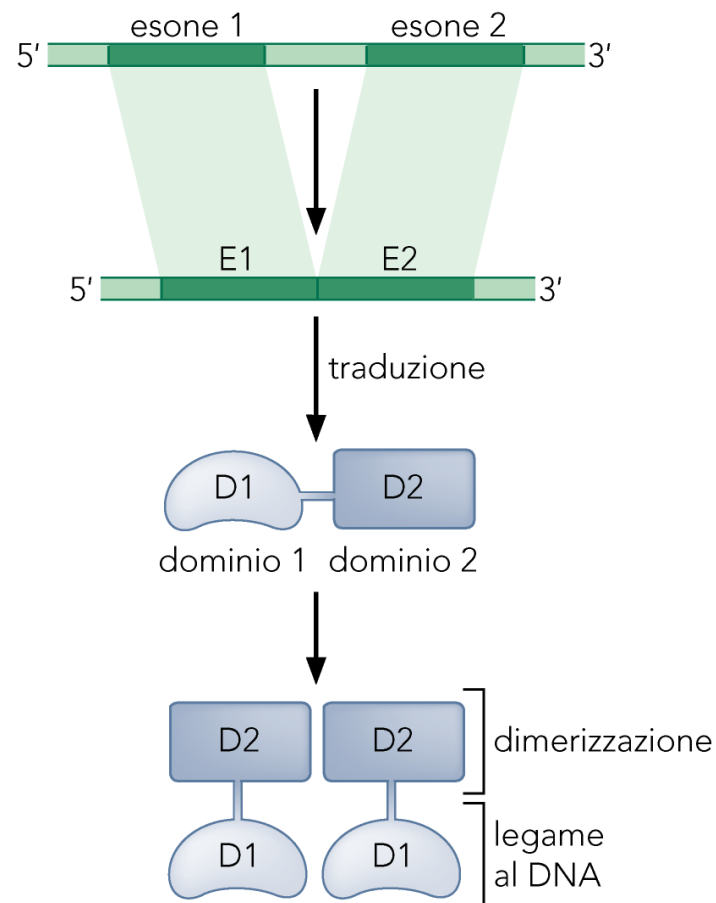
Vantaggi degli exoni



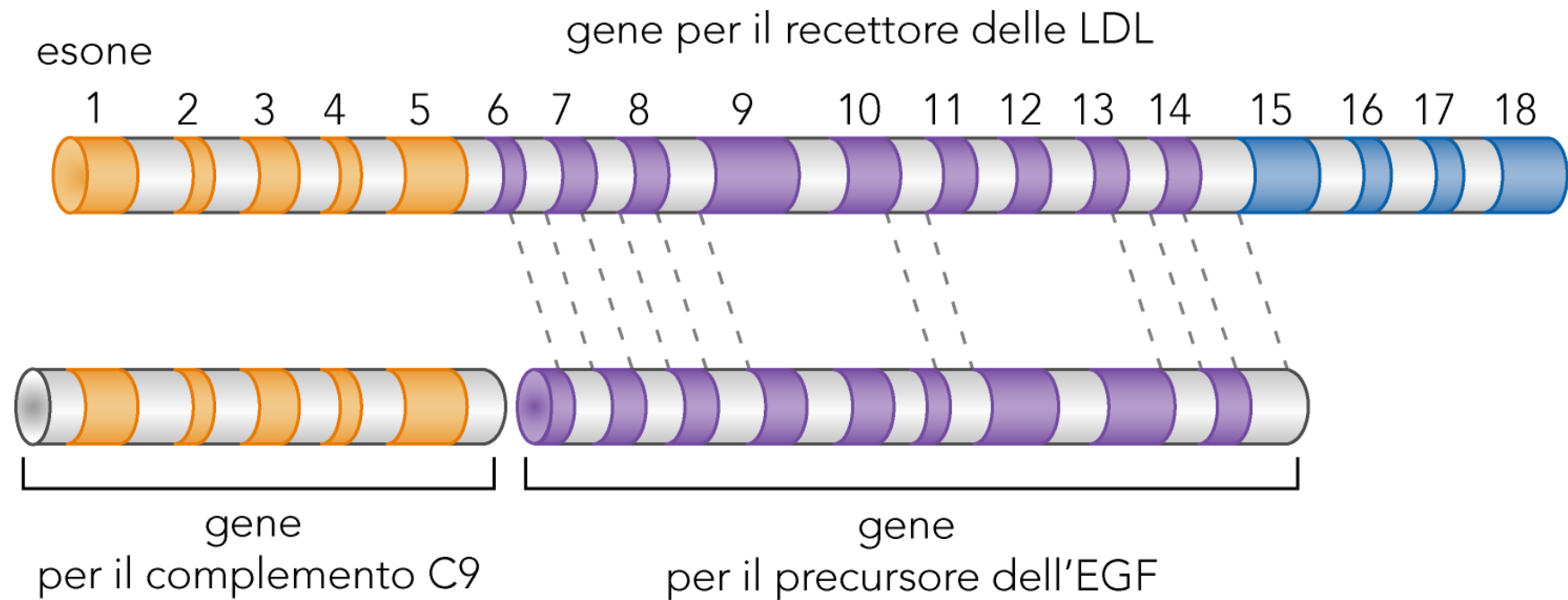
1) possibilità di generare prodotti proteici multipli attraverso lo splicing

2) Creazione di nuovi geni attraverso il rimescolamento degli esoni.

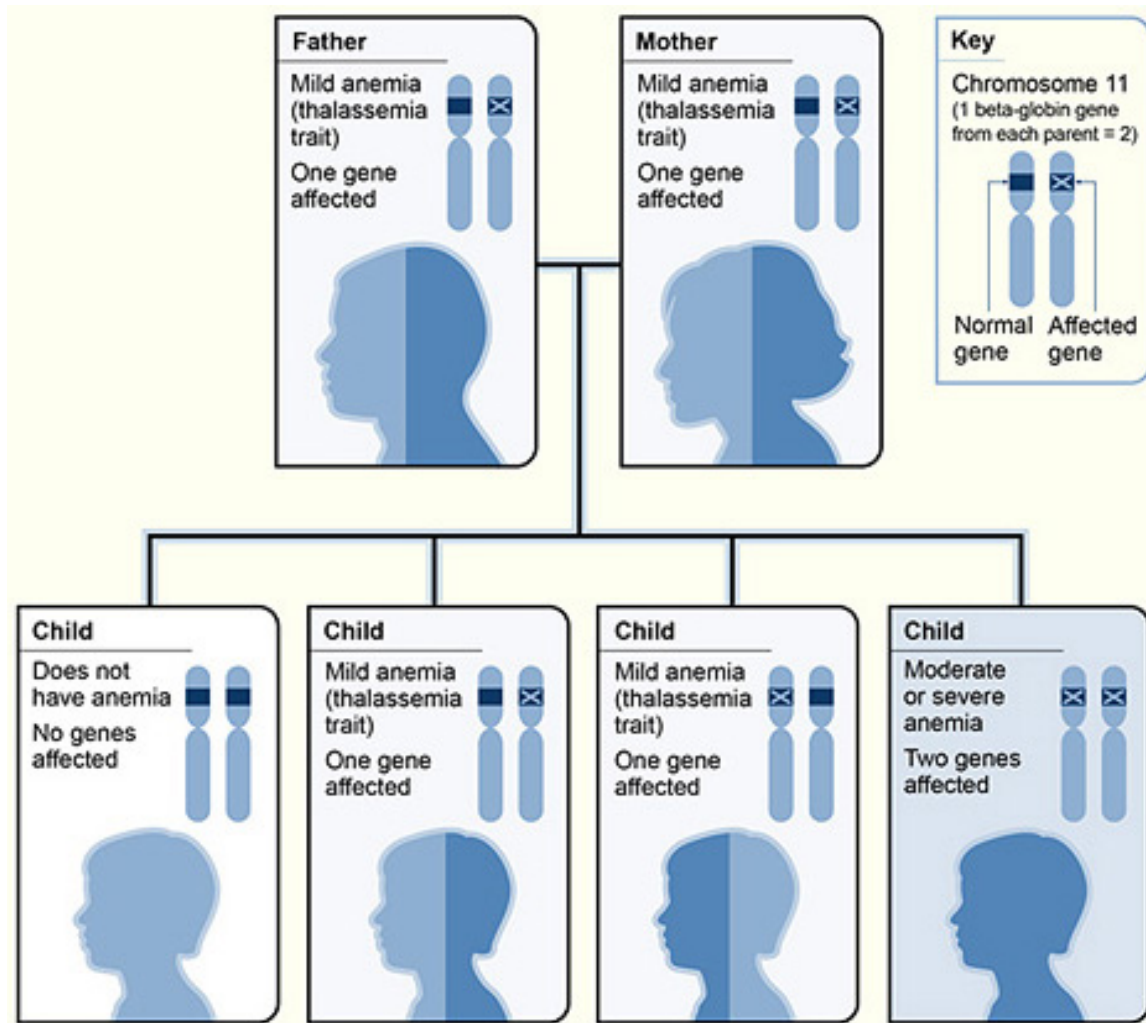
- Spesso gli esoni codificano domini strutturali con funzioni distinte.
- Molti geni si sono evoluti duplicando degli esoni
- Esoni simili si possono trovare in proteine molto diverse



Vantaggi degli exoni



Errori nello splicing del pre-mRNA causano diverse malattie umane beta-talassemia



Beta thalassemias (β thalassemias) are a group of inherited blood disorders. They are caused by reduced or absent synthesis of the beta chains of hemoglobin that result in variable outcomes ranging from severe anemia to clinically asymptomatic individuals.

Global annual incidence is estimated at 1 in 100,000.

Individuals with beta thalassemia major usually present within the first two years of life with severe anemia, poor growth and skeletal abnormalities during infancy. Untreated thalassemia major eventually leads to death, usually by heart failure; therefore, birth screening is very important.

Errori nello splicing del pre-mRNA causano diverse malattie umane

Molte mutazioni puntiformi sono sostituzioni nucleotidiche che inficiano lo splicing del pre-mRNA.

Circa il 15% delle mutazioni puntiformi patologiche per l'uomo modifica sequenze di splicing.

Ad es. un tipo di **beta-talassemia** è causato da una mutazione nel primo introne del gene della **beta-globina** che determina la formazione di un sito 3' per lo splicing generando un trascritto anomalo.

