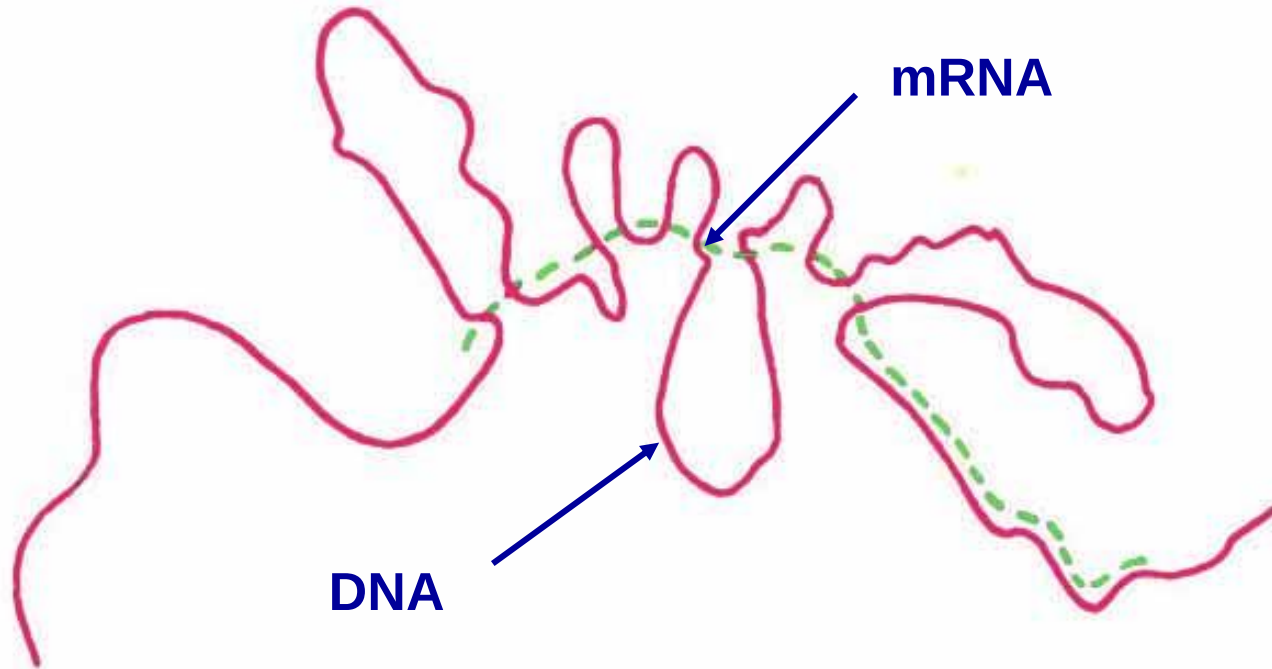


# mRNA splicing

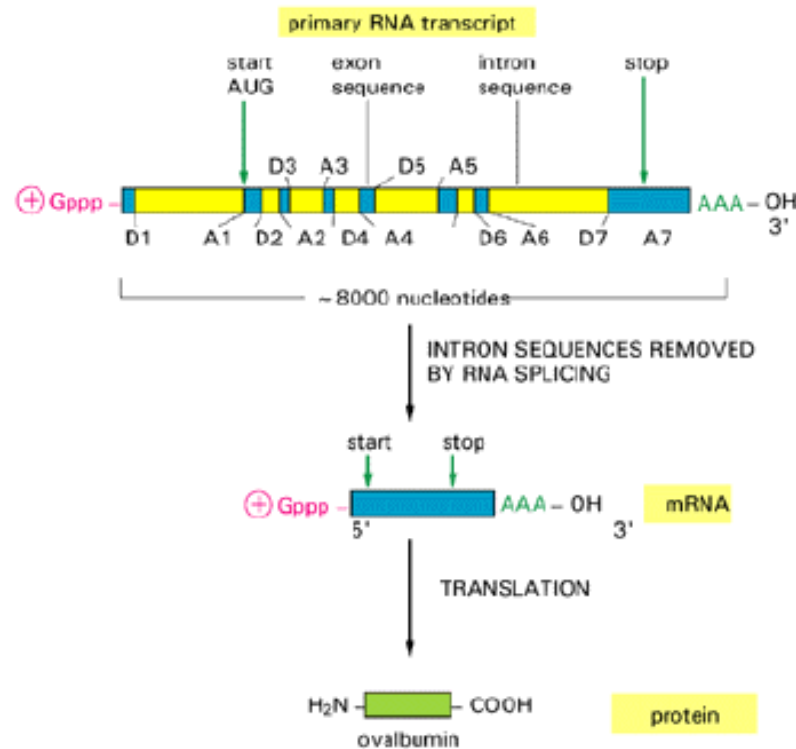


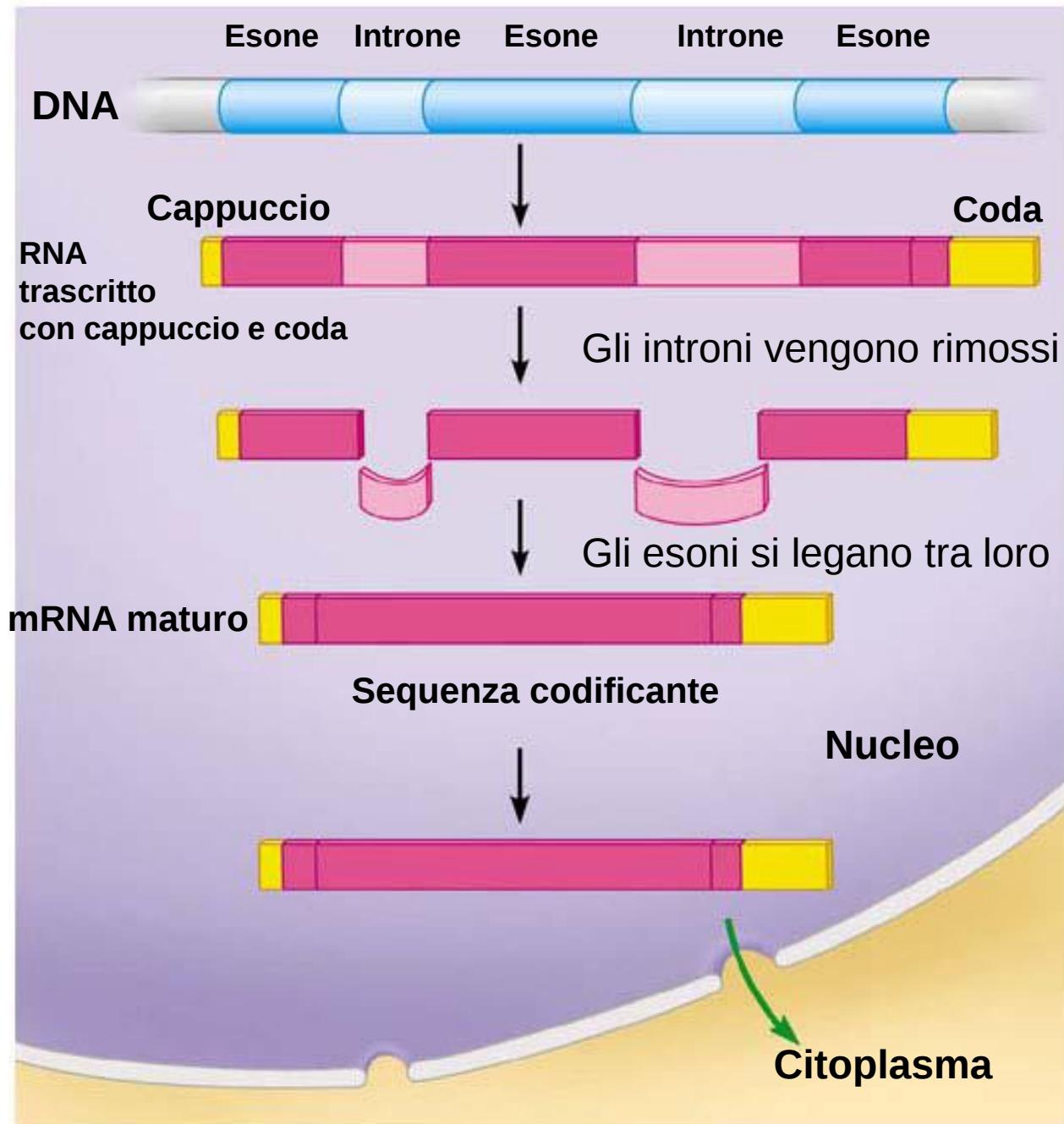
**L' mRNAs maturo è più corto del suo DNA stampo.**

La porzione codificante di un gene è **meno del 10%** della sua lunghezza totale

# Un gene:

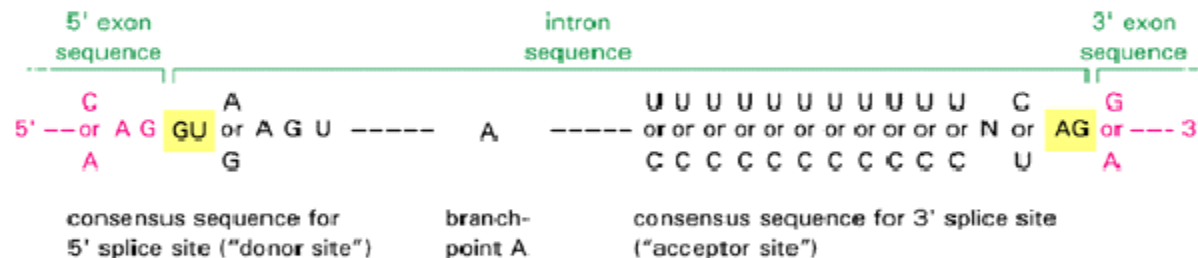
Il processo di splicing deve essere molto preciso per evitare slittamenti nella cornice di lettura del messaggio





Sito di splicing al **5'** e sito di splicing al **3'** chiamati rispettivamente **sito donatore** e **sito accettore**. C'è poi un altro **sito** che è quello di **ramificazione** (branched point) che formerà il laccio (lariat)

## Le sequenze consensus che delimitano introni/esoni



La reazione di splicing è un processo di transesterificazione in cui alcuni legami fosfodiesterici vengono rotti e altri nuovi formati grazie all'attacco nucleofilo del 2'-OH della A al branched site. Nelle due reazioni non c'è guadagno netto nel numero di legami chimici e pertanto non sarebbe necessario ATP. Tuttavia la reazione spende ATP per il corretto posizionamento dei fattori di splicing sui siti consenso

# Sequenze consenso per gli introni

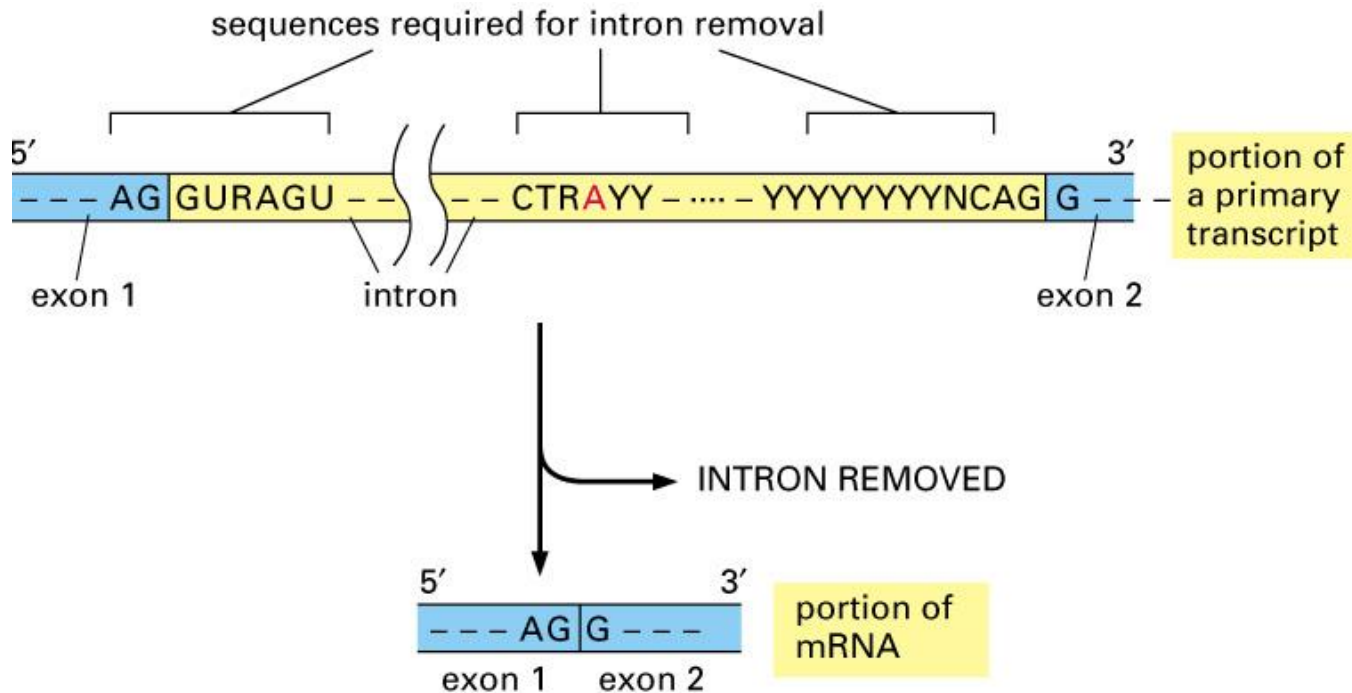
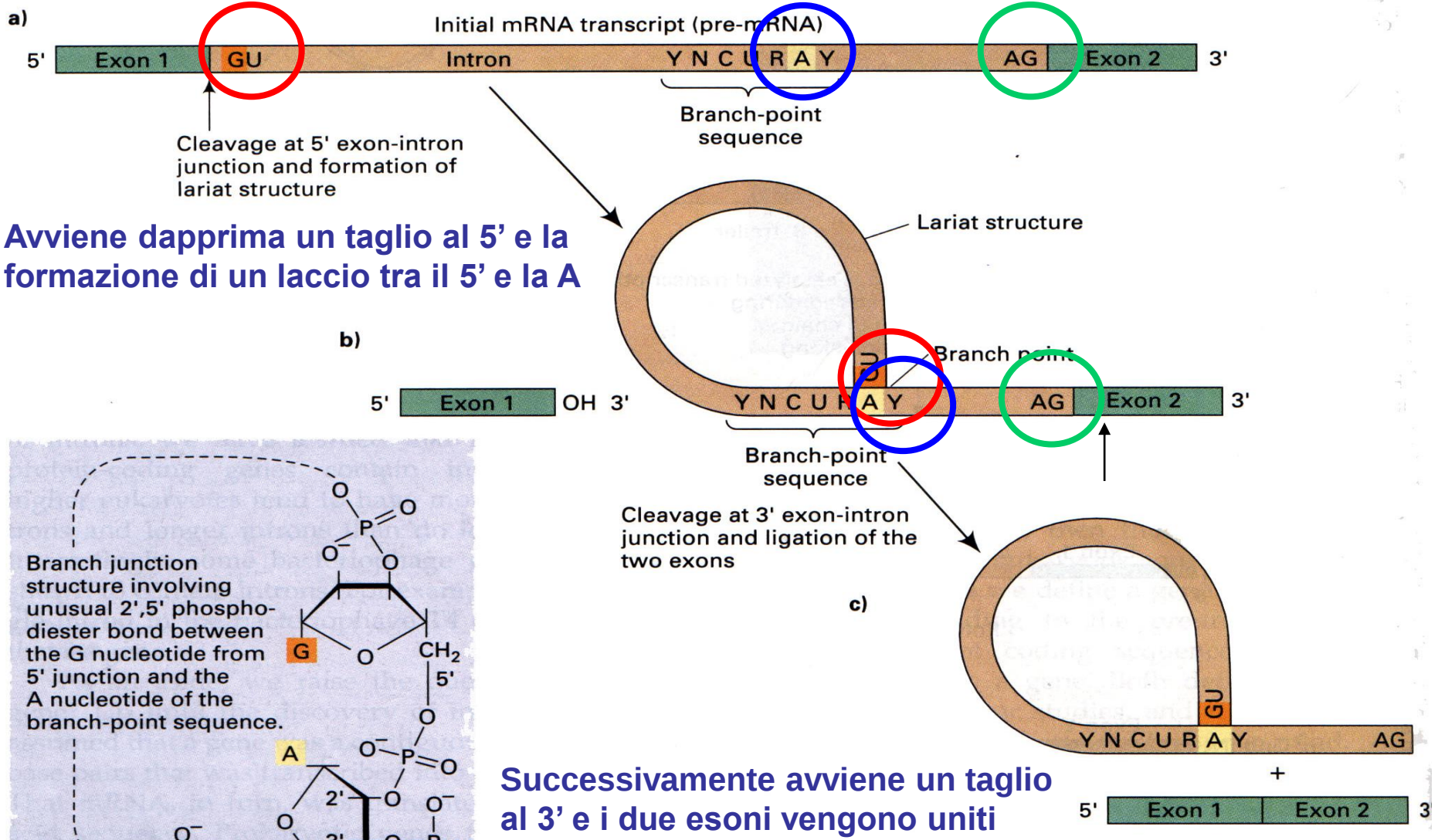


Figure 6–28. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Rimozione degli introni e saldatura degli esoni

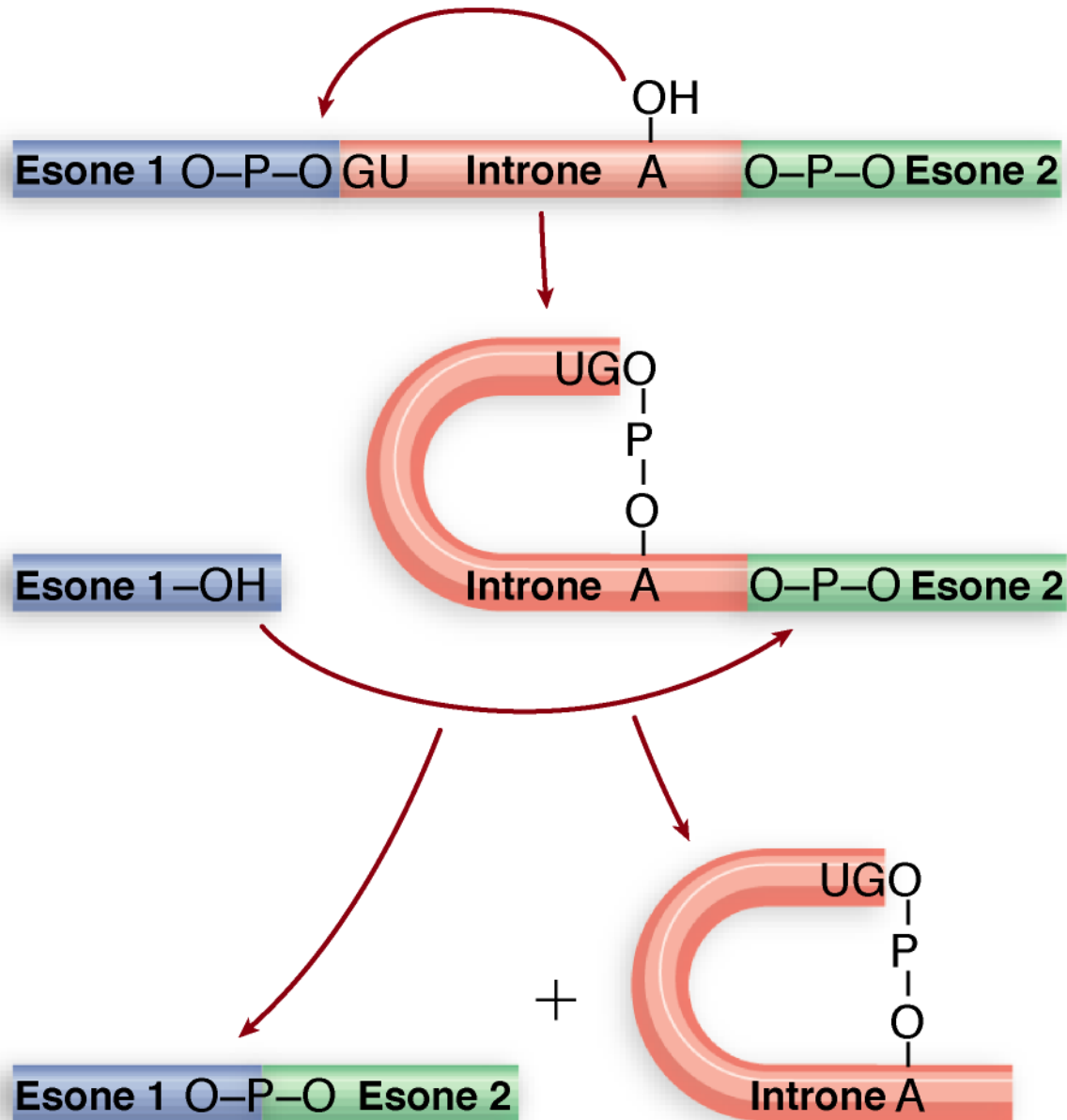
(All'estremità 5' e 3' esistono sequenze specifiche e una A a circa 3/4 dell'introne che sono punti di riconoscimento per l'escissione delle sequenze introniche).



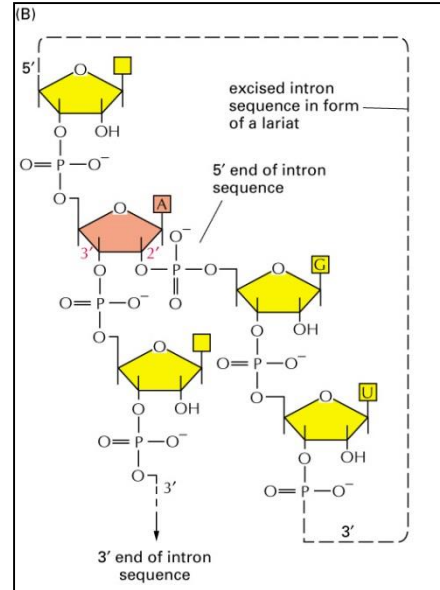
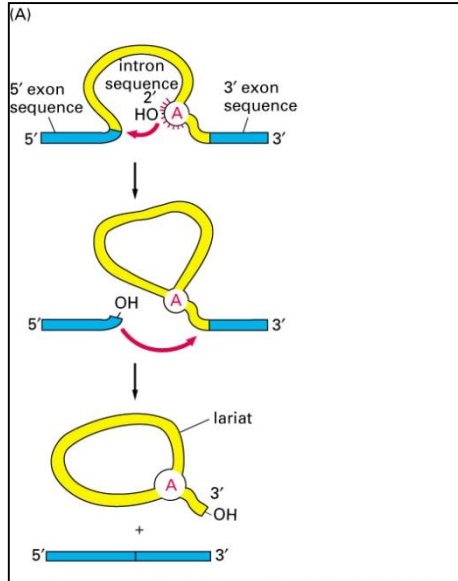
Successivamente avviene un taglio al 3' e i due esoni vengono uniti

N° degli Esoni = N° degli Introni -1. Es. 6 esoni e 5 introni:  
--esone-introne-esone-introne-esone--

## Lo splicing implica transesterificazioni



# Reazione di splicing

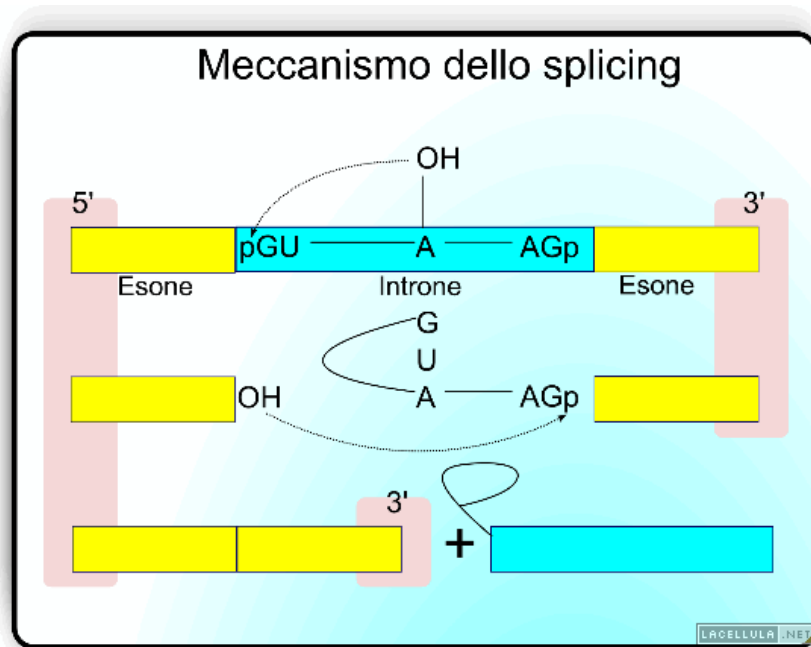


# TRANSESTERIFICAZIONE

Il primo passaggio è un attacco nucleofilo dal 2' -OH della A invariante del UACUAAC

Nel secondo passaggio, il 3' -OH libero dell'esone attacca il legame al 3'splice site.

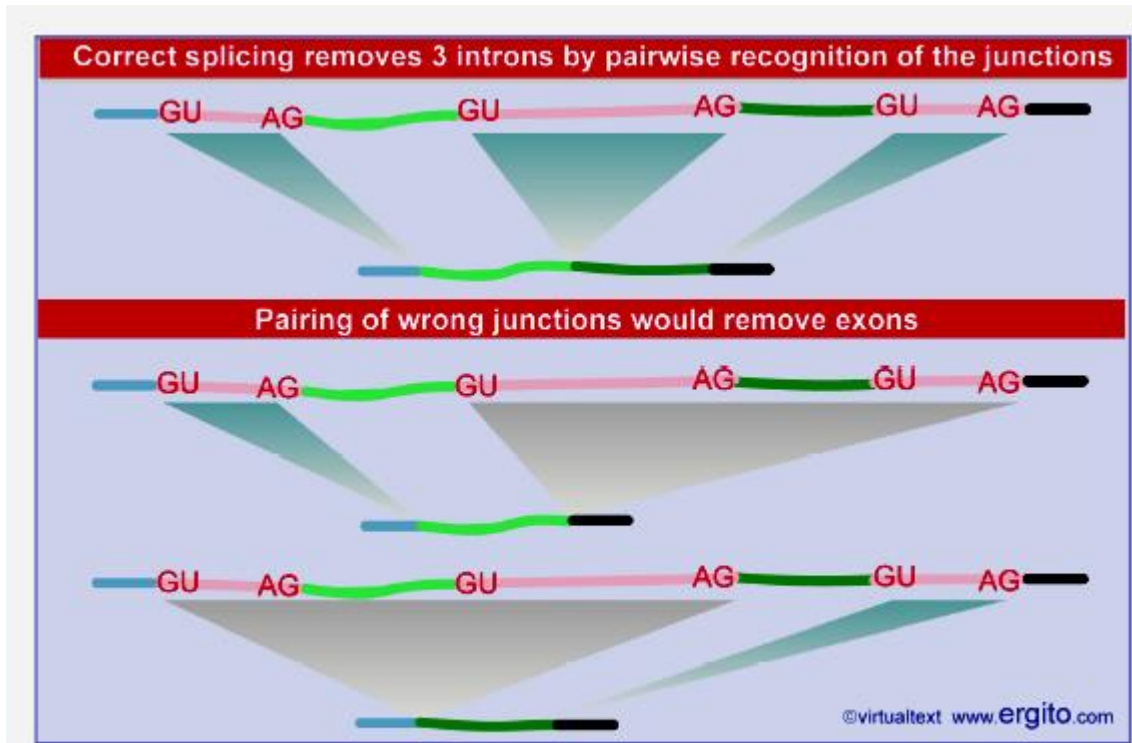
# Doppia transesterificazione



- La prima reazione è iniziata dalla A del branch-point che con il 2'-OH fa un attacco nucleofilo sul gruppo fosfato di della G del 5' splice site.
- In questo modo si forma una catena corta di pre-RNA che si chiude su stessa che rimane legata all'esone a valle.
- Nella seconda reazione il 3'-OH libero dell'esone a monte fa un attacco nucleofilo al 3' splice site sul gruppo fosfato della G.
- Come conseguenza i due esoni si uniscono e l'introne sottoforma di laccio (lariat) viene liberato

Che meccanismo fa in modo che i due siti sono tagliati insieme?

Tutti i site 5' e 3' sites sono funzionalmente equivalenti, ma lo splicing segue delle regole che assicurano che il sito 5' è sempre collegato al sito 3' che viene dopo nel RNA.

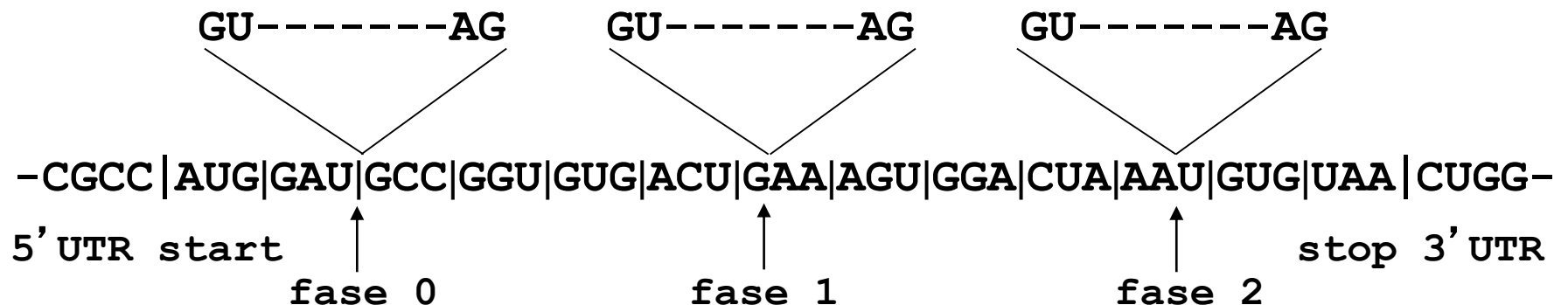


**Figure 24.4** Splicing junctions are recognized only in the correct pairwise combinations.

# La fase degli introni

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.

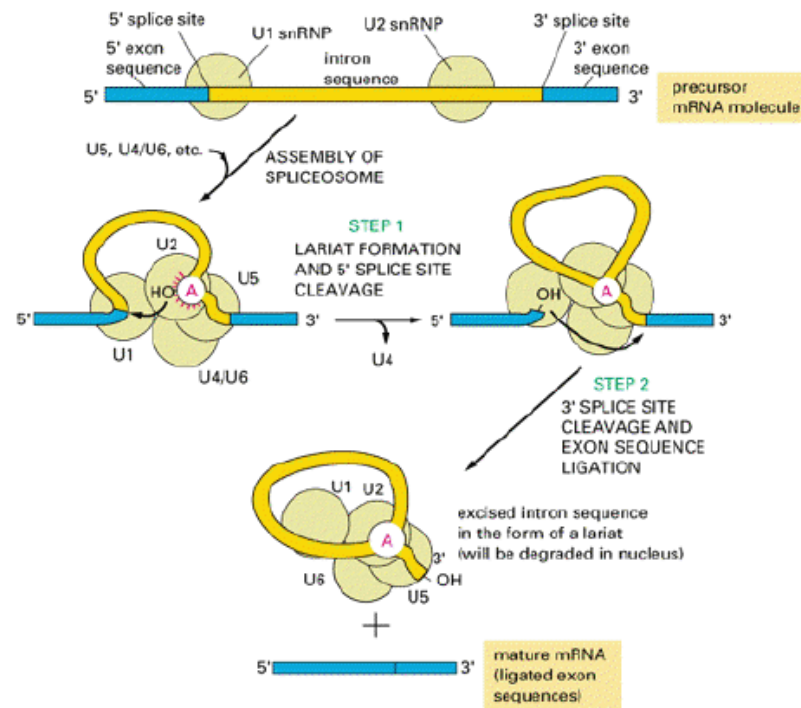


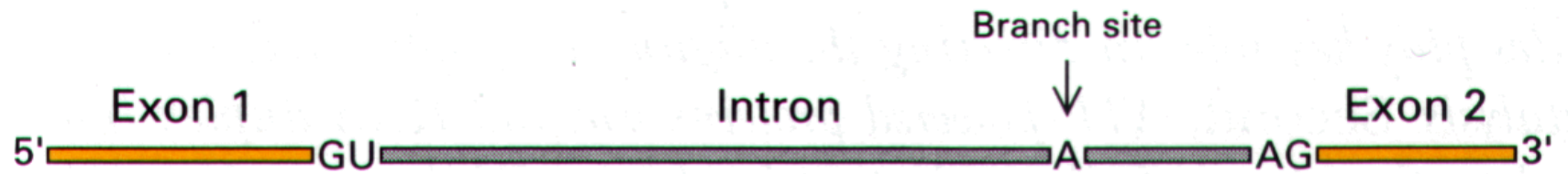
Al processo di splicing partecipano complessi ribonucleoproteici

## Lo splicing

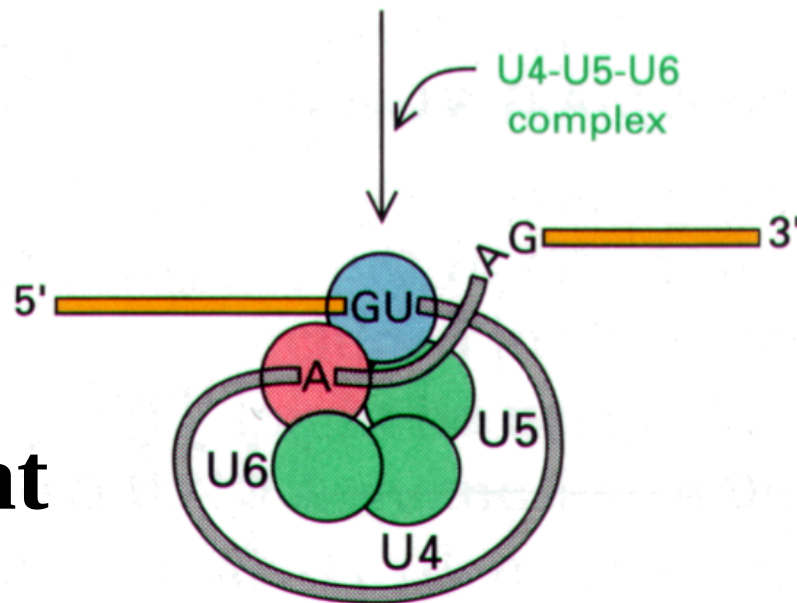
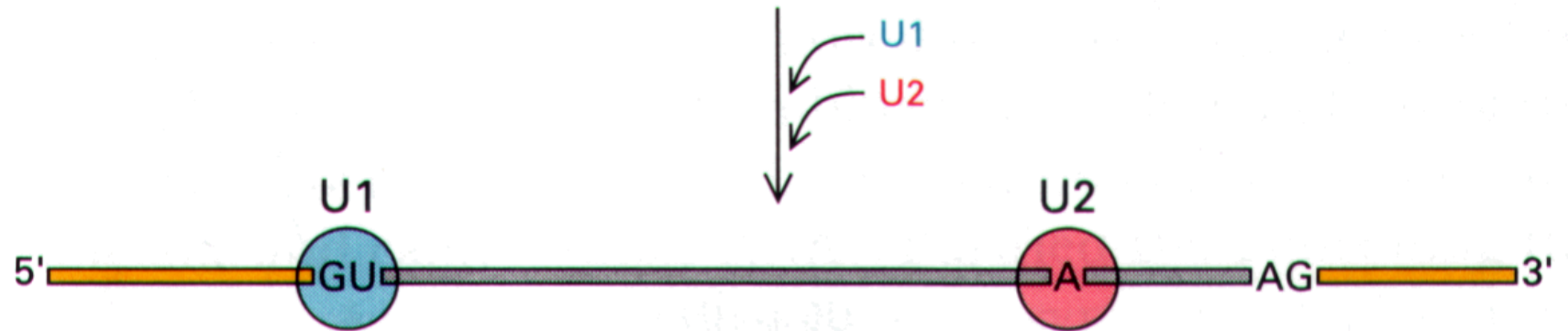
La reazione produce un aumento di entropia e l'introne liberato viene **subito degradato**.

Questo **assicura che la reazione proceda** e che non ci sia un'inversione della reazione.





**Precursor mRNA**



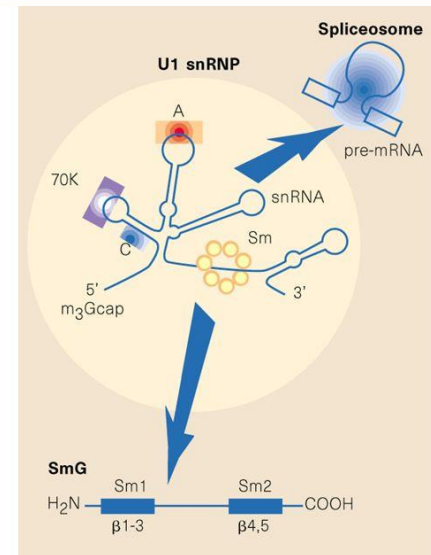
**lariat**

**Complete spliceosome**

# Gli snRNAs sono necessari per lo splicing

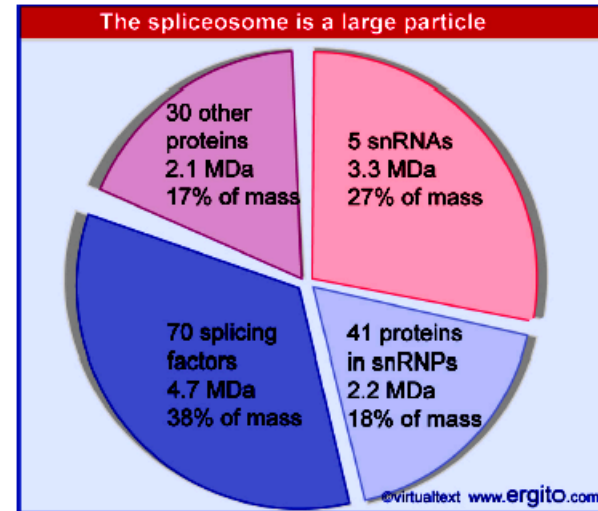
- I **cinque snRNPs** coinvolti nello splicing sono **U1, U2, U5, U4, e U6**.
- Insieme ad altre proteine addizionali, gli snRNPs formano lo **spliceosoma**.
- Tutti gli snRNPs, eccetto U6, contengono una sequenza conservata per legare le **proteine Sm**. Le proteine Sm sono riconosciute da anticorpi generati nelle malattie autoimmuni sistemiche (Lupus eritematoso).

Sm proteins may form ring around snRNAs



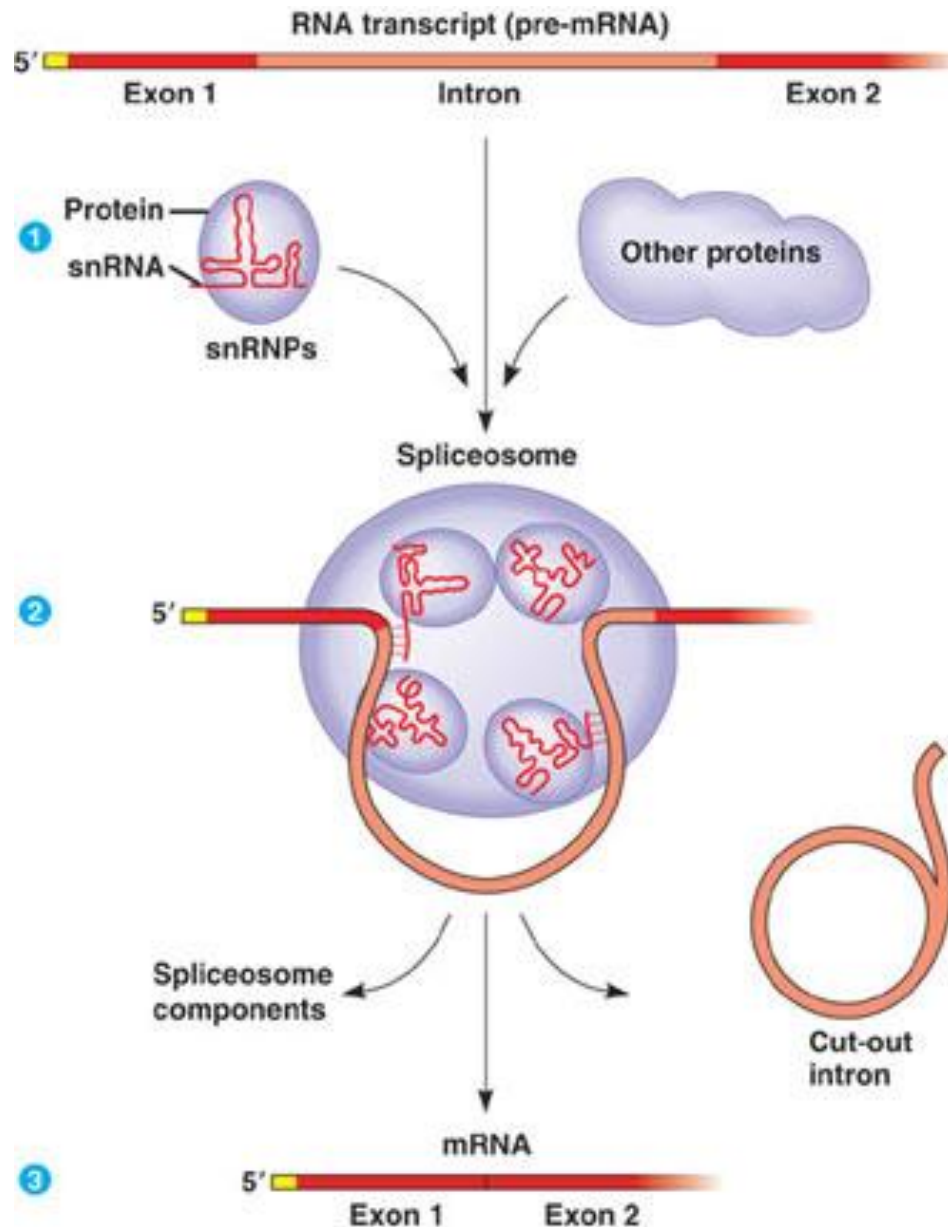
# spliceosoma

- Il complesso si **assembla sequenzialmente sul pre-mRNA**, e lo splicing avviene solo dopo che tutti i componenti si sono assemblati
- Sia il nucleo che il citoplasma delle cellule eucariote contengono molte piccoli RNA (200-300 bp)
- Quelli nel nucleo sono chiamati **small nuclear RNAs (snRNA)**; e quelli nel citoplasma **small cytoplasmic RNAs (scRNA)**.
- lo **spliceosoma** include un 50-60S ribonucleoprotein particle (più grande di quella del ribosoma)



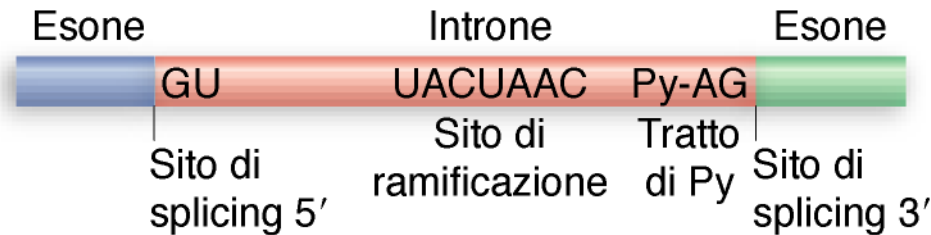
**Figure 24.8** The spliceosome is ~12 MDa. 5 snRNAs account for almost half of the mass. The remaining proteins include known splicing factors and also proteins that are involved in other stages of gene expression.

Le snRNPs coinvolte nello splicing sono U1, U2, U5, U4 e U6. **Ogni snRNP contiene un solo snRNA e alcune (<20) proteine.** Un nucleo strutturale comune per ogni snRNP consiste in un gruppo di 8 proteine, tutte riconosciute da un antisiero autoimmune chiamato **anti-Sm**

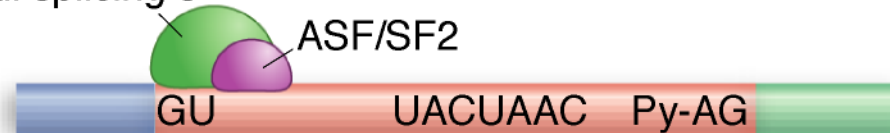


**Il complesso dello spliceosoma è costituito da circa 150 proteine e 5 RNA e ha le dimensioni di un ribosoma!**

## Il complesso E si forma mediante interazioni che coinvolgono entrambi i siti di splicing



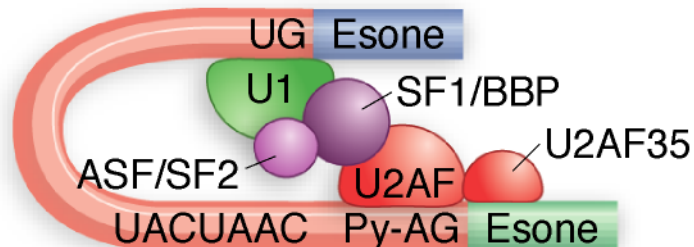
snRNP U1 e il fattore ASF/SF2 si legano al sito di splicing 5'



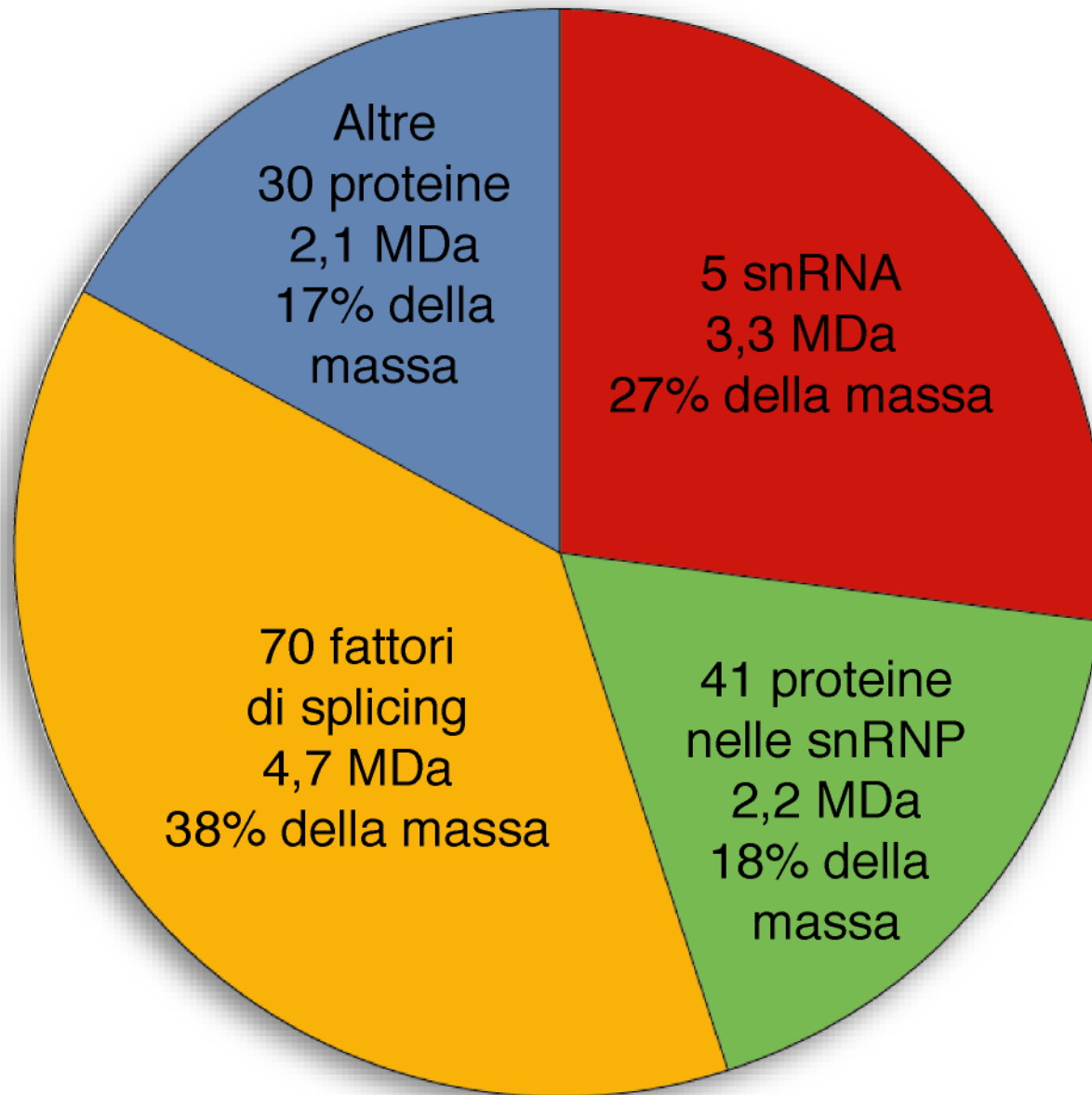
U2AF si lega al tratto di pirimidine e al sito di splicing 3'



SF1/BBP connette la snRNP U1 a U2AF

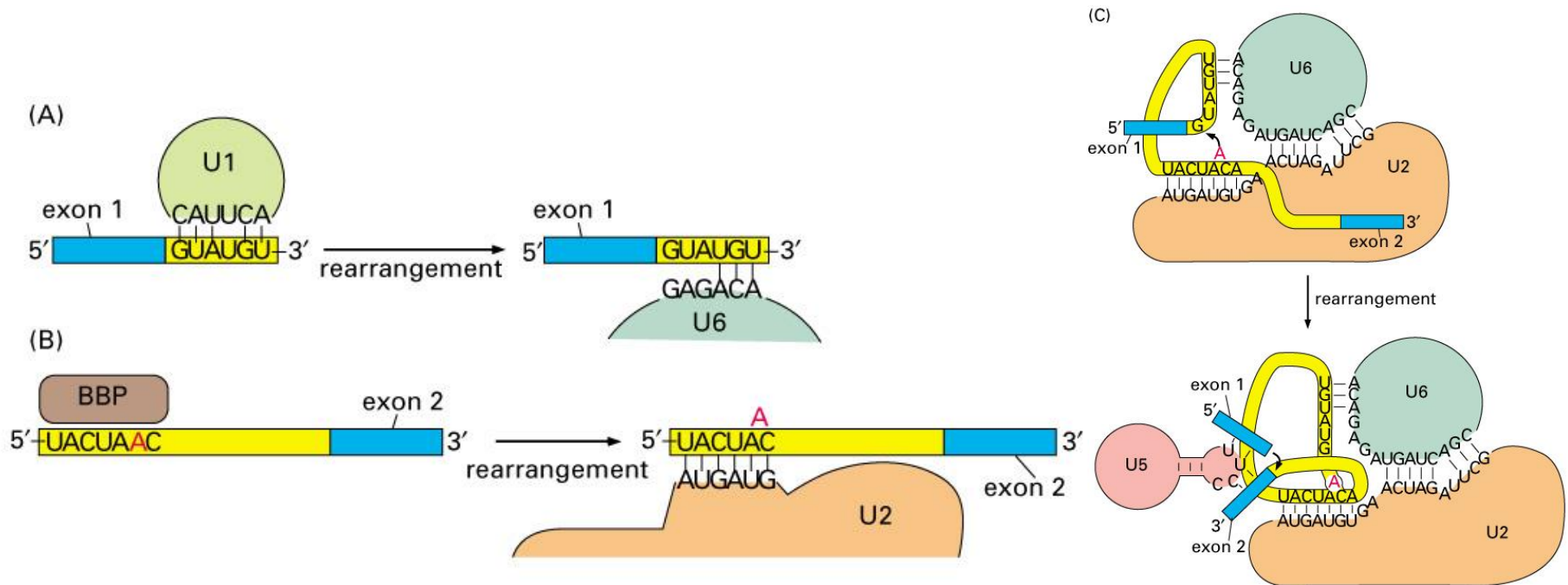


## Lo splicesoma è una grande particella



# Accoppiamento RNA-RNA

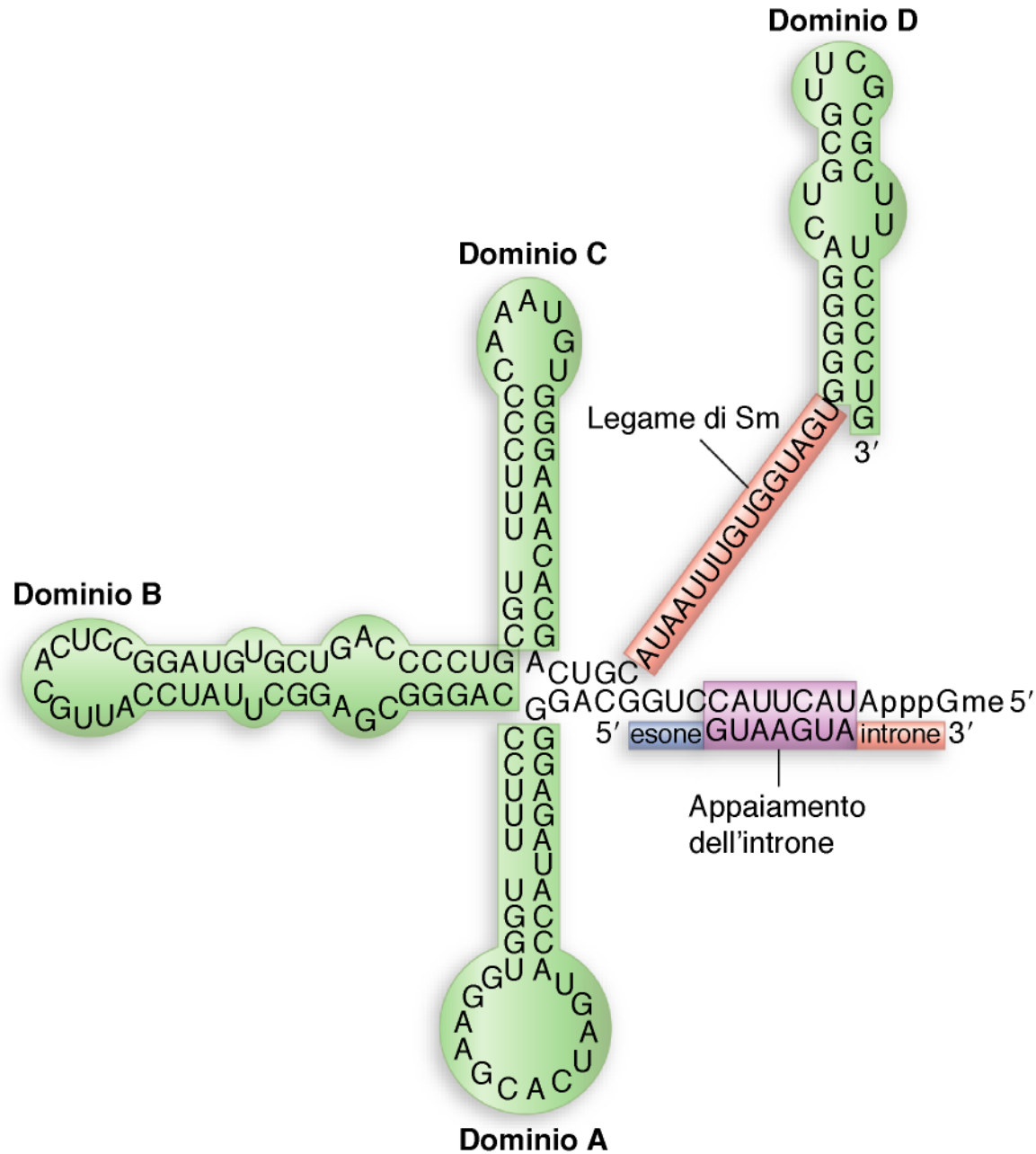
- Il sito al 5' è riconosciuto prima da U1 e poi da U6.
- U6 e U2 indirizzano la catalisi.



Sono gli RNA che riconoscono le sequenze consenso ai confini introne-esone e probabilmente partecipano essi stessi al processo di catalisi

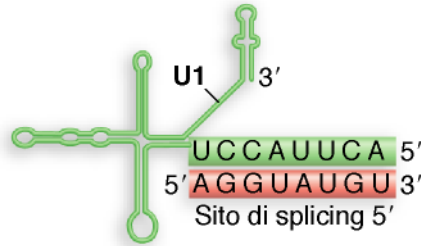
I cinque RNA (U1,U2,U4,U5 e U6) sono snRNA lunghi 100-300 nt e formano i complessi snRNP. snRNP diverse entrano ed escono in momenti precisi della reazione di splicing.

**L'snRNA U1 si appaia con la giunzione di splicing donatrice**

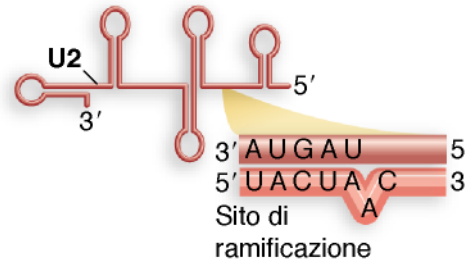


## L'appaiamento dell'snRNA è importante per lo splicing

U1 si appaia con il sito di splicing 5'



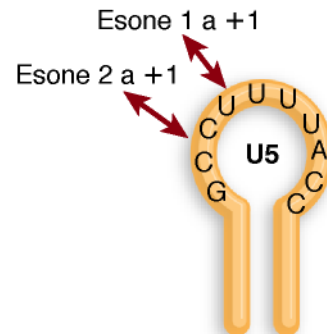
U2 si appaia con il sito di ramificazione



U6 si appaia con il sito di splicing 5'



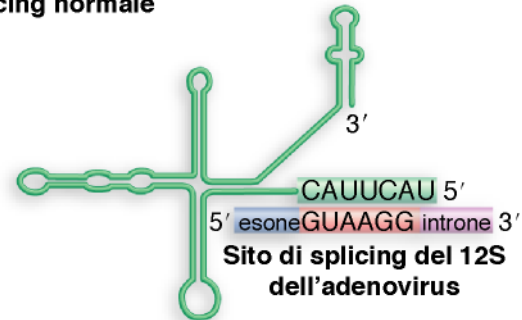
U5 è vicina a entrambi gli esoni



## L'snRNA U1 seleziona la giunzione di splicing donatrice

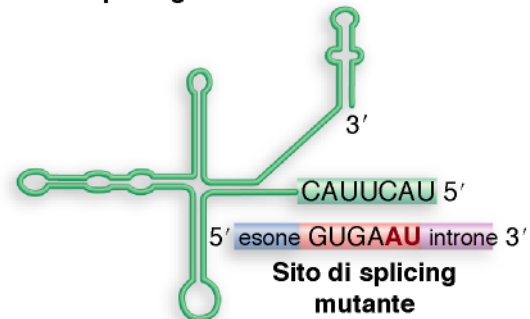
RNA U1 e pre-mRNA 12S normali

**Splicing normale**



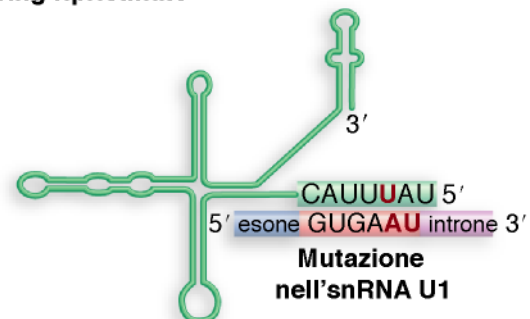
snRNA U1 normale e pre-mRNA 12S mutante

**Assenza di splicing**



snRNA U1 mutante e RNA 12S mutante

**Splicing ripristinato**



# Splicing steps

**U1** snRNP inizia lo splicing legandosi allo 5' splice-site mediante una reazione di **appaiamento RNA-RNA**.

Il **complesso E** contiene **U1** snRNP legato allo 5' splice site, la proteina **U2AF** legata al tratto di pirimidine tra il branch site e lo 3' splice site, e le **SR proteine** che collegano U1 snRNP a U2AF.

Le SR si legano ai siti di splicing degli esoni: **ESE =exonic splicing enhancer**

# Quindi.....

Alcune proteine non complessate nelle snRNP sono coinvolte nello splicing

Nello splicing sono importanti le interazioni RNA-RNA, RNA-proteine, proteine-proteine

# Riassumendo.....

Lo Splicing necessita dei **siti 5' (donatore) e 3' (accettore)** e di un **"branch-point site"** a monte del sito 3'.

**Le sequenze più conservate sono GU al 5' e AG al 3' e la A nel punto di ramificazione.** Ad esempio, la sequenza di ramificazione (branch-point site) è conservata nei lieviti, ma è meno conservata negli eucarioti superiori.

Un cappio si forma quando l'introne è tagliato al 5' ed il suo terminale **si lega al 2'** di una A della ramificazione dell'introne.

L'introne è poi rilasciato come un cappio quando è tagliato al 3', e gli esoni di destra e sinistra sono legati tra di loro.

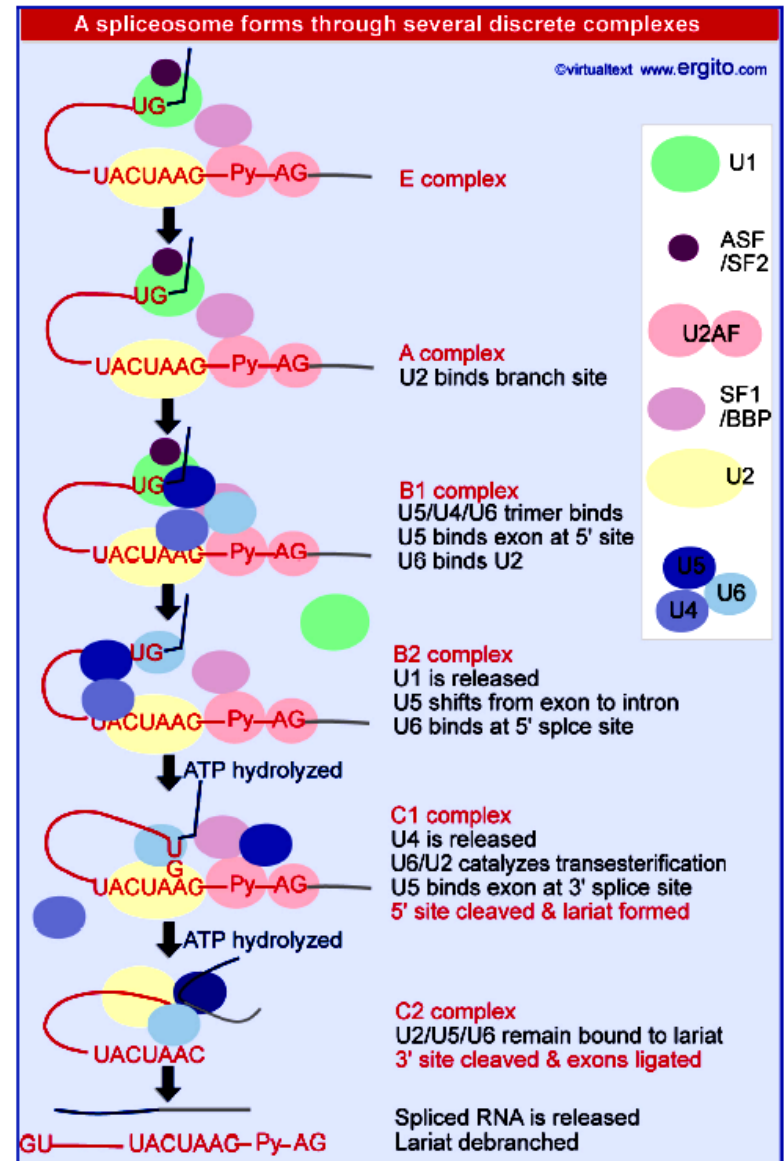
Le reazioni sono delle **transesterificazioni** in cui un legame è trasferito da una localizzazione all'altra.

Lo spliceosoma ha la capacità di far avvicinare, dal punto di vista spaziale, le estremità notevoli del sistema esone-introne per permettere gli attacchi nucleofili e le conseguenti transesterificazioni a livello della catena di pre-mRNA da processare.

Per poter compiere queste reazioni è richiesta energia sotto forma di ATP.

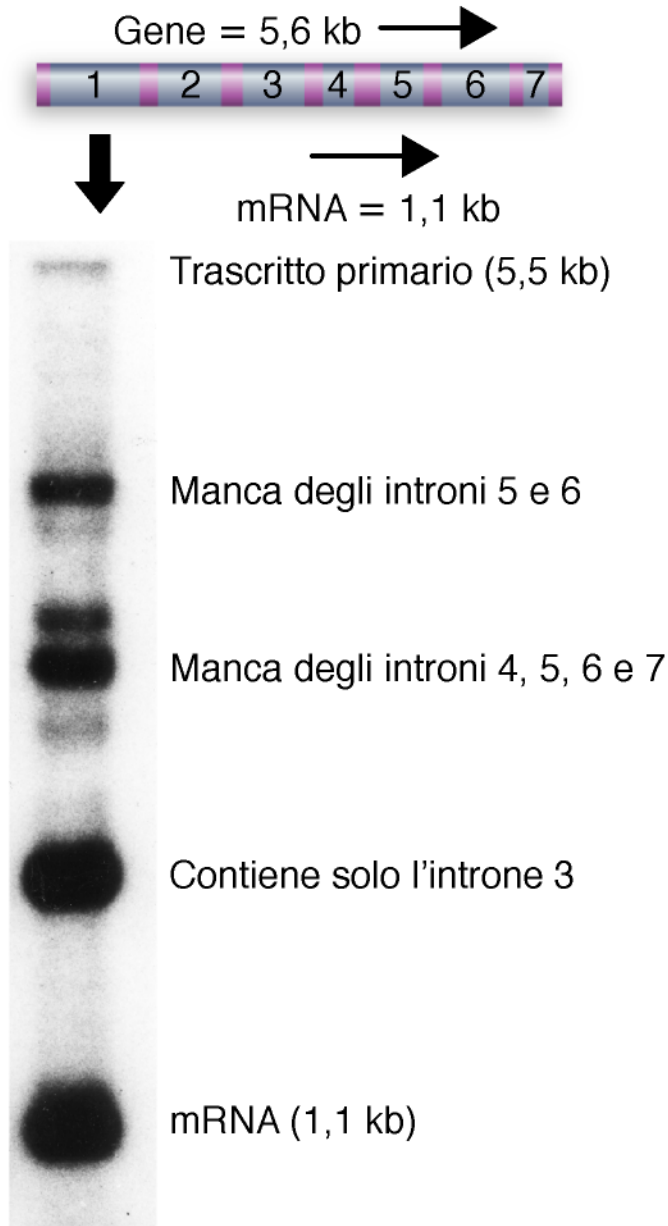
## Passaggi dello spliceosoma

- **Complesso E (early)**
- **Complesso A:** U2 si lega al sito di ramificazione (Branch site)
- **Complesso B1** si lega il trimero U5/U4/U6: (spliceosoma completo)
- **Complesso B2:** U1 è rilasciato e si ha un riarrangiamento (U5 si sposta dall'esone all'introne e U6 va al 5' splice site)
- **Complesso C1:** U4 è rilasciato ed inizia la catalisi (U6/U2) e U5 si lega all'esone al 3' splice site. Il sito al 5' è tagliato
- **Complesso C2:** sito 3' tagliato e gli esoni legati

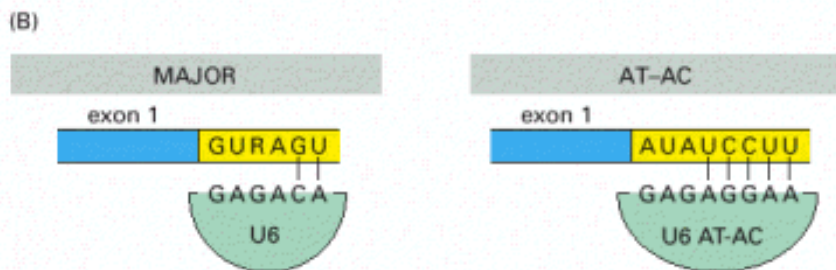
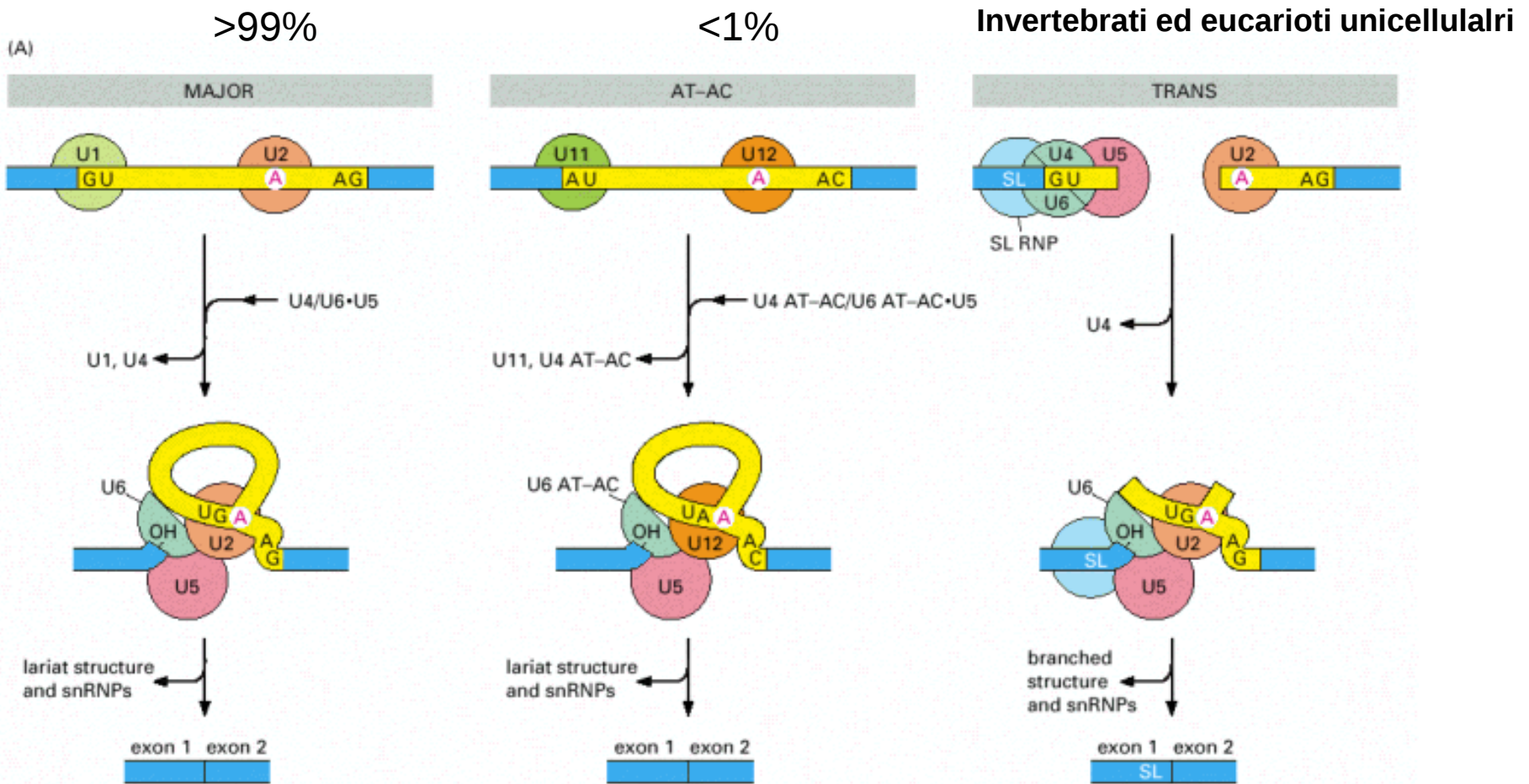


**Figure 24.13** The splicing reaction proceeds through discrete stages in which spliceosome formation involves the interaction of components that recognize the consensus sequences.

## La maturazione dell'mRNA è un processo ordinato



- Gli **Splice sites** sono generici: non hanno specificità per gli RNA individuali.
- L'apparato dello splicing non è tessuto specifico.
- Lo splicing avviene solo tra siti 5' e 3' **dello stesso introne**.
- Lo splicing segue un cammino preferito.
- La reazione però **non** procede sequenzialmente lungo il precursore.



Esiste anche uno spliceosoma minore (alternativo) che riconosce introni piuttosto rari con senquenze consenso AT-AC. Usano snRNP diverse (U11, U12) ma il meccanismo generale è lo stesso

# Tipi di splicing

- Splicing nucleare

spliceosoma

- Splicing di introni di tipo II

autosplicing

- Splicing di introni di tipo I

trans-  
esterificazioni

- Splicing di tRNA di lievito

nucleasi e ligasi

Gli introni del gruppo I e II sono rari (alcuni geni degli organelli degli eucarioti, rRNA nucleari di alcuni eucarioti)

## Group I self-splicing intron sequences

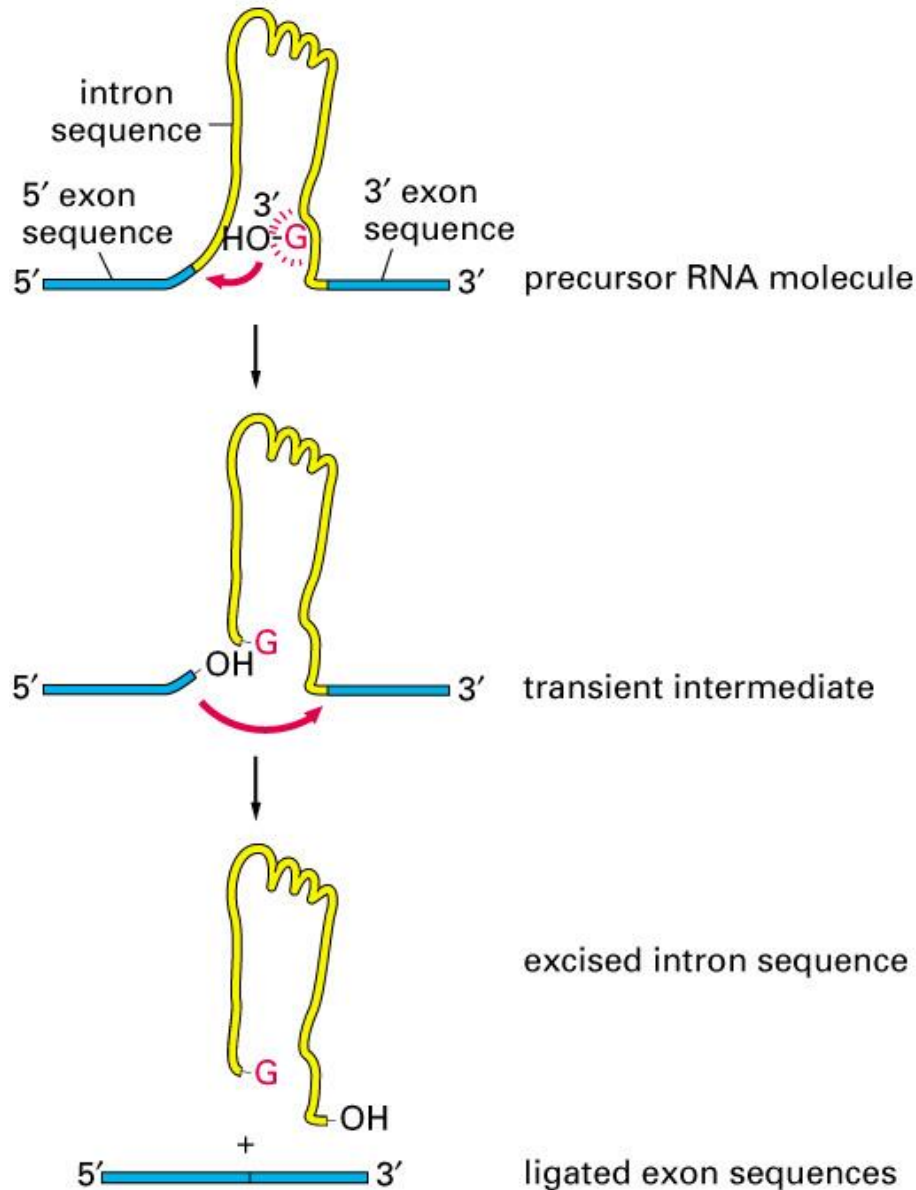


Figure 6-36 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Introni **Self-splicing di gruppo I.**

Rari introni di eucarioti, rRNA o organelli.

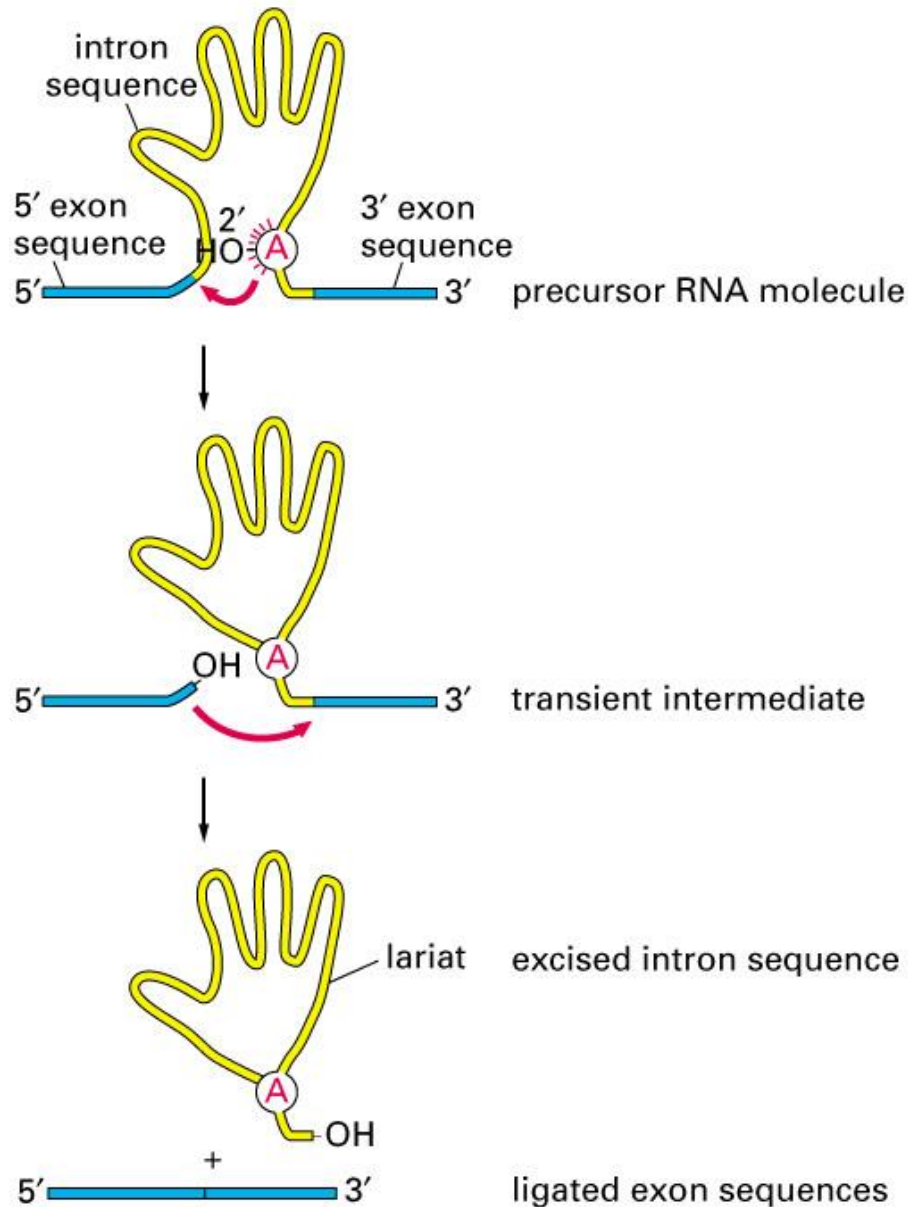
### **Dimensione di 400-1000 nt**

Anziché un residuo di A hanno una **G** nel branch-point che presenta il 3'-OH al 5'splice site. Nella seconda transesterificazione il 3'-OH libero dell'esone attacca il 3' splice site come nello splicing con spliceosoma

Lo splicing **non necessita della presenza di proteine**

Hanno una struttura secondaria conservata che crea tasche per le reazioni. Inoltre hanno una **sequenza guida interna che si appaia con la sequenza al 5' splice site** e che determina il preciso attacco nucleofilo della G

## Group II self-splicing intron sequences



## Introni Self-splicing di gruppo II.

Rari introni di organelli.

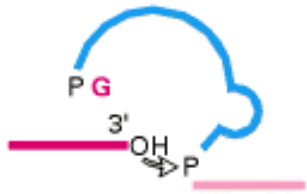
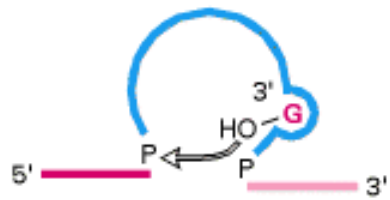
**Dimensione di 400-1000 nt**

Lo splicing **non necessita della presenza di proteine**

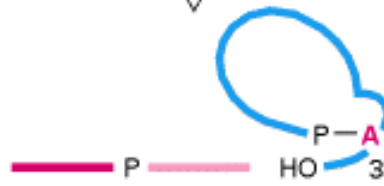
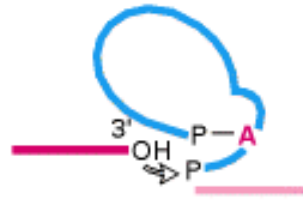
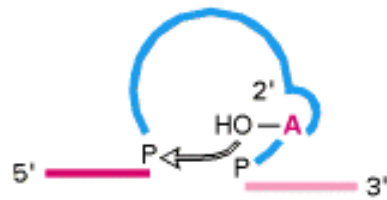
Il meccanismo è simile a quello dello spliceosoma

# Self-splicing introns

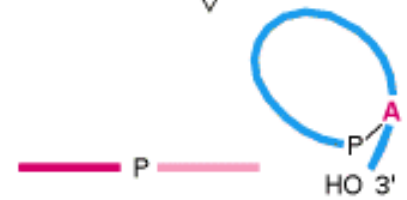
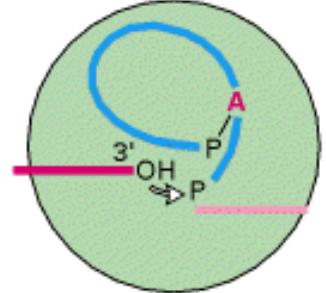
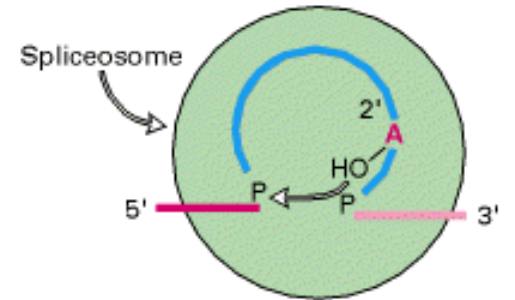
## Group I



## Group II



# Spliceosome-catalyzed splicing of pre-mRNA

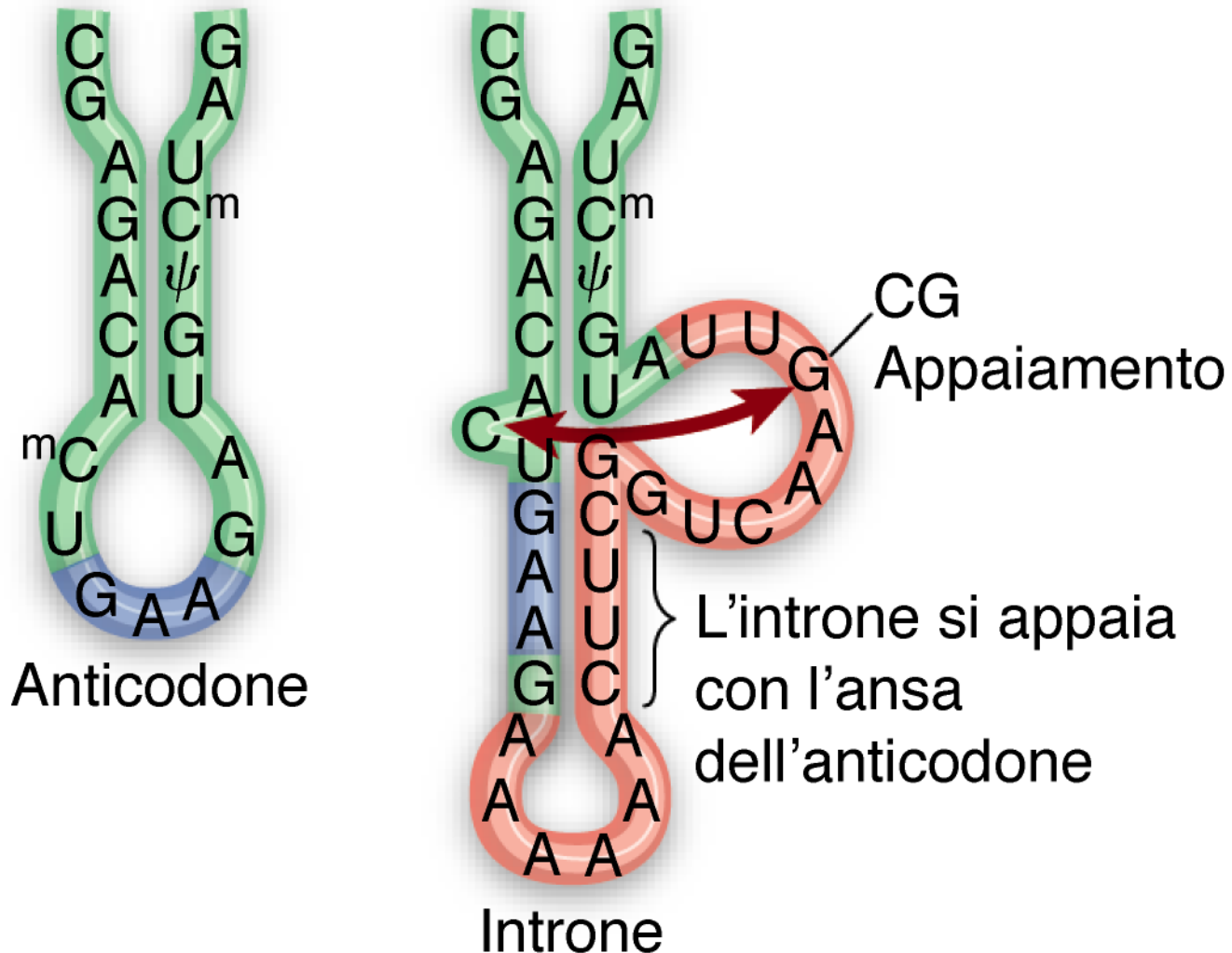


### Three class of RNA Splicing

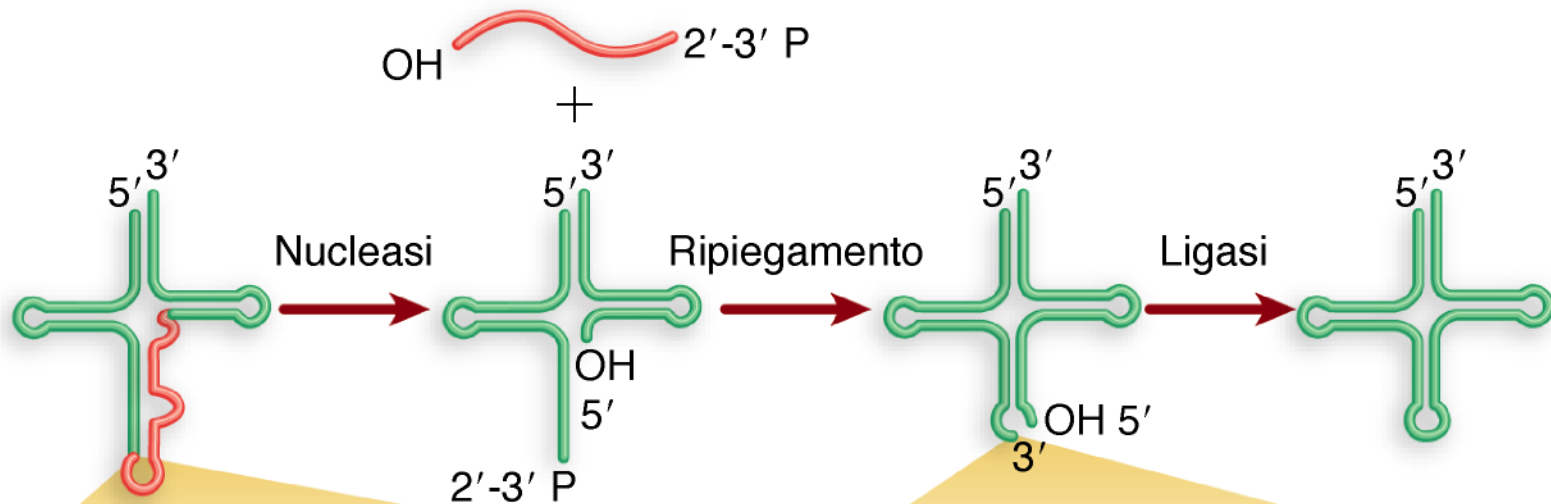
| <b>Class</b>            | <b>Abundance</b>                                                                            | <b>Mechanism</b>                                        | <b>Catalytic Machinery</b>                     |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>Nuclear pre-mRNA</b> | <b>Very common; used for most eukaryotic genes</b>                                          | <b>Two transesterification reactions; branch site A</b> | <b>Major spliceosome</b>                       |
| <b>Group II introns</b> | <b>Rare; some eukaryotic genes from organelles and prokaryotes</b>                          | <b>Same as pre-mRNA</b>                                 | <b>RNA enzyme encoded by intron (ribozyme)</b> |
| <b>Group I introns</b>  | <b>Rare; nuclear rRNA in some eukaryotics, organelle genes, and a few prokaryotic genes</b> | <b>Two transesterification reactions; exogenous G</b>   | <b>Same as group II introns</b>                |

**Lo splicing del tRNA riconosce una struttura specifica**

tRNA maturo      Precursore del tRNA



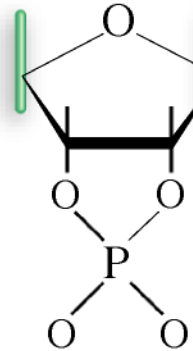
## Lo splicing del tRNA ha stadi di taglio e di legatura separati



La fostodiesterasi apre l'anello di fosfato

Catena  
del tRNA

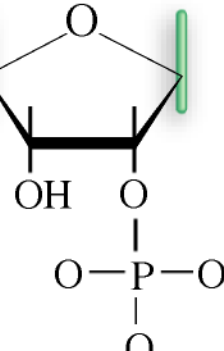
Base



2'-3'-fosfato ciclico

Catena  
del tRNA

Base



3'-OH,  
2'-fosfato

La chinasi fosforila il terminale 5'-OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

Base

OH

OH

CH<sub>2</sub>

Base

OH

Base

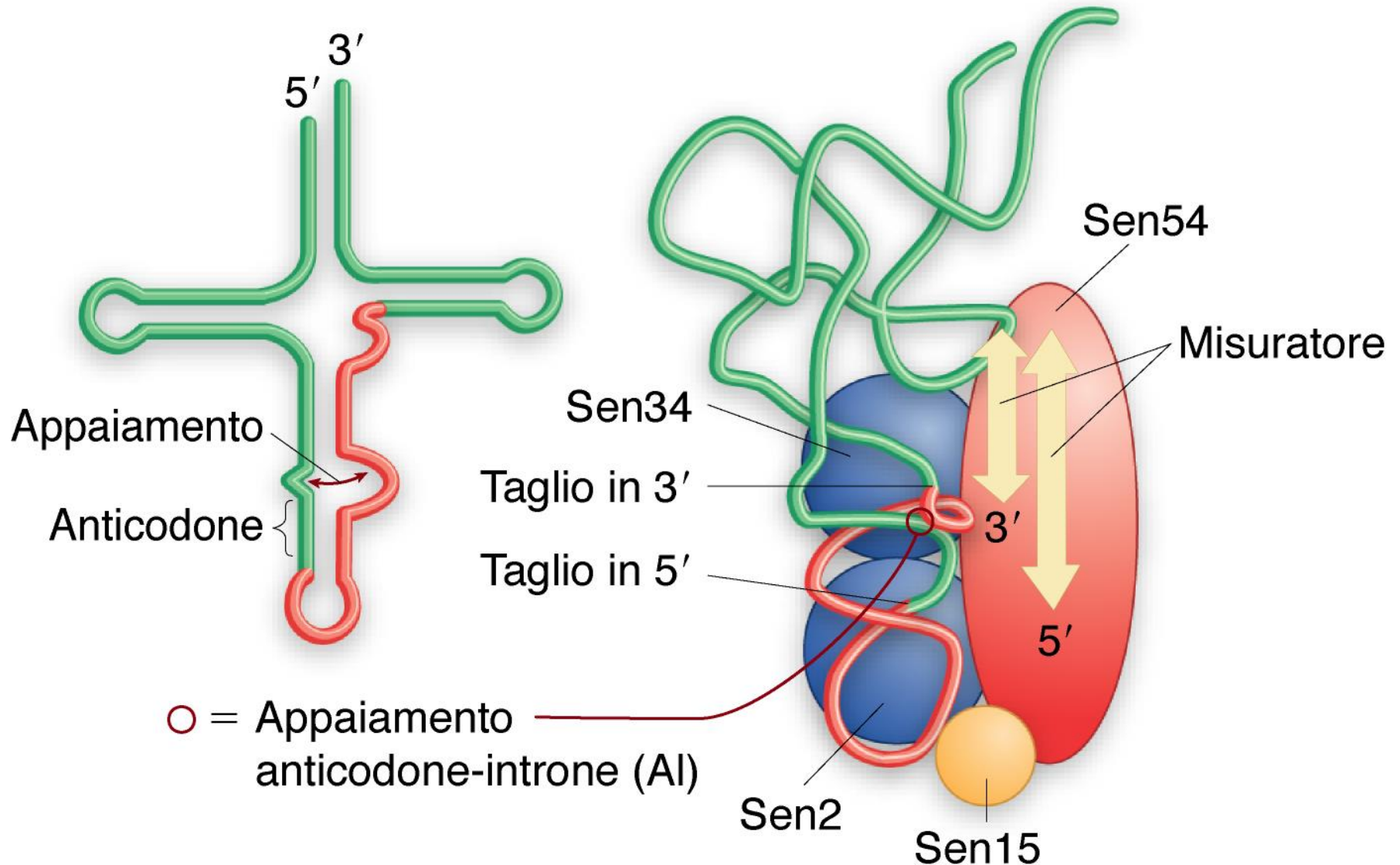
OH

Base

OH

</

# Il complesso dell'endonucleasi è composto da quattro proteine



# Come fa il complesso di splicing a trovare i siti in modo affidabile negli mRNA???

## Il ruolo del caricamento contemporaneo alla trascrizione dei fattori per splicing e delle proteine SR



Gli esoni sono immersi in un “oceano” di introni (**150 nt contro 3000 nt-in media**)



Entra in gioco la RNA pol II e la sua CTD: le proteine per lo splicing che sono sulla coda CTD vanno a riconoscere il sito di splicing 5' lungo la molecola e poi al 3' e aiuteranno il riconoscimento da parte dello spliceosome



Le proteine SR si legano a sequenze all'interno degli esoni dette ESE (exonic splicing enhancer) e reclutano altre proteine (tipo U2AF). Le SR sono essenziali per lo splicing e regolano anche lo splicing alternativo (alcune sono controllate da fattori fisiologici e altre sono responsabili di splicing specifici per il fenotipo cellulare)

## SPLICING ALTERNATIVO

Un gene può generare più di un prodotto polipeptidico attraverso lo splicing alternativo. Secondo gli ultimi studi il 90% dei geni del genoma umano subiscono splicing alternativo per dare più isoforme polipeptidiche (il più delle volte 2 prodotti diversi, ma in alcuni casi anche un centinaio)

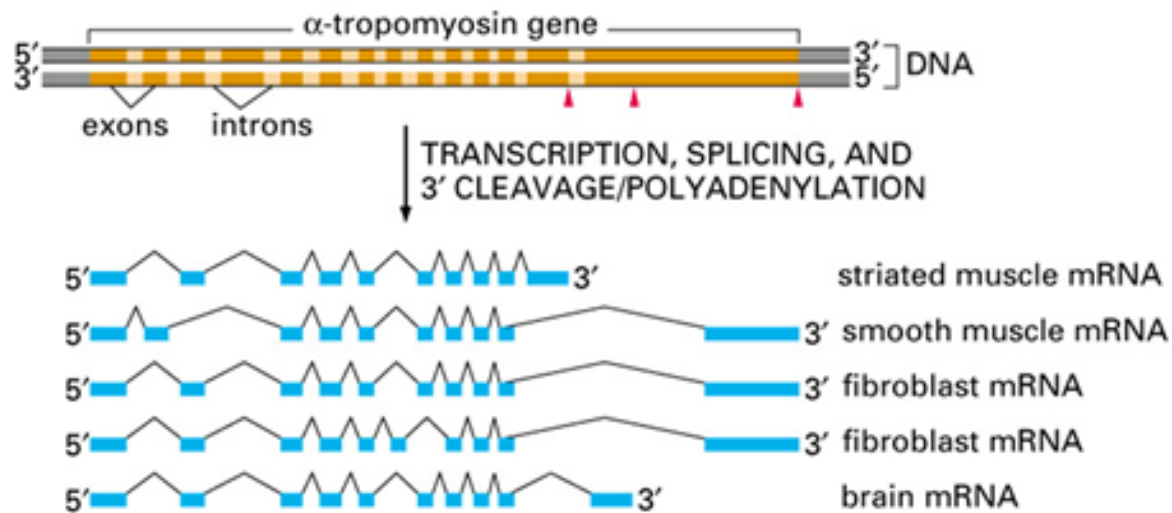
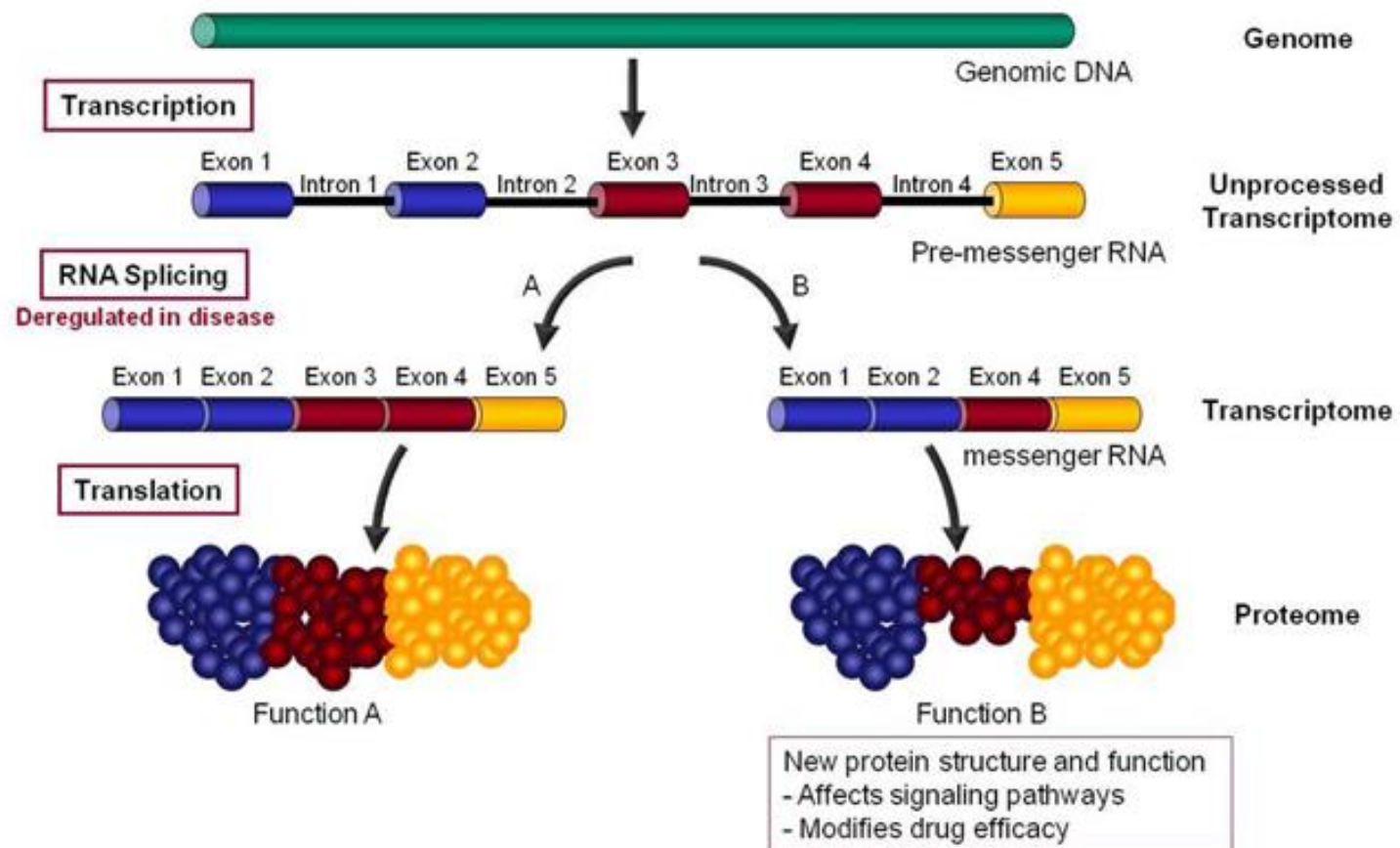
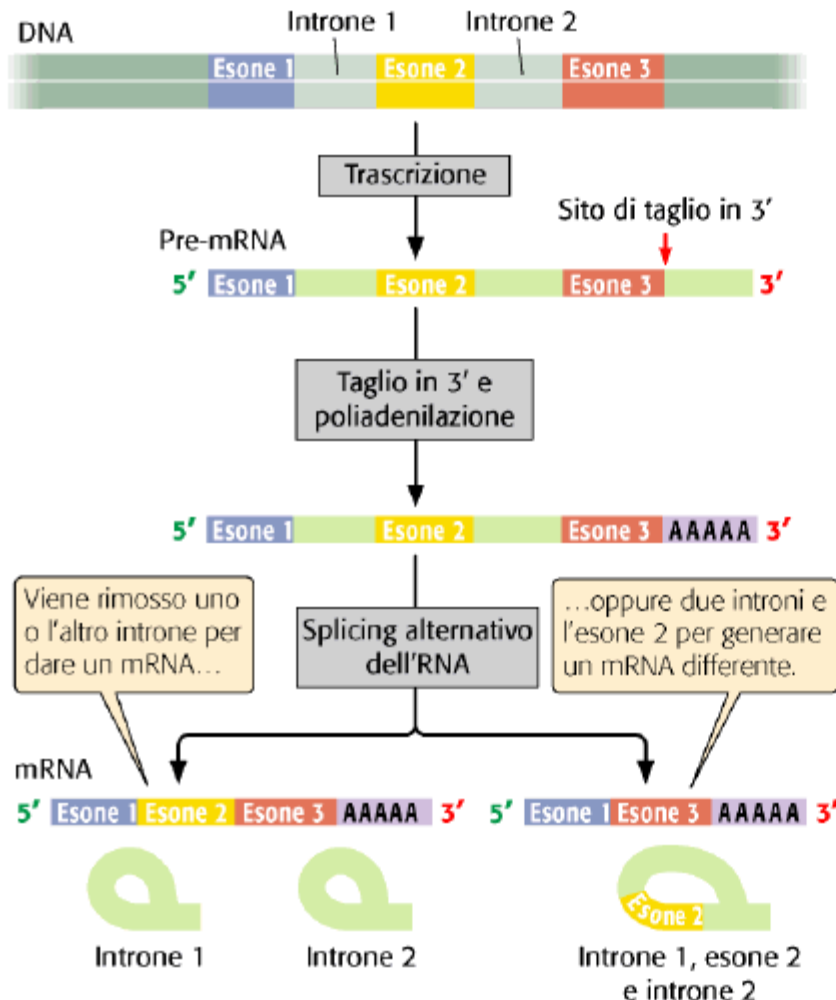


Figure 6-27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

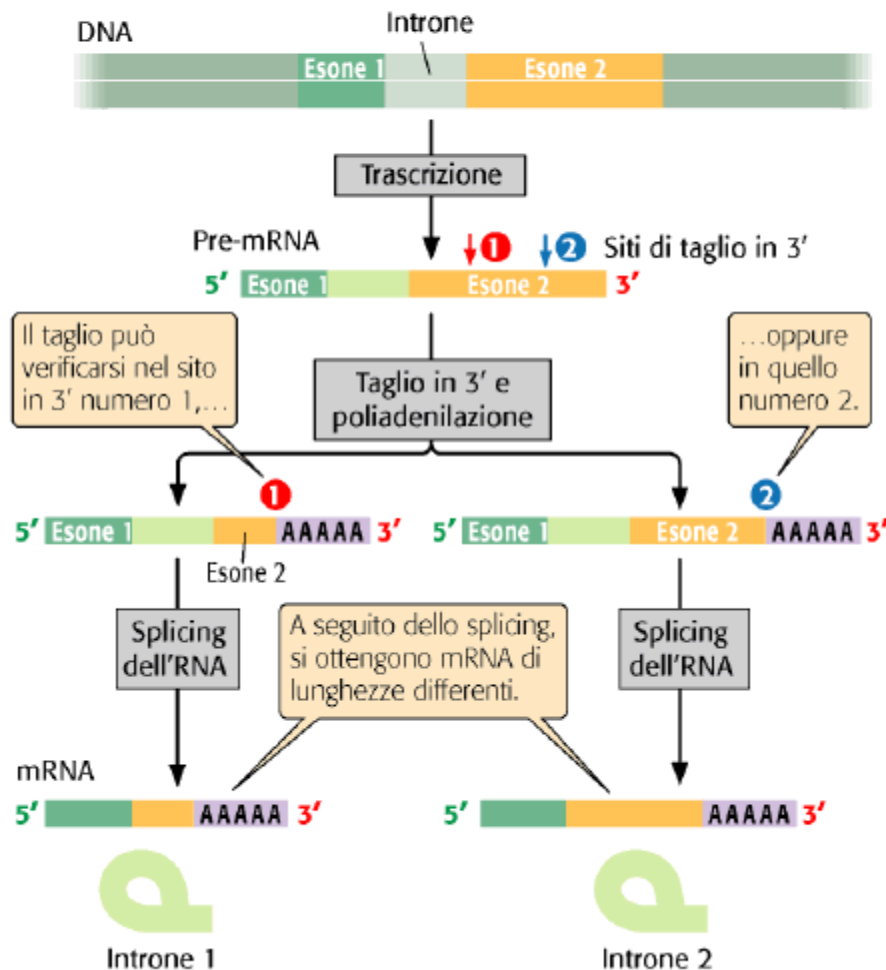


# Le vie alternative di processamento: Lo splicing alternativo



Da una molecola di pre-mRNA si possono ottenere diverse molecole di mRNA maturo in seguito a combinazioni diverse di esoni

# Le vie alternative di processamento: I siti di taglio multipli in 3'



I siti di taglio alternativi in 3' permettono di scindere il pre-mRNA in punti differenti per dare origine a mRNA di lunghezza variabile

- Uno esone può essere saltato
- Si possono usare siti criptici

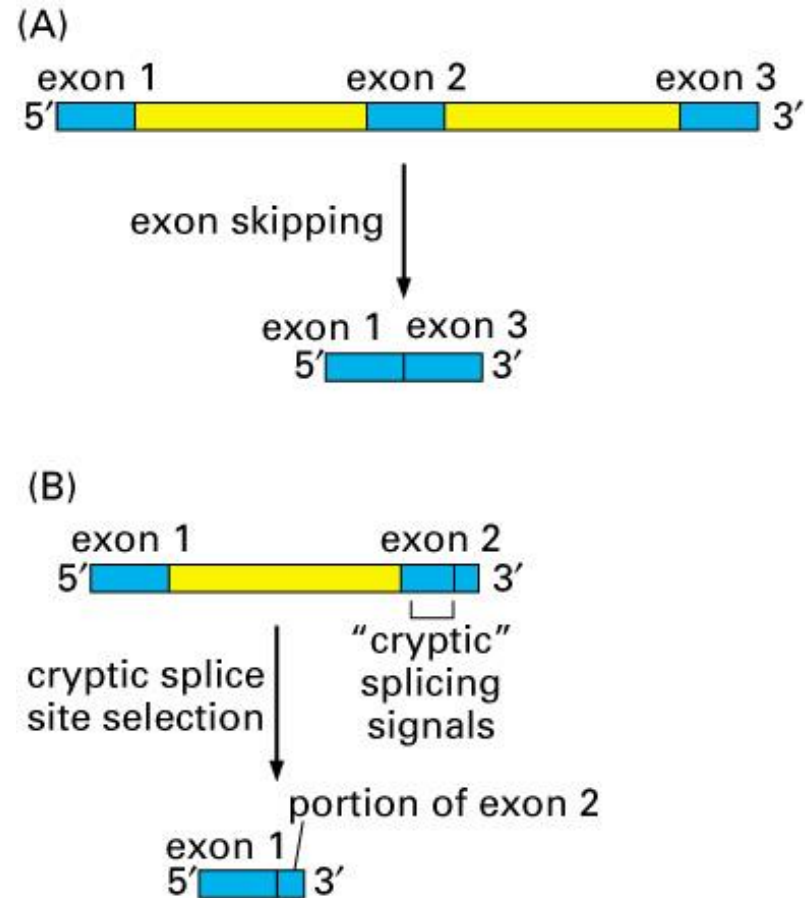
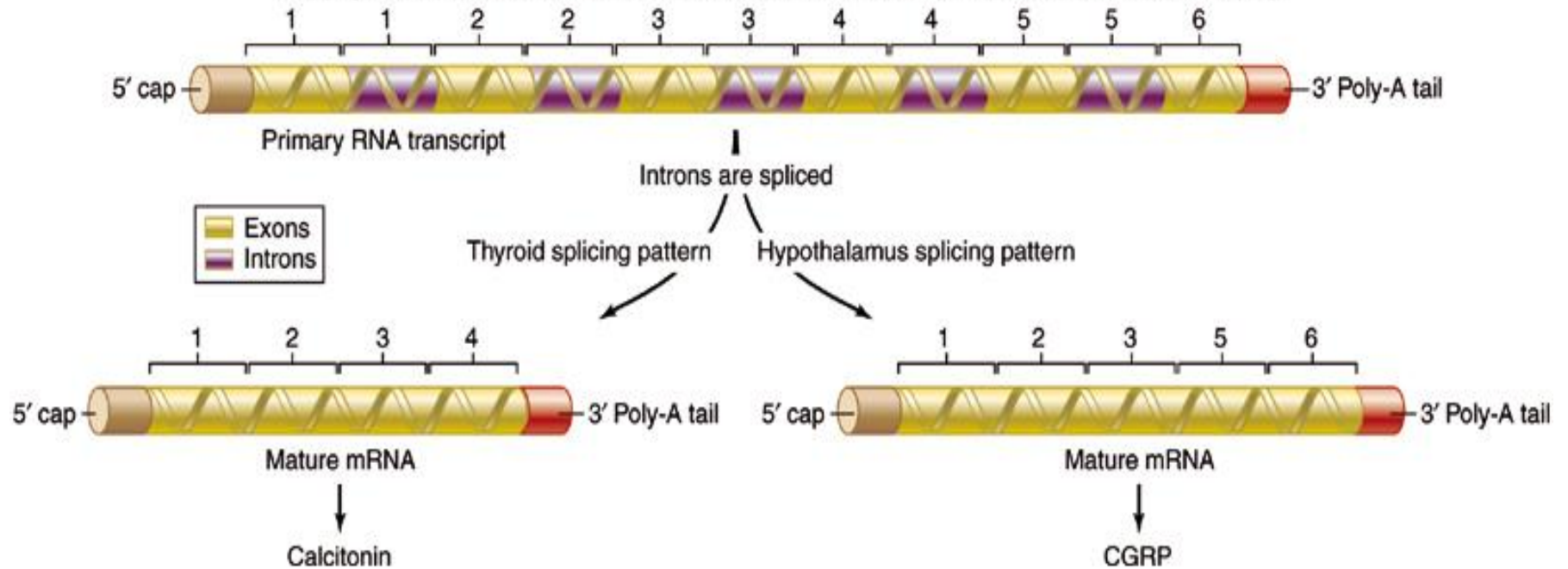


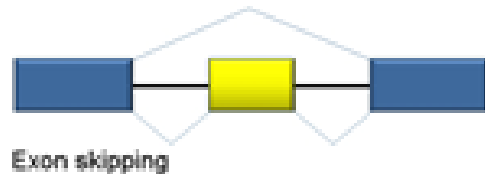
Figure 6–31. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

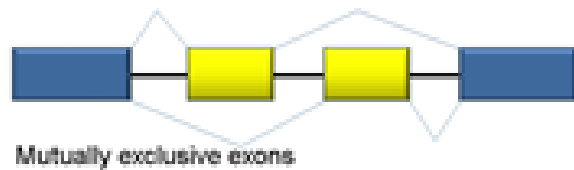


**Calcitonin Gene Related Peptide**

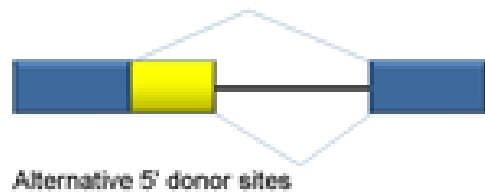
*Sono generalmente riconosciute cinque modalità di splicing alternativo.*



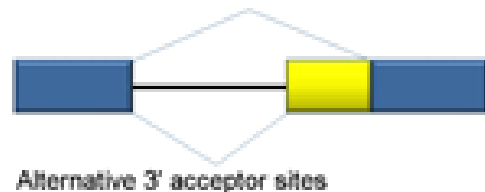
**Salto dell'esone:** un esone può essere eliminato dal trascritto primario. Questa è la modalità più comune di splicing nel pre-mRNA dei mammiferi



**Esone mutualmente esclusivo:** solo uno di due esoni viene mantenuto nell'mRNA maturo, non entrambi



**Sito di taglio alternativo 5' :** viene usato un sito di taglio al 5' alternativo, cambiando l'estremità 3' dell'esone a mont



**Sito di taglio alternativo 3' :** viene usato un sito di taglio al 3' alternativo, cambiando l'estremità 5' dell'esone a valle



**Introne trattenuto:** i siti di taglio di un introne possono non essere riconosciuti. In questo caso l'introne non viene eliminato dal trascritto di mRNA. Se l'introne trattenuto si trova nella regione codificante, esso non deve alterare la cornice di lettura degli esoni. Se avviene il cambiamento di quest'ultima, esso potrebbe generare una proteina trunca o non funzionale

# Splicing mutualmente esclusivo

Per ingombro sterico dei fattori di splicing quando due esoni alternativi hanno siti di taglio negli introni che sono molto vicini.

Presenza di siti di taglio diversi negli introni (es. AU-AC-  
---GU-AC----GU-AG)

Decadimento mediato da un codone non senso: solo gli mRNA con uno dei due esoni sono stabili. Quello con entrambi viene degradato da proteine del sistema NDM

- Ci sono diverse modalità con cui un gene può produrre trascritti alternativi
- Inizi alternativi della trascrizione
- Terminazioni alternative della trascrizione
- Splicing alternativi:
  - Introni trattenuti
  - Siti di splicing alternativi
  - Esoni cassetta (exon skipping)
  - Esoni mutualmente esclusivi
- Gli esoni che invece sono sempre presenti in tutti i trascritti sono detti “**esoni costitutivi**”

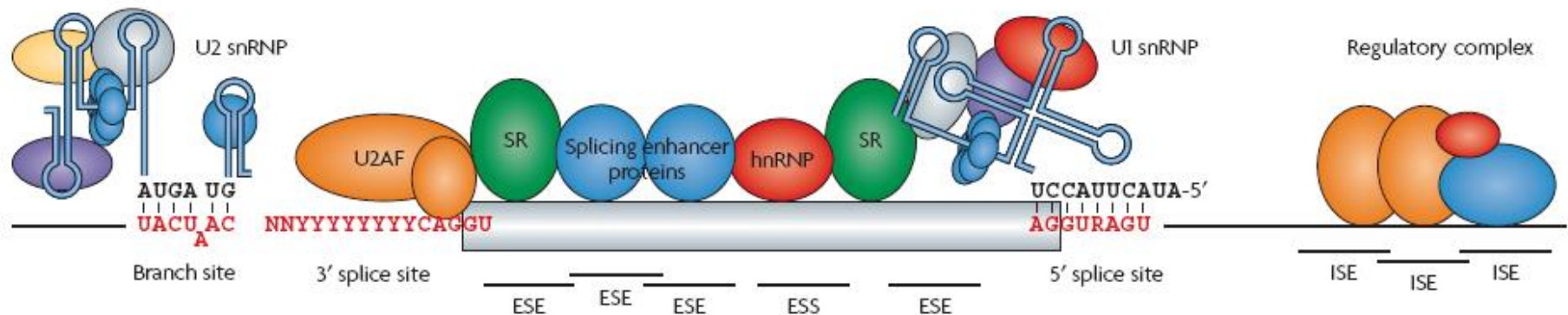
# RNA splicing – mechanisms for diversity

## Regulating splicing

Enhancer proteins and/or inhibitory proteins associate with short motifs in introns and/or exons

Motifs:

|     |                            |
|-----|----------------------------|
| ESE | exon splicing enhancer     |
| ESS | exon splicing suppressor   |
| ISE | intron splicing enhancer   |
| ISS | intron splicing suppressor |



# Posttranscriptional Regulation

- **RNA editing** creates mature mRNA that are not truly encoded by the genome.
- For example –
  - apolipoprotein B exists in 2 isoforms
  - one isoform is produced by editing the mRNA to create a stop codon
  - this RNA editing is tissue-specific



**L'RNA Editing: processo diverso dallo splicing che porta a un cambiamento nella sequenza dell'RNA tale che esso differisce dalla sequenza del DNA stampo.**



**Scoperto nei mitocondri dei tripanosomi.**



**Comune nei mitocondri, cloroplasti e alcuni geni delle piante.**



**Presente in alcuni geni dei mammiferi.**

# RNA editing

RNA editing has been reported in:

protozoa, plants and mammals, not yet fungi or prokaryotes  
nuclear, mitochondrial, chloroplast, and viral RNAs  
mRNA, tRNA, rRNA

Two general types

Base modification (deaminase)

A to I double-stranded mechanism, seen in viruses, human genes

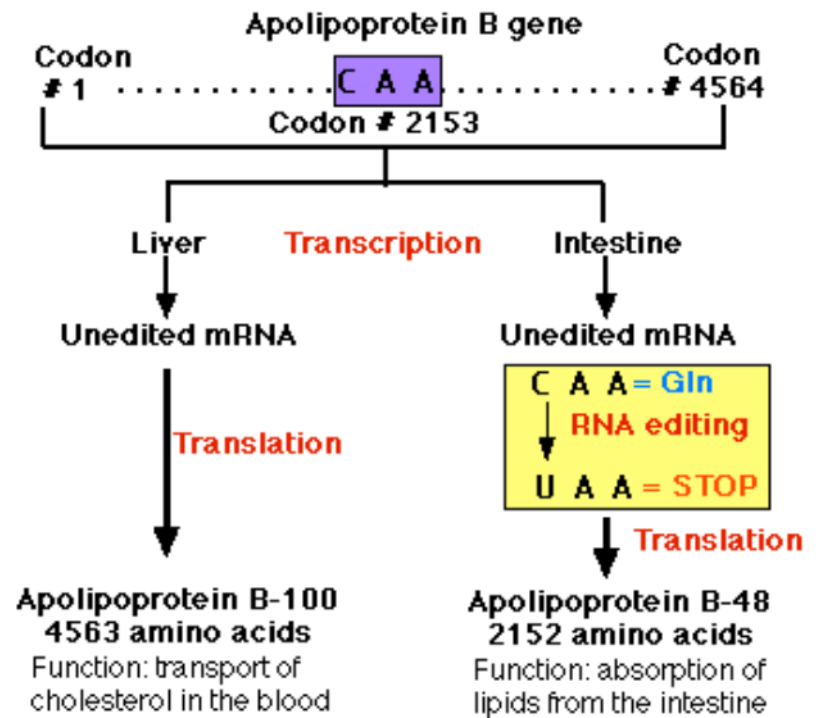
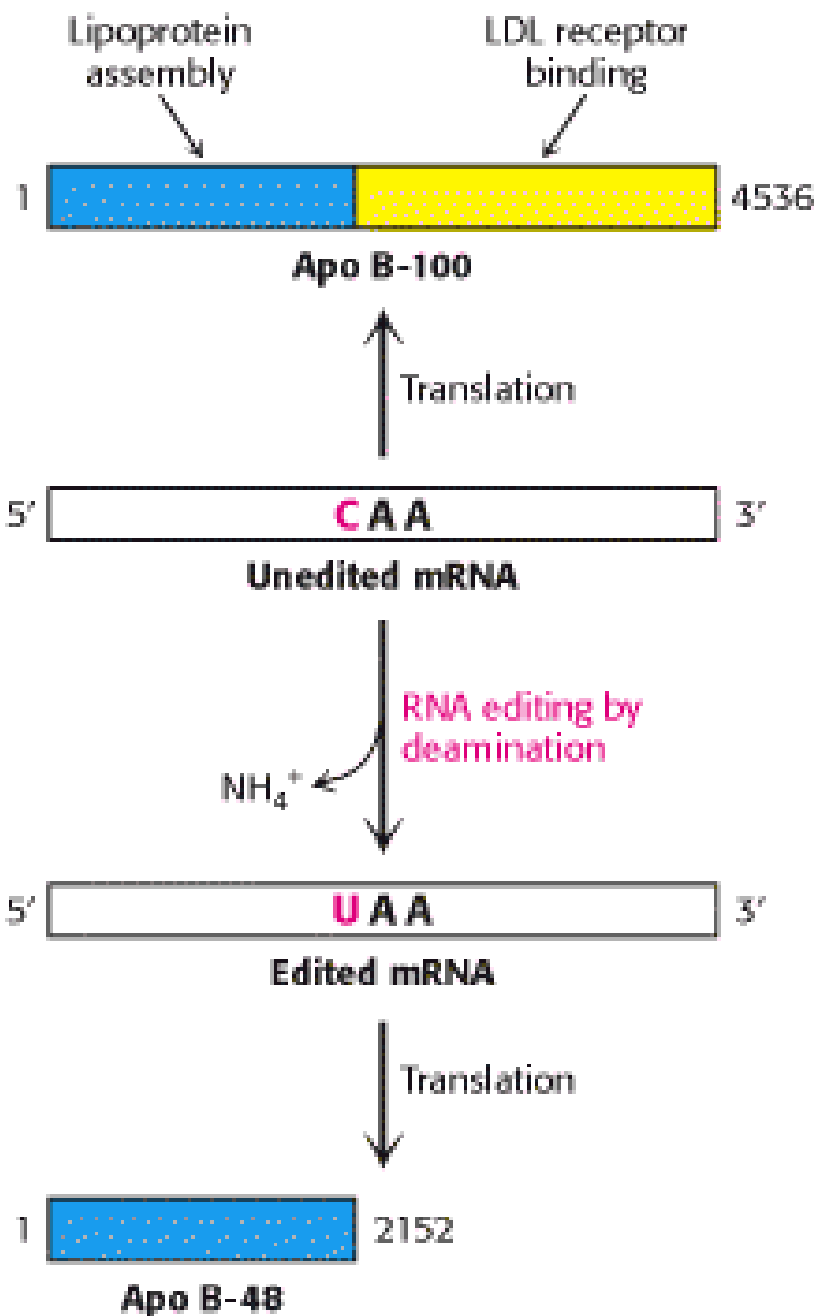
C to U, U to C seen in chloroplasts, plant mitochondria, human genes

Insertion/deletion

U insertion/deletion, seen in kinetoplastid protozoa

mono/di nucleotide insertion, seen in *Physarum*

nucleotide replacement, seen in *Acanthamoeba* tRNAs



### RNA Editing.

Enzyme-catalyzed deamination of a specific cytidine residue in the mRNA for apolipoprotein B-100 changes a codon for glutamine (CAA) to a stop codon (UAA). Apolipoprotein B-48, a truncated version of the protein lacking the LDL receptor-binding domain, is generated by this posttranscriptional change in the mRNA sequence.

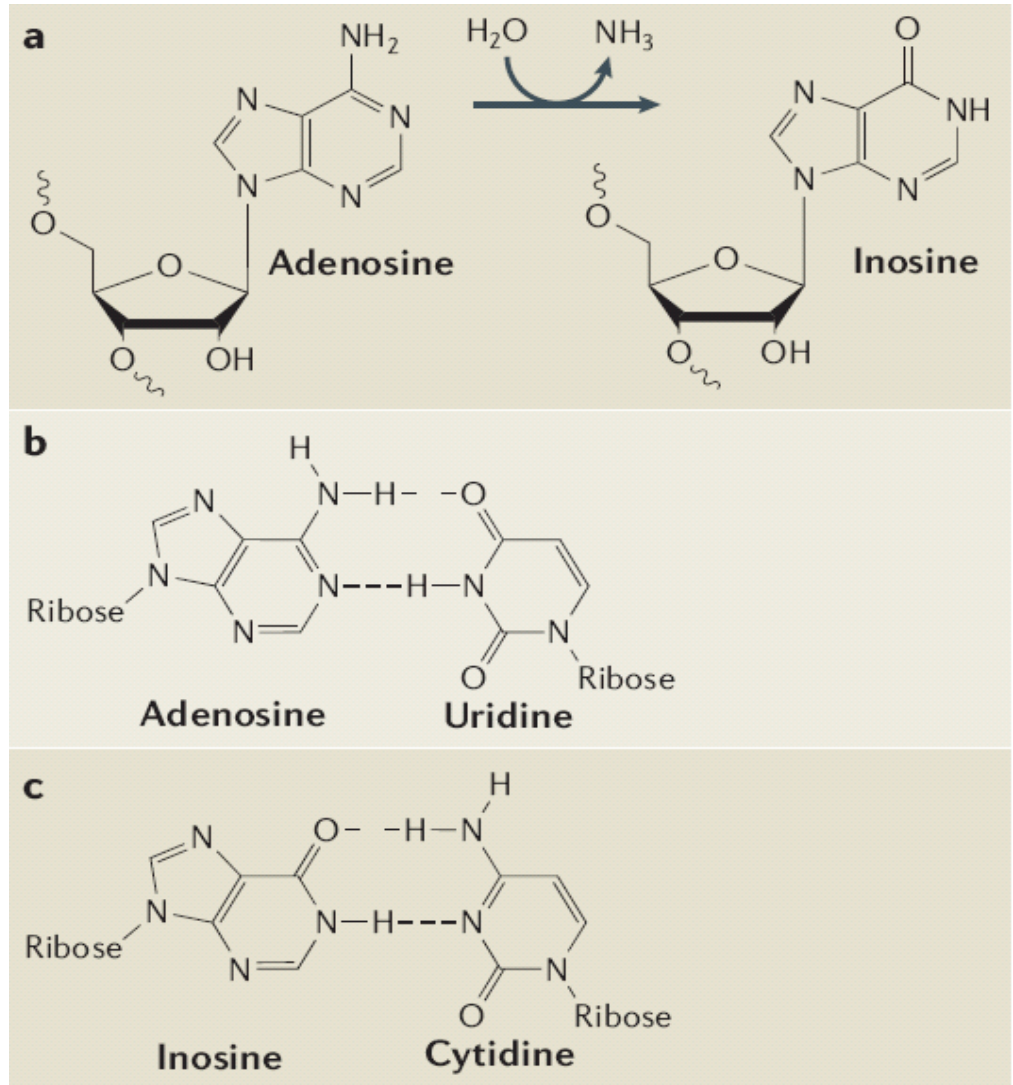
# A to I RNA editing

deamination of A yields I

I preferentially pairs with C

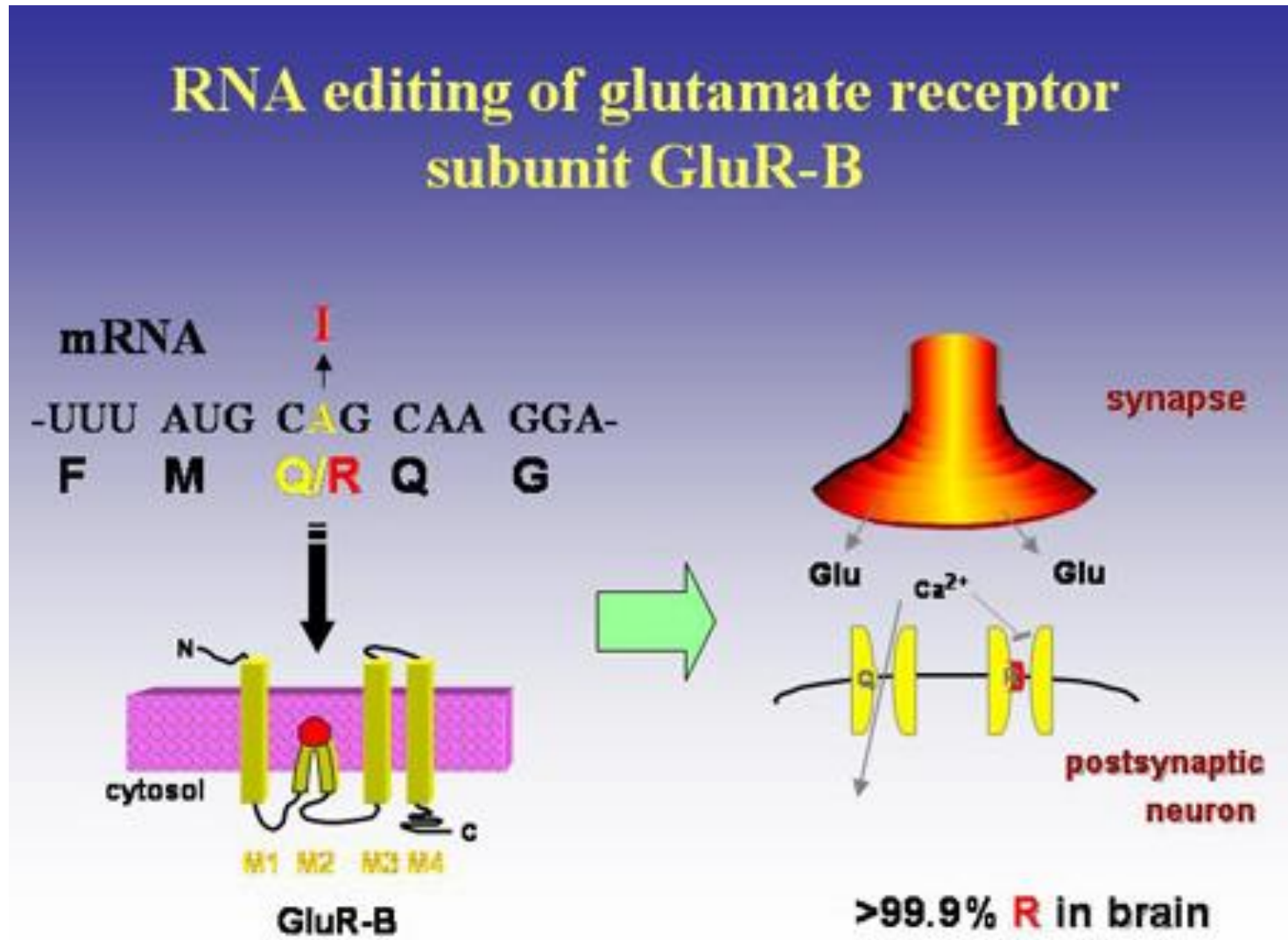
after DNA replication, A  
has effectively become G

most common mechanism  
in humans



# A to I Editing in RNA

- 1<sup>st</sup> case:  
Glutamate  
Receptor B
- I read as G  
during  
translation,  
R(arginine)  
instead of Q  
(glutamine)
- Affects  $\text{Ca}^{2+}$   
permeability,  
intracellular  
trafficking of  
receptor



# Important Examples of A to I Editing in Mammals

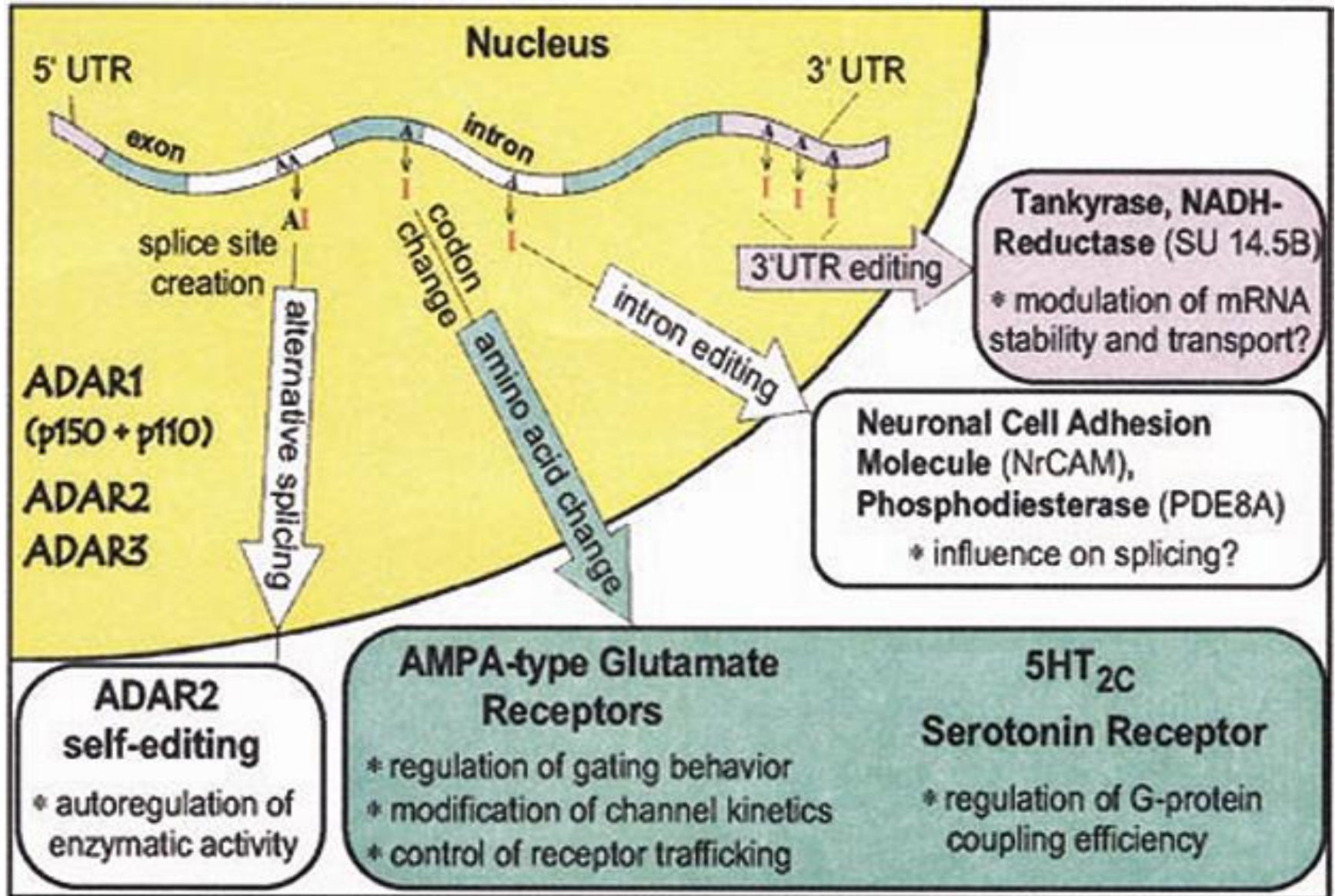


Table 1 | **The known transcripts that undergo RNA editing and the functional consequence on the enco**

| Organism                       | Transcript                                             | Effects of editing                                                                 | Functional consequence                                       |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>Cytosine to uracil</b>      |                                                        |                                                                                    |                                                              |
| Mammals                        | <i>ApoB</i><br><i>Nf1</i>                              | Q → STOP<br>R → STOP                                                               | Stop codon, generation of ApoB48 isoform (truncated protein) |
| <b>Adenine to inosine</b>      |                                                        |                                                                                    |                                                              |
| Mammals                        | <i>GluR-B</i>                                          | Q → R                                                                              | Decreased Ca <sup>2+</sup> ion permeability                  |
|                                | <i>GluR-B</i>                                          | R → G                                                                              | Increased rate of recovery receptor desensitization          |
|                                | <i>GluR-C</i>                                          | R → G                                                                              | Unknown                                                      |
|                                | <i>GluR-D</i>                                          | R → G                                                                              | Unknown                                                      |
|                                | <i>GluR-5</i>                                          | Q → R                                                                              | Unknown                                                      |
|                                | <i>GluR-6</i>                                          | Q → R                                                                              | Increased Ca <sup>2+</sup> ion permeability                  |
|                                | <i>GluR-6</i>                                          | I → V                                                                              | Modulated Ca <sup>2+</sup> ion permeability                  |
|                                | <i>GluR-6</i>                                          | Y → C                                                                              | Unknown                                                      |
|                                | <i>5-HT<sub>2C</sub>R</i>                              | I → V, N → S, I → V                                                                | Reduced G-protein coupling                                   |
|                                | <i>5-HT<sub>2C</sub>R</i>                              | I → M                                                                              | Unknown                                                      |
|                                | <i>5-HT<sub>2C</sub>R</i>                              | N → D                                                                              | Unknown                                                      |
|                                | <i>5-HT<sub>2C</sub>R</i>                              | N → G                                                                              | Unknown                                                      |
|                                | <i>Adar2</i>                                           | Intronic nt changed,<br>new splice acceptor site                                   | Generation of isoform                                        |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Ca <sup>2+</sup> channel ( <i>cac</i> )<br>α1-subunit  | S → G, I → M, N → S<br>N → S, S → G, M → V<br>N → S, N → G, N → D,<br>R → G        | Unknown                                                      |
|                                | Na <sup>2+</sup> channel ( <i>para</i> )<br>α1-subunit | 3 × Q → R, Y → C, M → V<br>N → D, K → R, N → S<br>K → R plus two silent<br>changes | Unknown                                                      |
|                                | <i>GluCl-α1</i>                                        | I → V, K → R, N → S<br>plus two silent changes                                     | Unknown                                                      |
|                                | <i>Adar</i>                                            | S → G                                                                              | Unknown                                                      |
| <i>Loligo peali</i><br>(squid) | K <sup>+</sup> channel                                 | Y → C, I → V<br>10 other aa changes                                                | Slow inactivation and closure of the channel<br>Unknown      |

## Lo splicing è necessario per l'esportazione dell'mRNA



Splicing



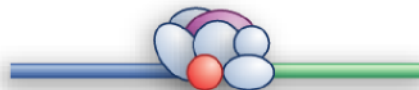
La proteina si lega al complesso di splicing



La proteina resta sulla giunzione esone-esone



Il complesso (EJC) si assembla sulla giunzione esone-esone

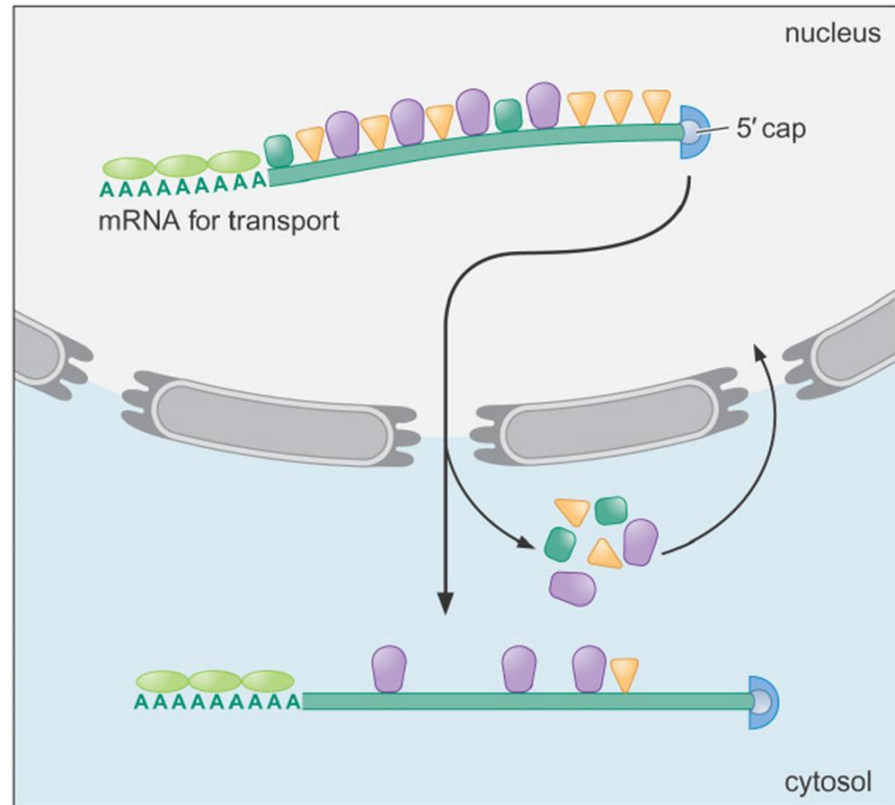


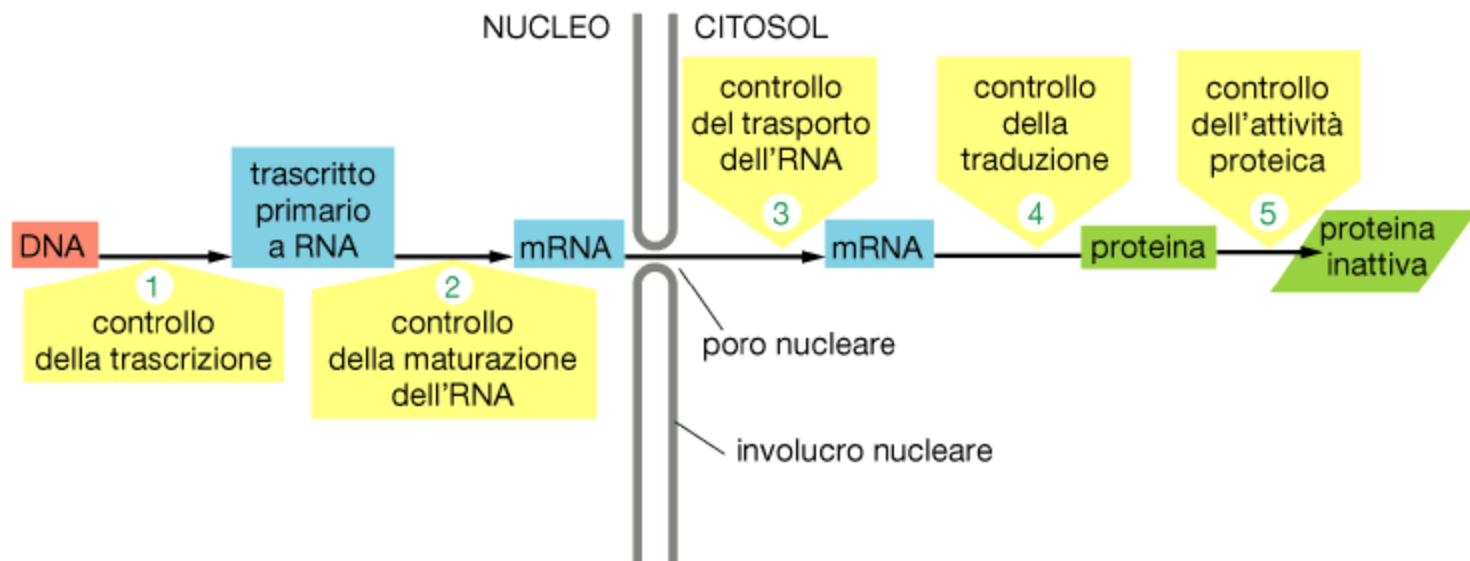
EJC lega proteine coinvolte nell'esportazione, nella localizzazione e nel decadimento dell'RNA

- Movement from the nucleus to the cytoplasm is an **active** and carefully **regulated** process.

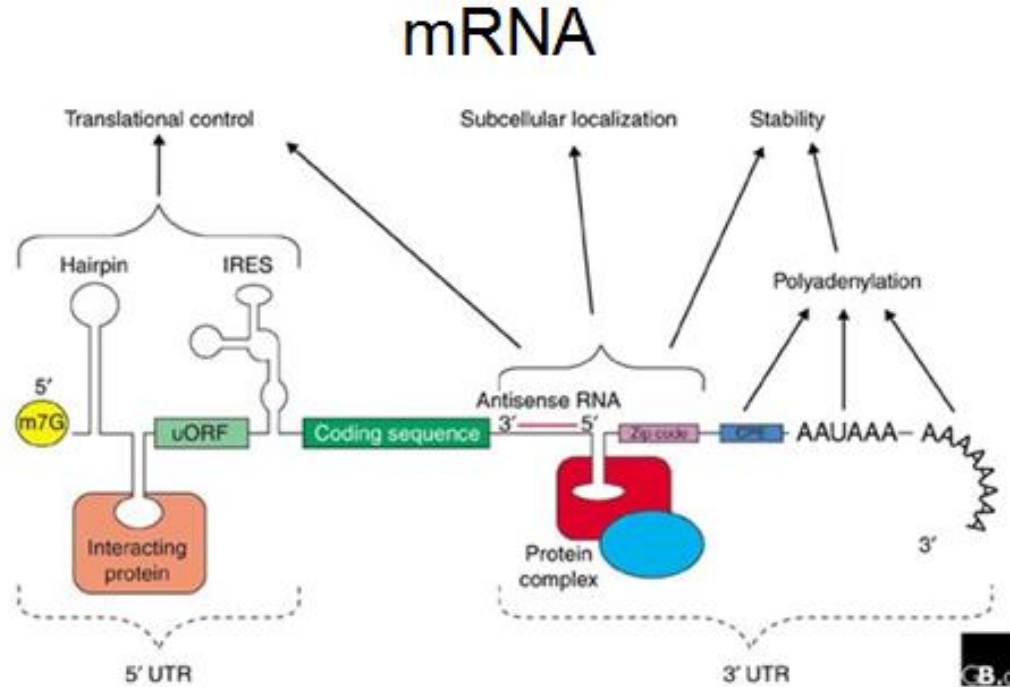
- The **damaged, misprocessed and liberated introns** are retained in the nucleus and degraded.

1. A typical mature mRNA carries a collection of proteins that identifies it as being ready for transport.
2. Export takes place through the **nuclear pore complex**.





# Struttura generale di un mRNA eucariotico e i suoi siti di regolazione



**5'UTR** : 7-methyl-guanine (**cap**); hairpin-like secondary structure; RNA-protein interactions; upstream open reading frames (**uORFs**); internal ribosome entry sites (**Internal Ribosome Entry Site- IRES**).

**3'UTR: antisense RNA interactions (miRNA)**; RNA-protein interactions, involving also multiprotein complexes; cytoplasmic polyadenylation elements (**CPE**); **poly(A)** tail and variation of its size.