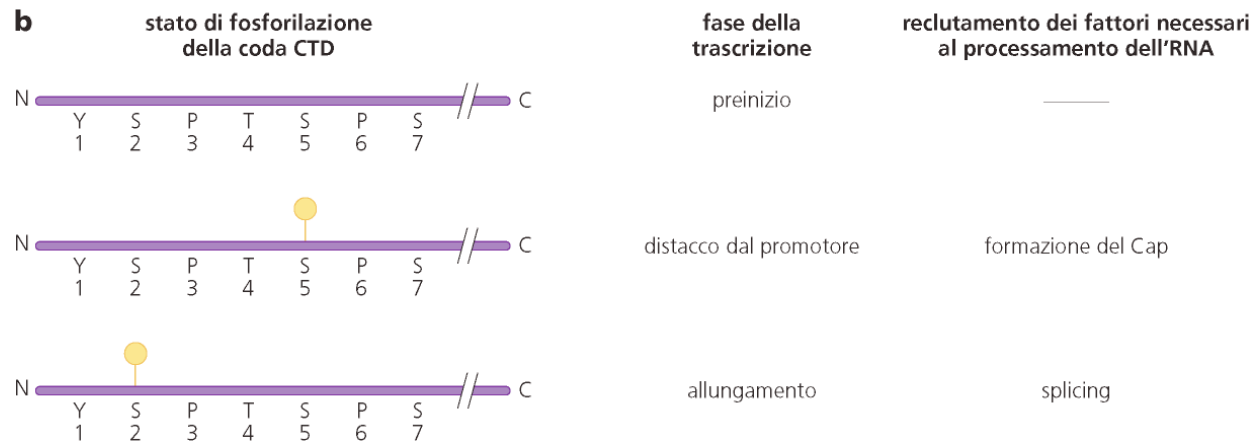
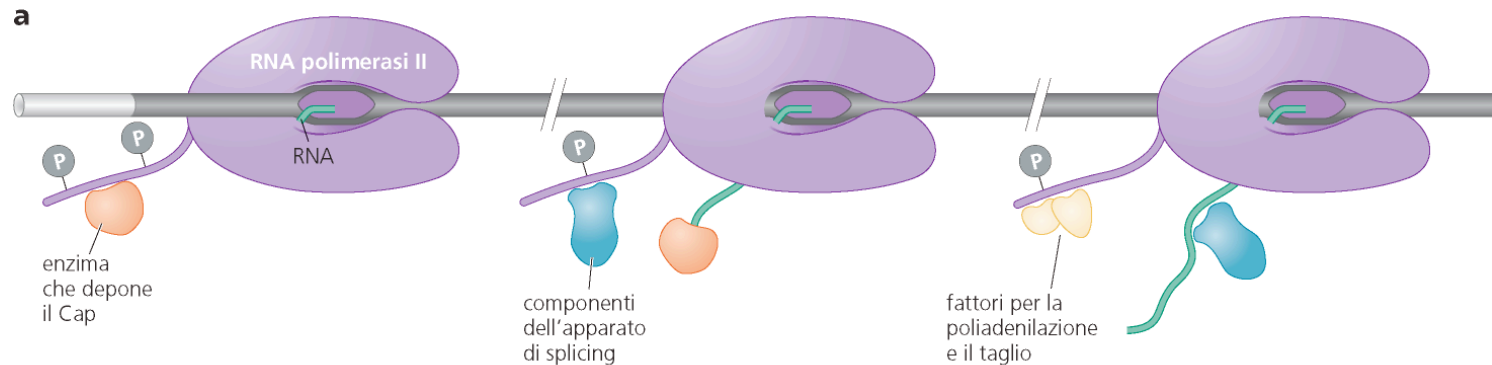


La maturazione ed il processamento dell' RNA

- Capping
- Splicing
- Poliadenilazione
- Editing

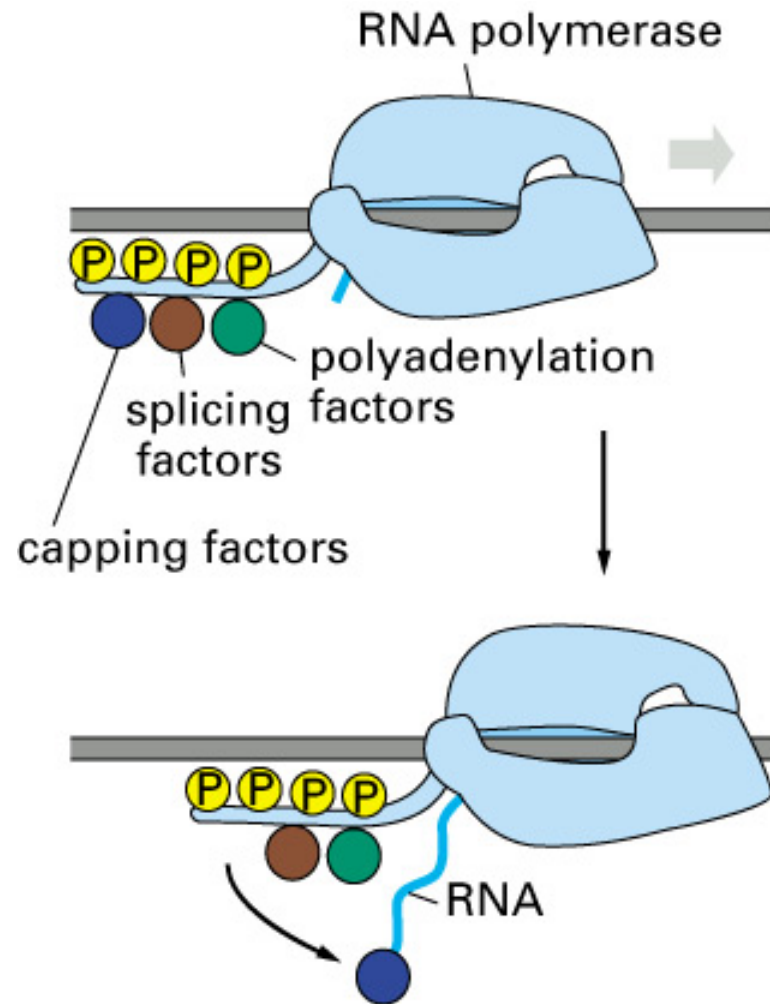
Fattori per la maturazione e processamento del RNA

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

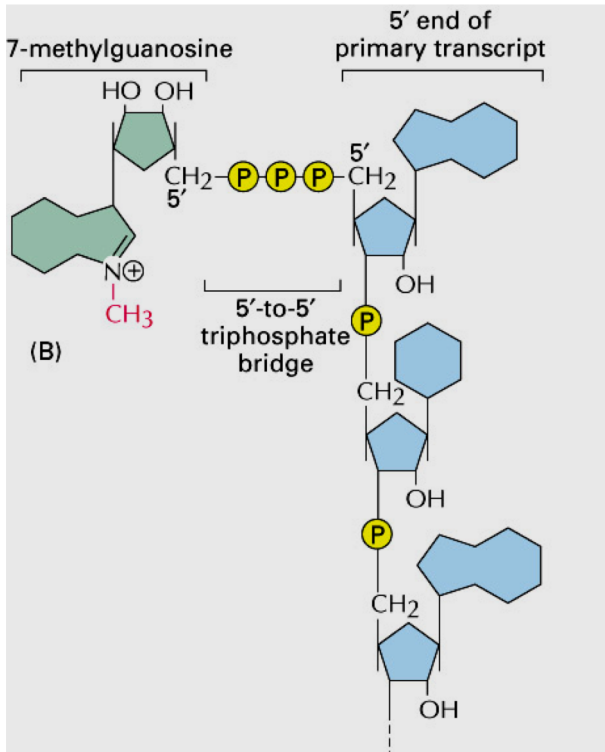


RNA factory

- Gli enzimi per il processamento dell'RNA sono portati dalla coda CTD della RNA pol II (è lunga 7X il resto dell'enzima).

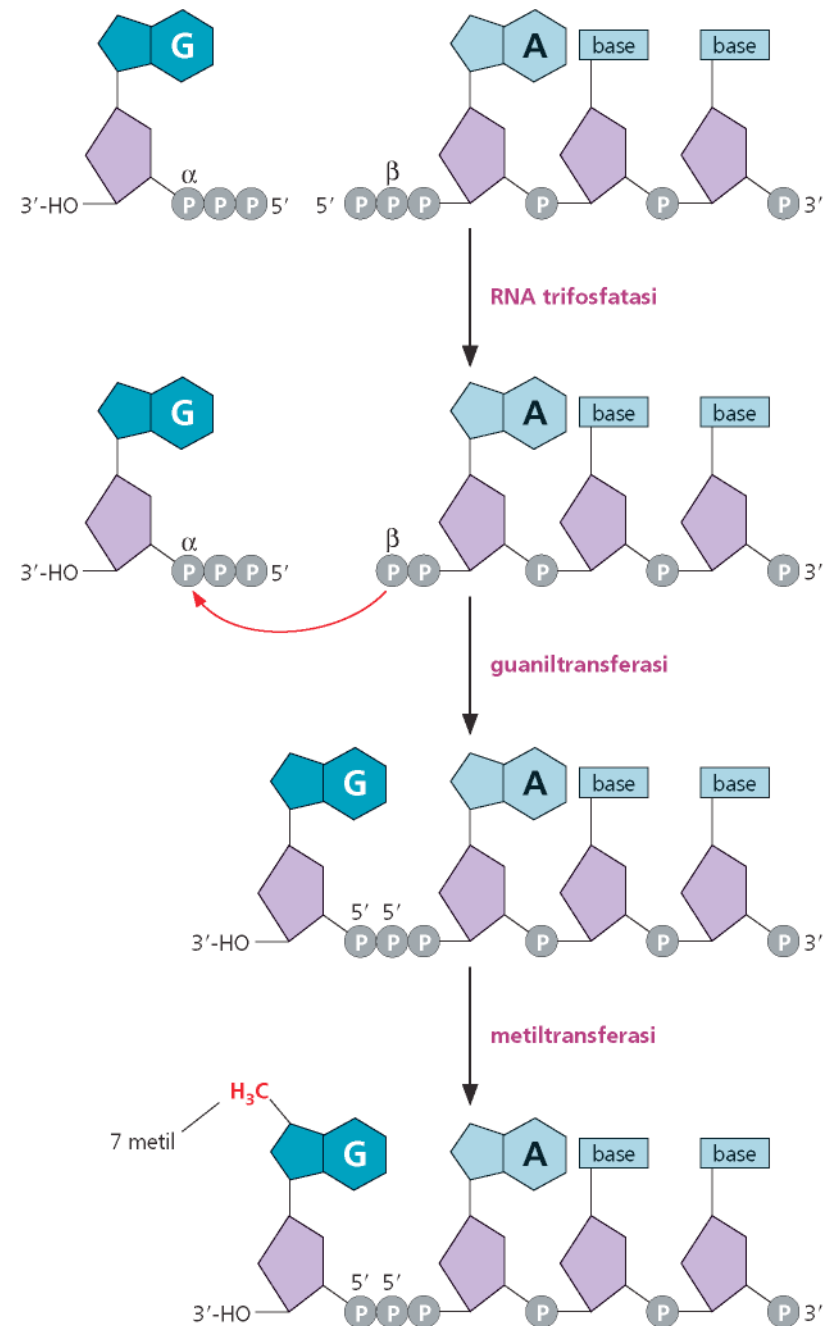


RNA capping



Tre enzimi:

- Fosfatazi
- Guanil transferasi
- Metil transferasi



3' terminale di mRNA eucariotici

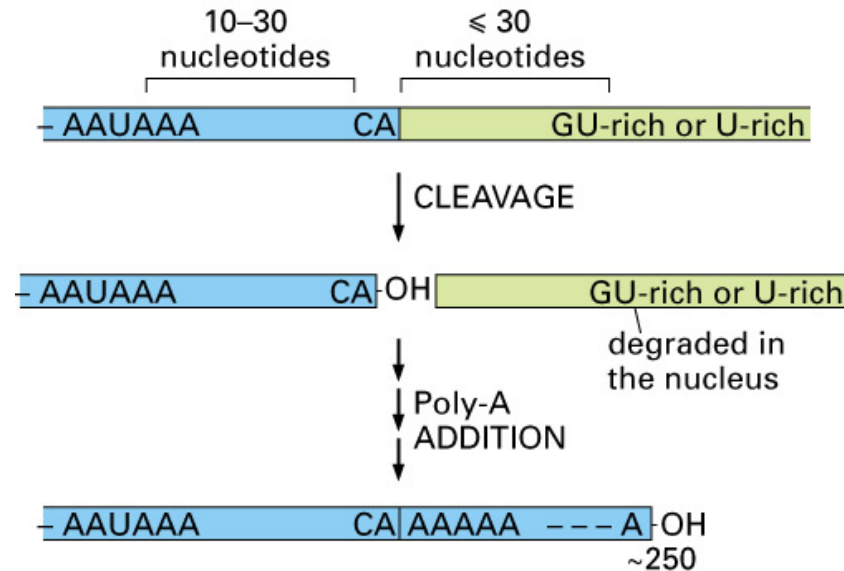


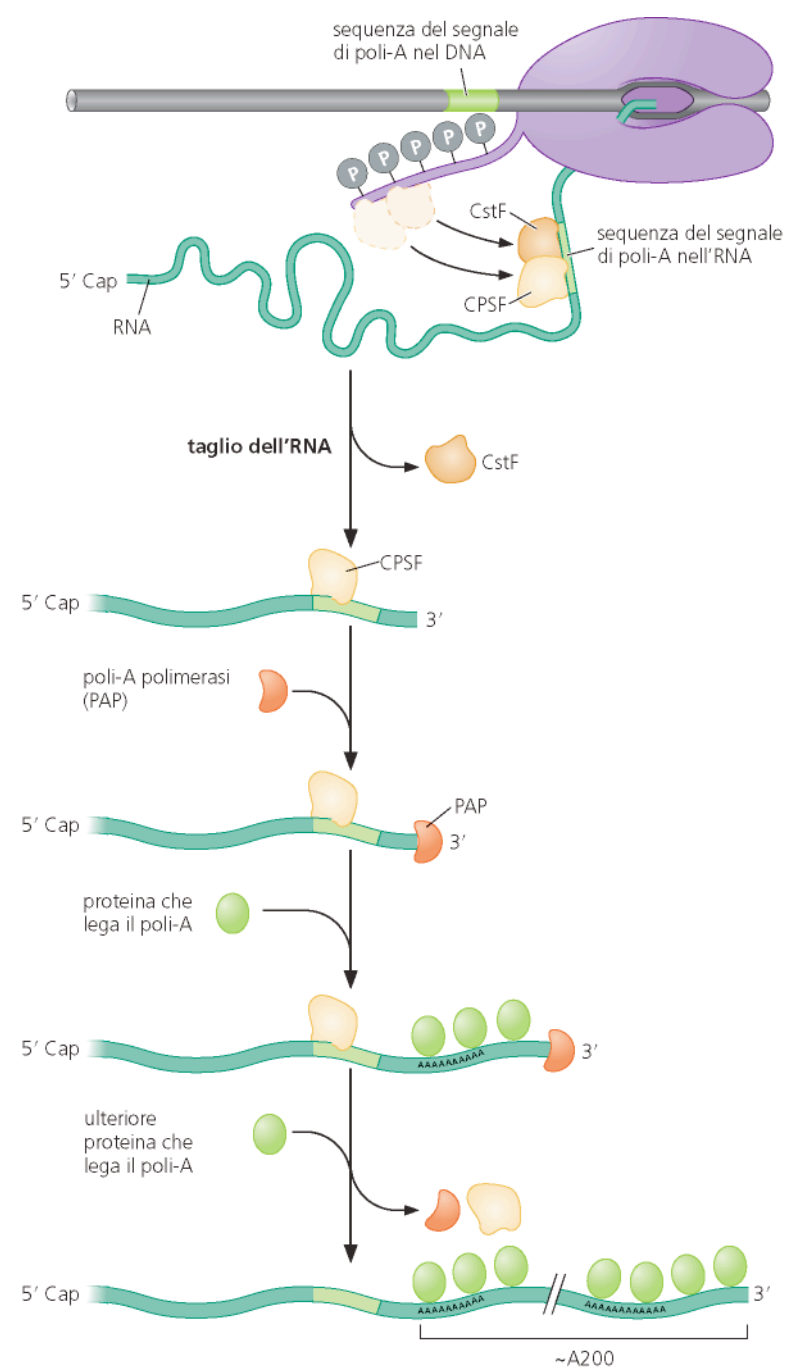
Figure 6-37. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Sequenze consenso

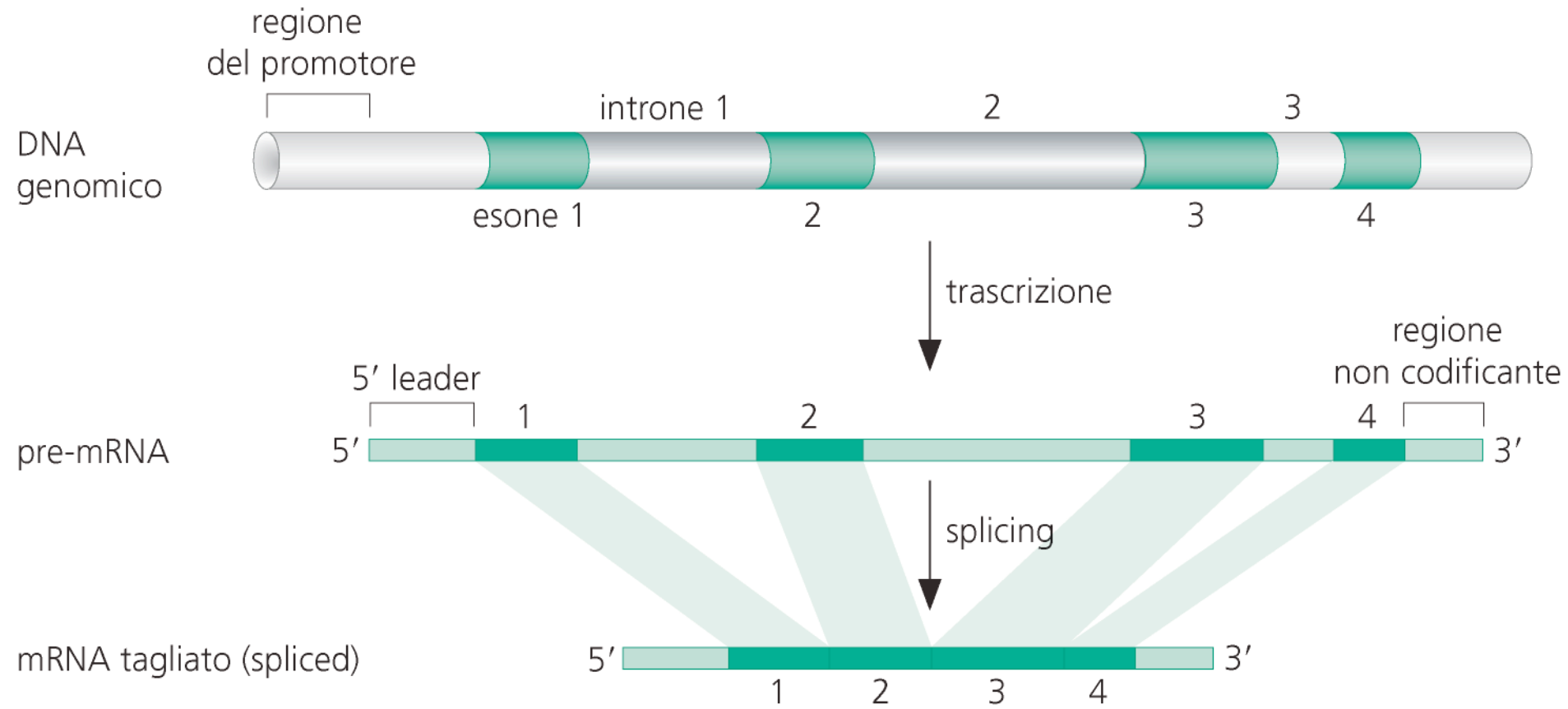
- **AAUAAA** è riconosciuta da *cleavage and polyadenylation specific factor (CPSF)*
- La regione **GU-rich** da *Cleavage stimulation factor F (CstF)*

Produzione del 3' terminale di mRNA eucariotici

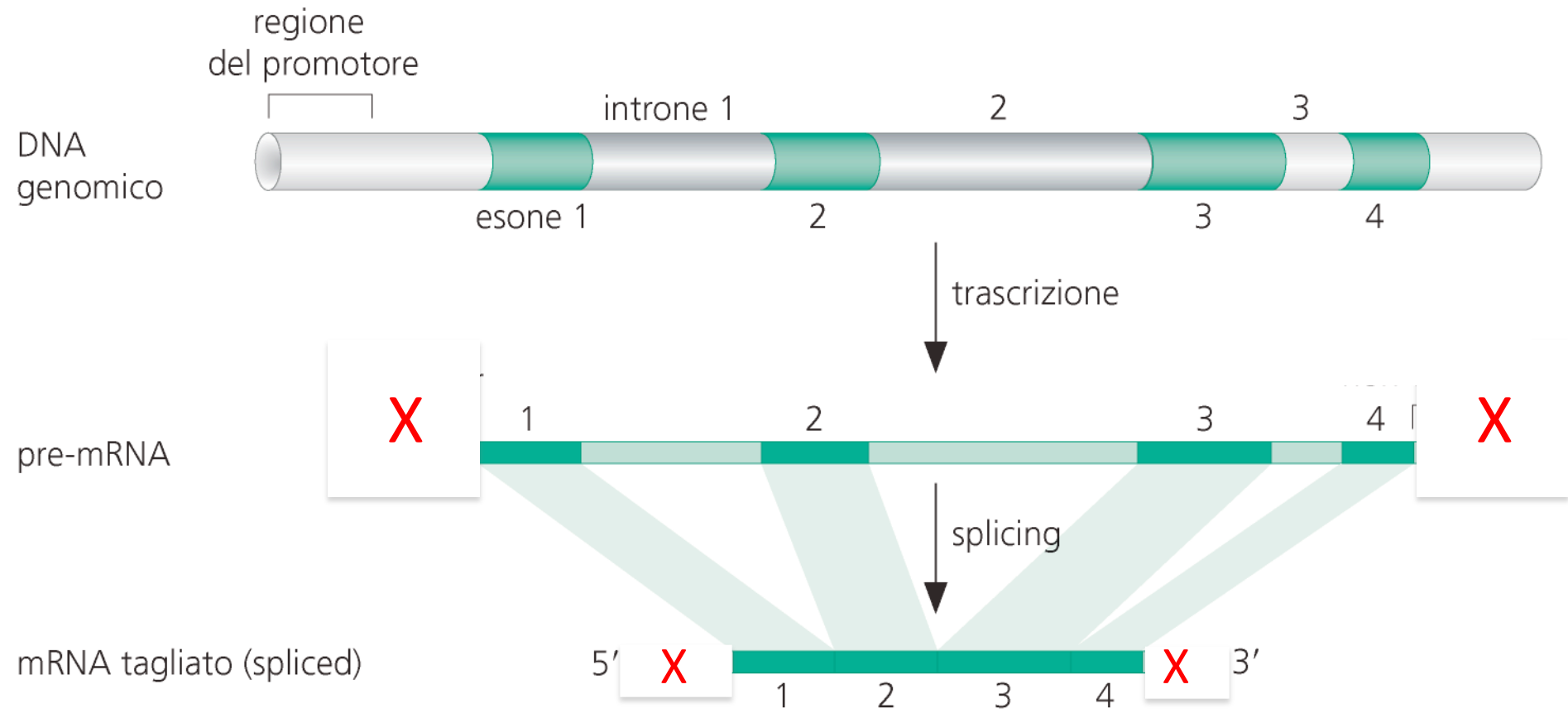
- La sequenza AUAAA è riconosciuta da **CPSF** (*cleavage and polyadenylation specificity factor*), la GU-rich da **CstF** (*cleavage stimulation factor*), poi reclutano altri fattori che **tagliano** l'RNA e viene reclutata **poli-A-polimerasi (PAP)**



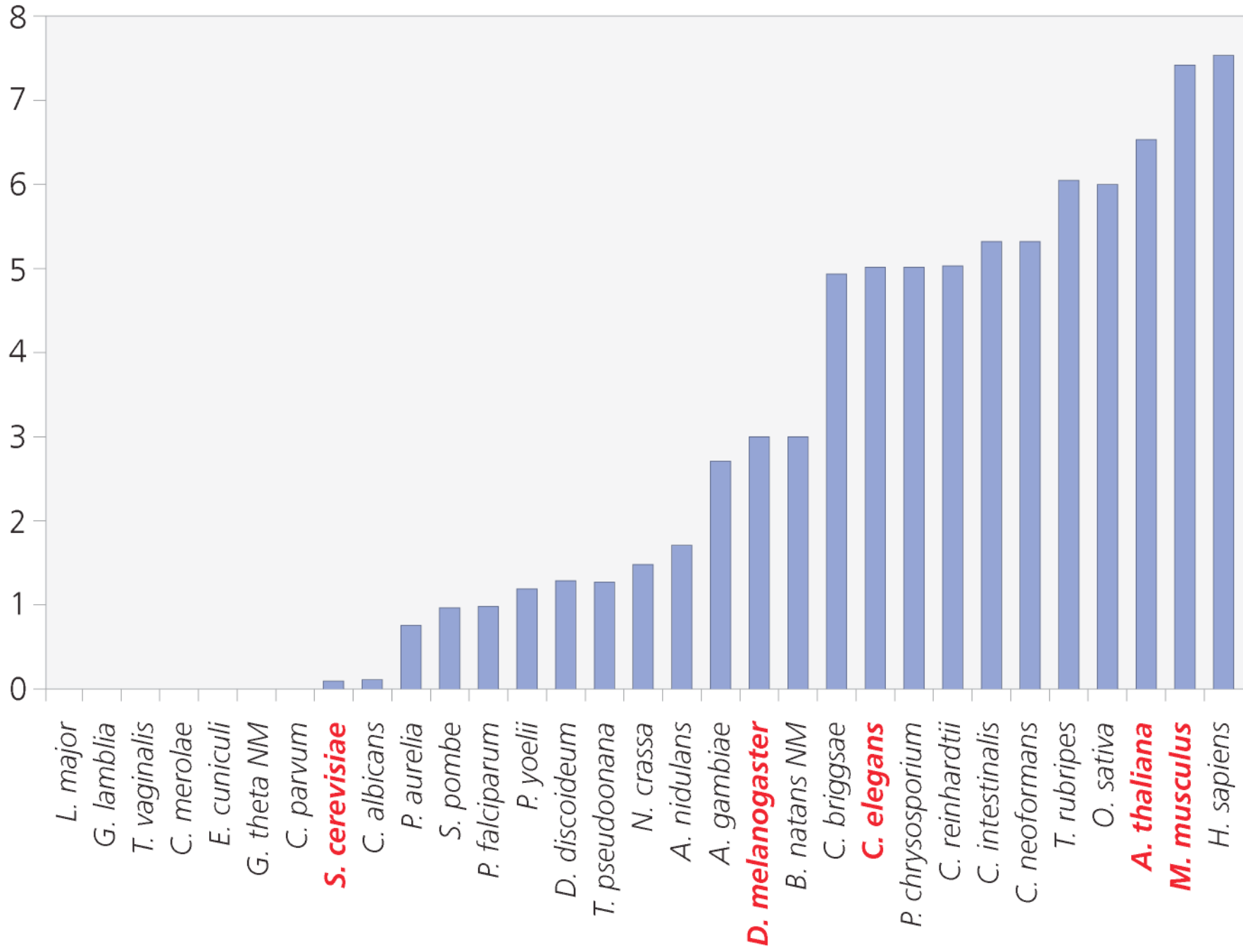
Lo splicing dell' RNA



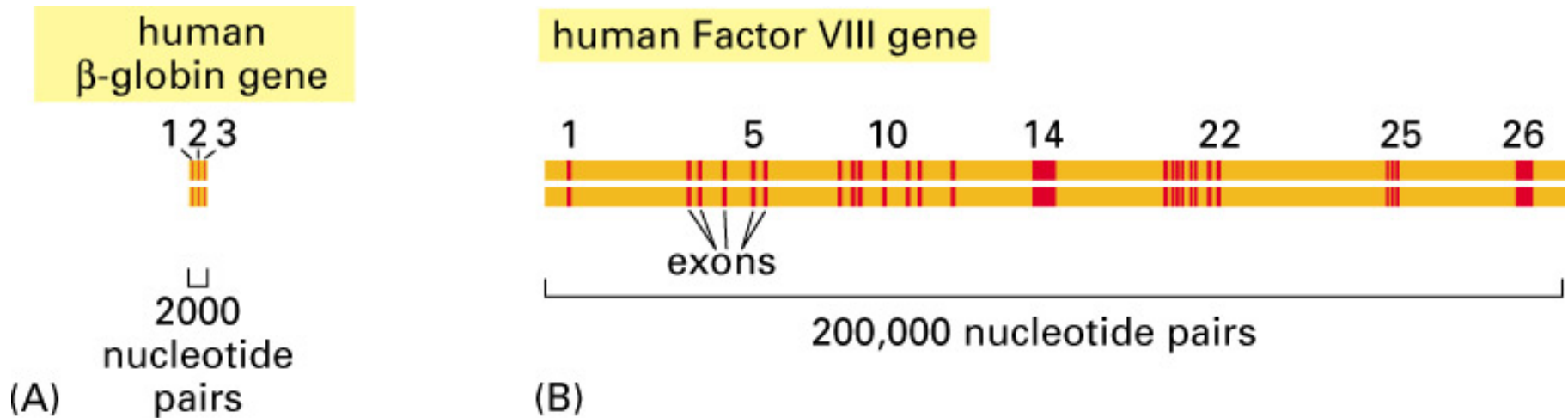
Lo splicing dell' RNA



Numero medio di introni per gene



RNA Processing



Esoni introni: esempi di due geni umani

Constitutive splicing

A piece of pre-mRNA...

theaertejradensgfgzdefhbncwhtienasjjfnaeixnsjaeodnandeoazngzon
dncoznecearthnieoznciezodejaifijeoznvaqndkgfjnigoreisjoigrep
lfdzmkogfrnbchfzofrezjceozfbluejjanfeozspfekfeapeftjgpoiurtu
fjeisaqwshtashejeogedkgeegejfebnvhgjfkdlsmqpaozeirutghvfjans
ediefekogkorpzkoeritorzgedgklpmpadgasorangedezfjgnetonskcc

Constitutive splicing

A piece of pre-mRNA...

theaertejradensgfhzdefhbcwhtienasjjfnaeixnsjaeodnandeoazngzon
dncoznec**earth**nieoznciezodejaifijeoznvaqndkgfjnigore**is**joigrep
lfdzmkogfrnbchfzofrezjceozf**blue**jjanfeozspfekfeapeftjgpoiurtu
fjeisaqwsht**as**hejeogedkgeeegejfebnvhgjfkdlsmqpaozeirutghvfjans
edief**an**kogkorpzkoeritorzgedgklpmpadgas**orange**dezfjgnetonskcc

The earth is blue as an orange

La terre est bleue comme une orange, Paul Eluard, 1929

Constitutive splicing: splicing events that occur in all cells in all conditions.

Sequenze consenso per gli introni

Come vengono distinti gli esoni dagli introni??
Come vengono uniti gli esoni fra di loro???

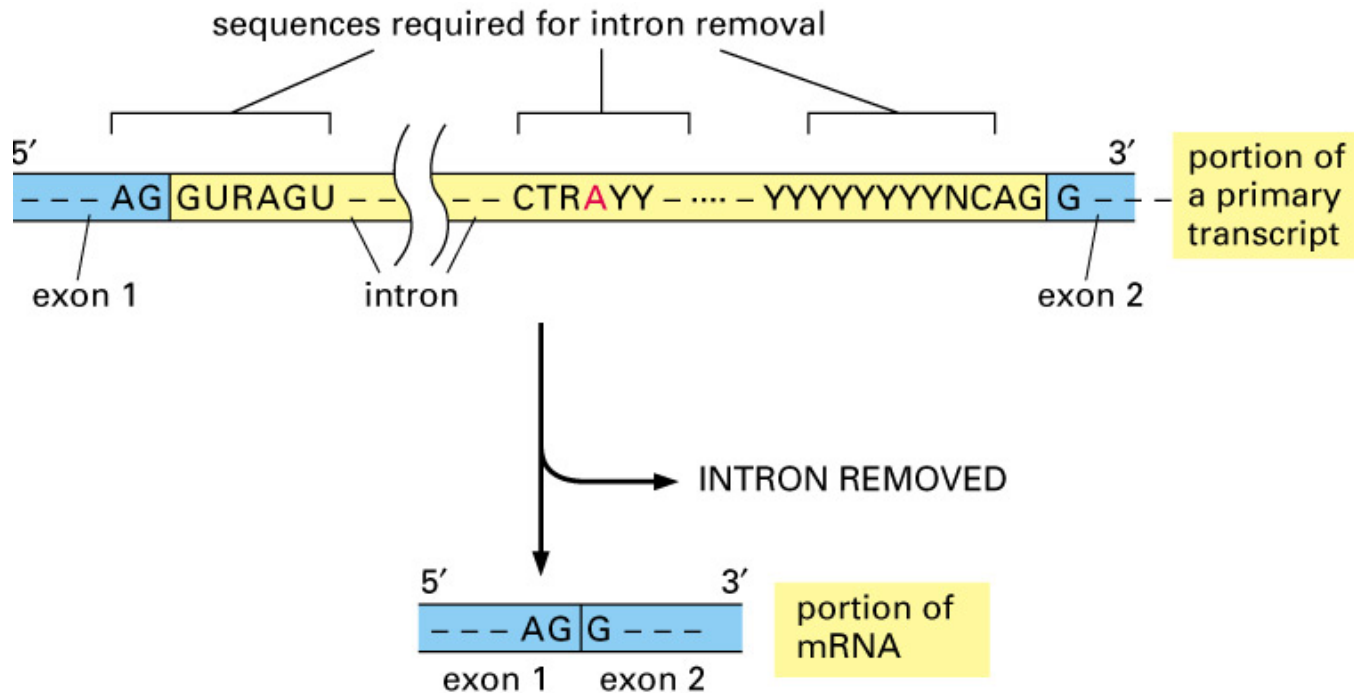


Figure 6-28. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Consensus sequence

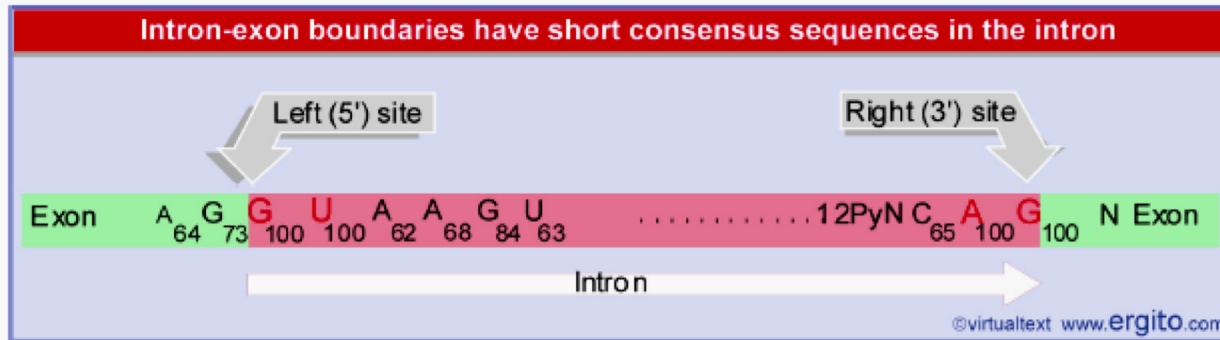


Figure 24.3 The ends of nuclear introns are defined by the GU-AG rule.

- 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 le terminazione degli introni direzionalmente .

- Il branch site nei **lieviti** è conservato e 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

lariat -> lazo

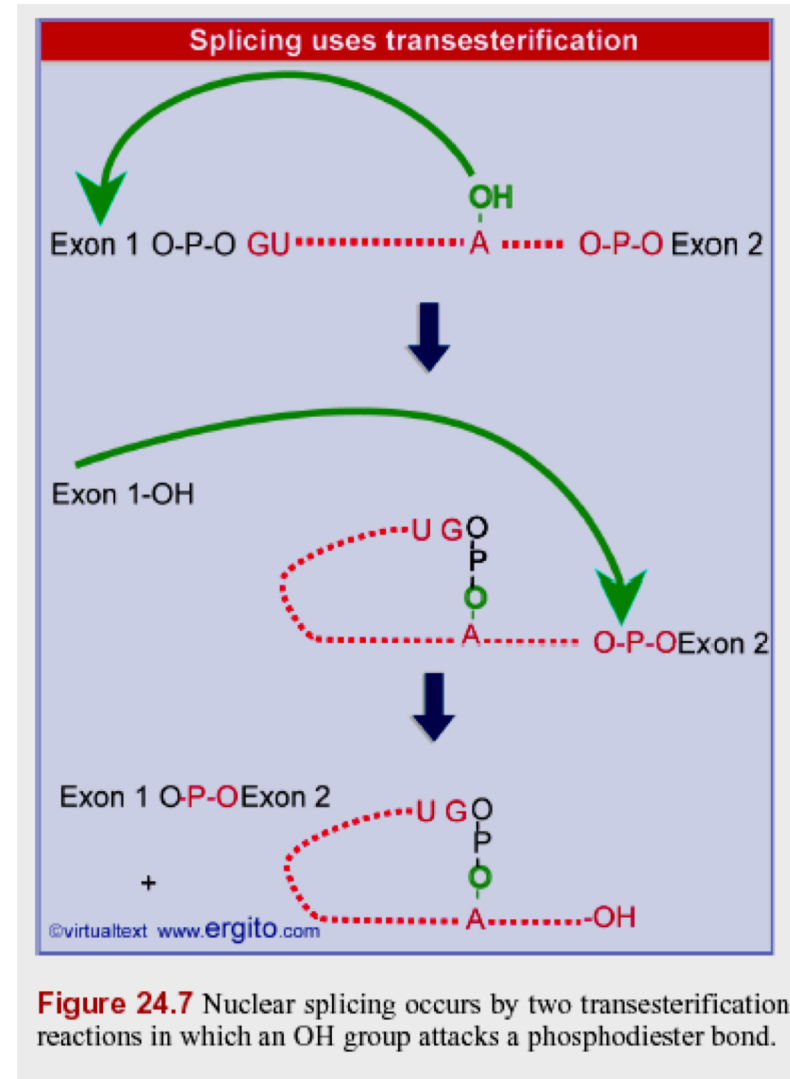


Figure 24.7 Nuclear splicing occurs by two transesterification reactions in which an OH group attacks a phosphodiester bond.

Spliceosoma

Il complesso si **assembla sequenzialmente sul pre-mRNA**, e lo splicing avviene solo dopo che tutti i componenti si sono assemblati

Nel nucleo e nel citoplasma sono presenti molti piccoli RNA (**200-300 bp**)

Quelli nel nucleo sono chiamati **small nuclear RNAs (snRNA)**.

lo **spliceosome** include un 50-60S ribonucleoprotein particle (**RNP**) (più grande di quella del ribosoma), con 150 proteine

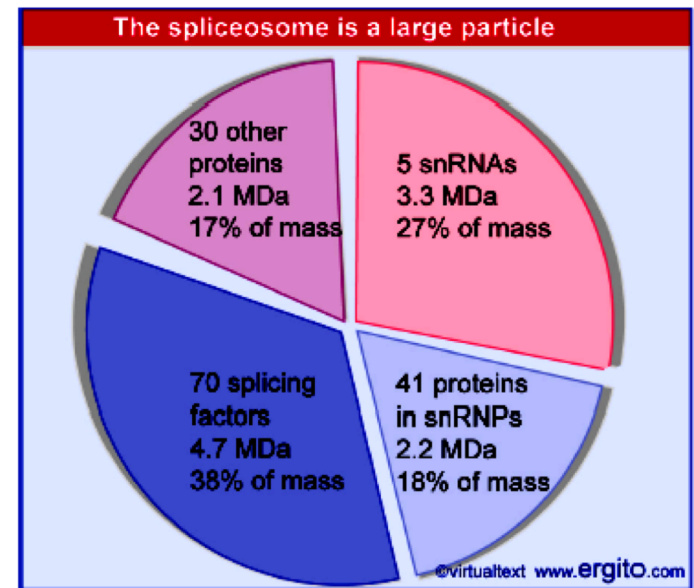


Figure 24.8 The spliceosome is ~12 MDa. 5 snRNAs account for almost half of the mass. The remaining proteins include known splicing factors and also proteins that are involved in other stages of gene expression.

Le snRNPs coinvolte nello splicing sono **U1, U2, U5, U4 e U6**. Ogni RNP contiene un solo snRNA e alcune (<20) proteine. Un nucleo strutturale comune per ogni RNP consiste in un gruppo di 8 proteine.

Le snRNPs sono necessarie per lo splicing

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

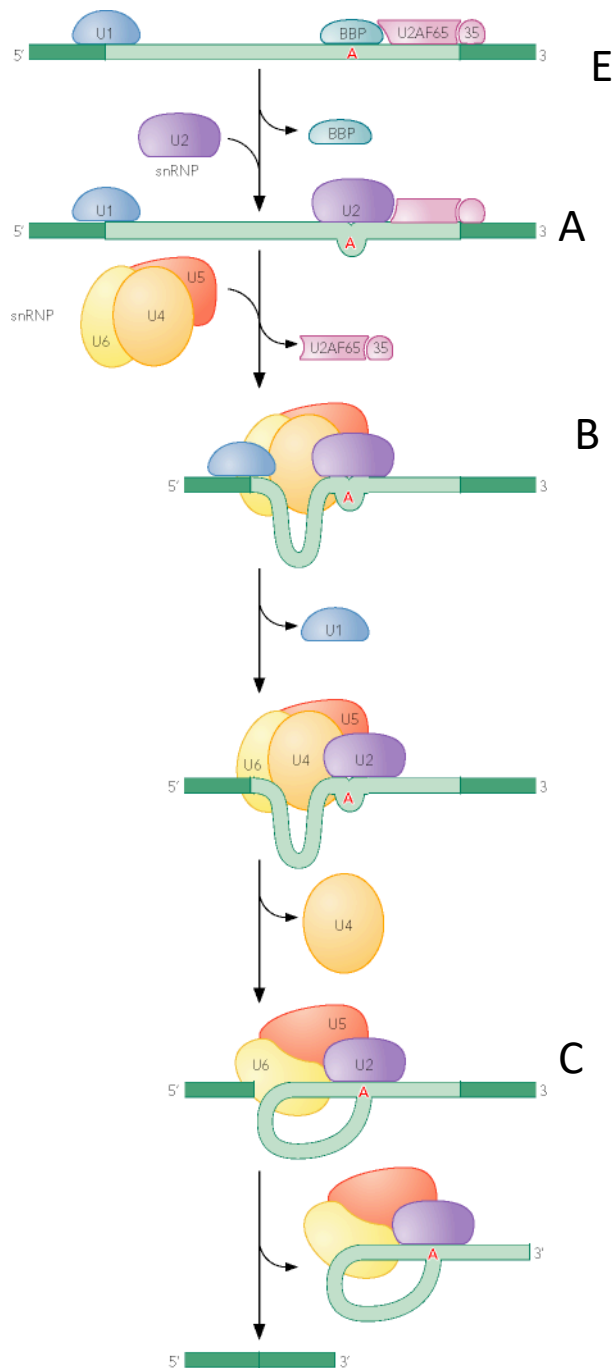
Insieme ad altre proteine addizionali, le snRNPs formano lo **spliceosome**. Tra esse: **U2AF** (U2 Auxillary Factors) e **BBP** (branch point Binding Proteins).

Le proteine agiscono in modo coordinato con la formazione di tre complessi intermedi

RNA splicing

Passaggi dello spliceosoma

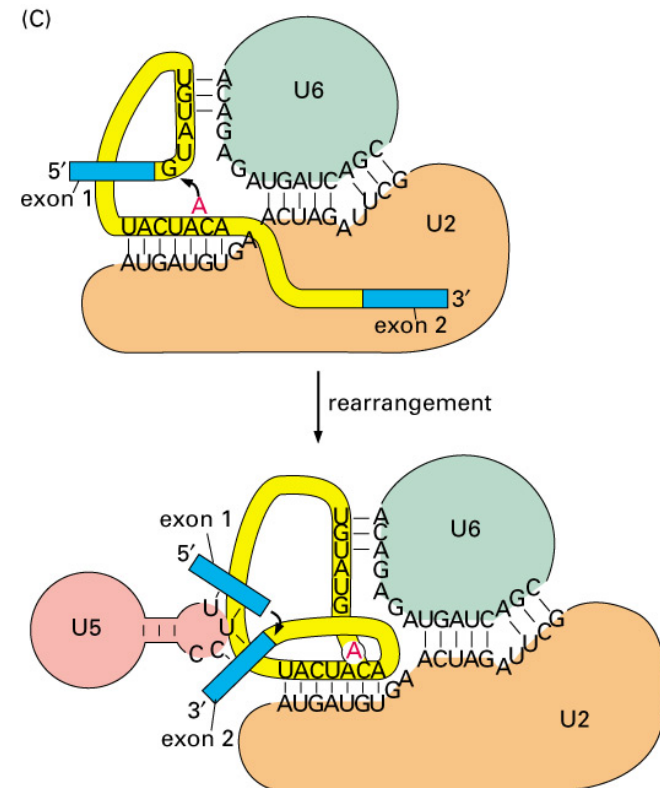
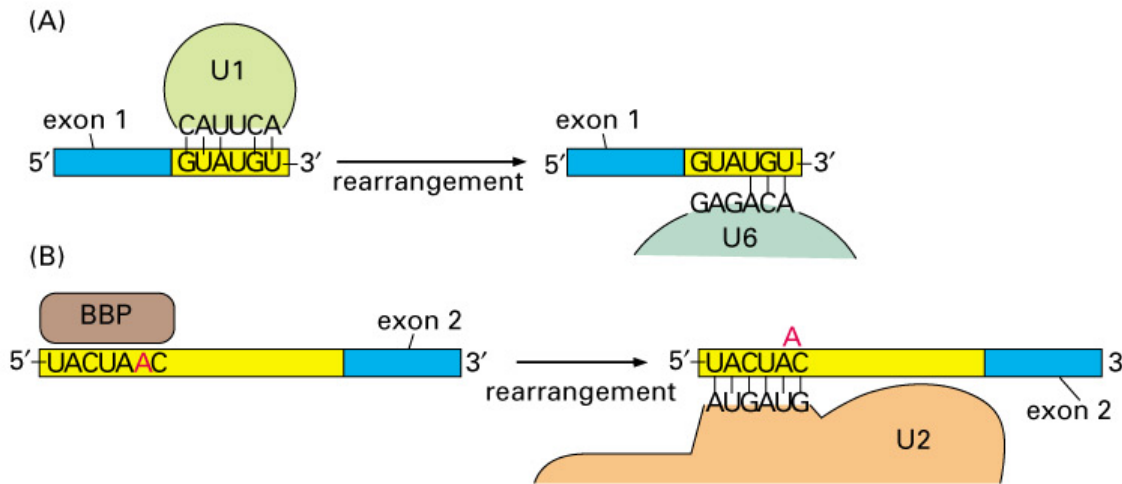
- **Complesso E** (early)
- **A:** (Branch site)
- **B1:** (spliceosoma completo)
- **B2:** U1 è rilasciato e si ha un riarrangiamento
- **C1:** U4 è rilasciato ed inizia la catalisi
- **C2:** sito 3' tagliato e gli esoni ligati



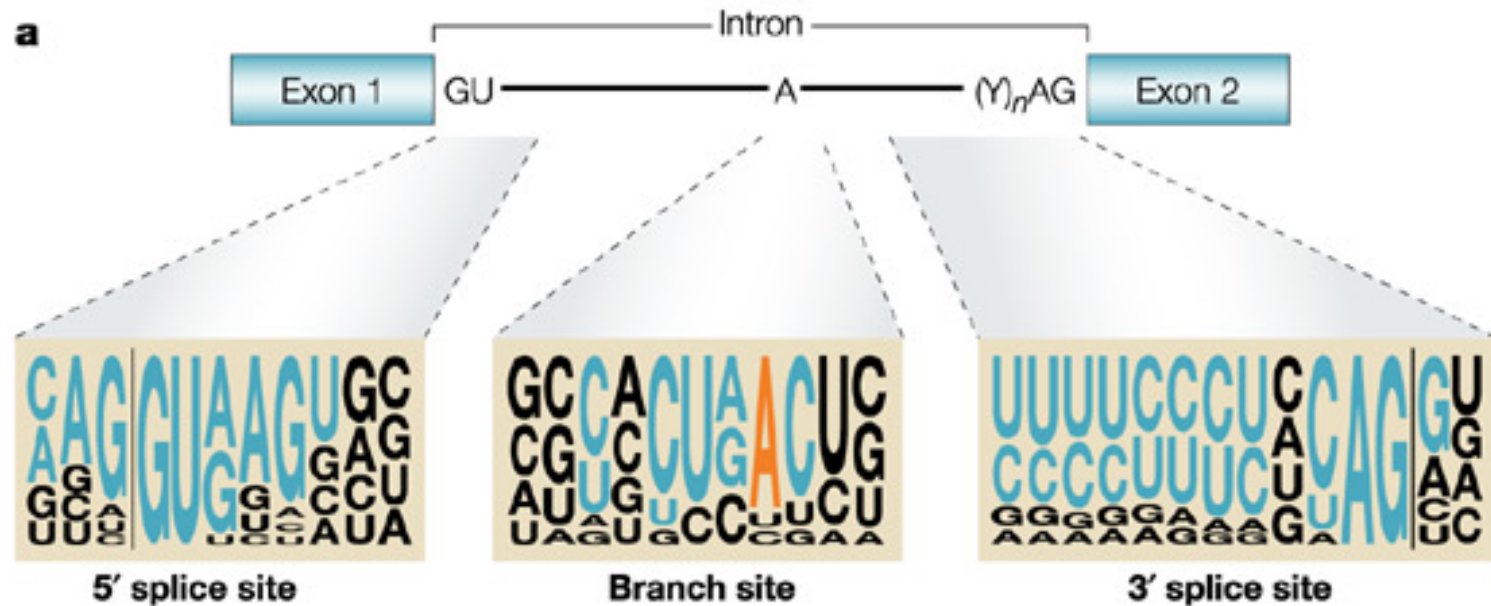
Accoppiamento RNA-RNA

Le snRNP rivestono 3 ruoli:

- 1) Riconoscono il sito di splicing 5' e il punto di ramificazione
- 2) portano questi siti vicini
- 3) Catalizzano il taglio e la giunzione dell'RNA



The classical splicing signals



Possiamo predire sequenze esoniche ed introniche?

tcttctgcttccccatgaaccttccccacagcagggcgttacatagccatgtgccgcg
agaagcagcccatgggtgccagagtctctggctgactacatcacagcagcatacgtgga
gatgaggcgagaggcttgggctagtaaggatgccacctatacttctgcccggaccctg
ctggctatcctgcgcccttccactgctctggtaagtgcccaaattgctggagggccat
ctgttttgacccttaaaggggtagctccttaccgtgctctcattgccgcctccccacc
tcccgctccagccctgccggggctaaagtgctgacagtgacagatagtggtcctctccg
tgctaccgcaactgtgggtacttgctgctccagcagggcacgcacagcgtccgtggagg
gaaaggccttttccccacttcttaaccttccactgagaggggtggttgggggtctgtttca
ctccatgtgtcctagatcctgtgctacagaccttcccttctgtcctcccgtcttggac
ctcagtcctgggggctccaaagtgctgttcgtgcaggtagtgtgattaccaacctac
tgctgagctagcacttcccagcccccgggacacgttctctctgcccaattgtcttctt
ggctgagctccccaaagctccatctgtcatgctggggagcccagtgggcgttcaaaaggg
tctgggtctccctcacaggacagctgaactccgggactggccagtgttgagagggcggag
acttgggcaattgctggacgctgccctgggcattgcacttgtctcggctctgacagtg
cggccaacactgcggatgctggggggaggggggattccactcctgttttgtgagtag
gagccatgggctgccagccttaaagccagaacaaggggtgtcccctgacctcgttc
cactgccctcctcccgttcccatctttccccctaccttccccttaggcacgtctgag
aatgggtggatgtgggtggagaaagaagatgtgaatgaagccatcaggctaattggagatg
tcaaaggactctcttctaggagacaaggggcagacagctaggtgagtggtttagtga
ggacaaagct

tcttctgcttccccatgaaccttccccacagcagcgcttacatagccatgtgcccgcg
agaagcagcccatggtgccagagtctctggctgactacatcacagcagcatacgtgga
gatgagggcgagaggcttgggctagtaaggatgccacctatacttctgccccggaccctg
ctggctatcctgcgcccttccactgctctgtgtaagtgcccaaattgctggagggccat
ctgttttgacccttaaaggggtagctccttaccgtgctctcattgccgcctccccacc
tcccgctccagccctgccgggggctaaagtgctgacagtgacagatagtggctcctctccg
tgctaccgcactgtgggtacttgctgctccagcagggcacgcacagcgtccgtggagg
gaaaggccttttccccacttcttaaccttactgagaggggtgggttggggctctgtttca
ctccatgtgtcctagatcctgtgctacagaccttcttctgtcctcccgtcttggac
ctcagtcctgggggctccaaagtgctgttcgtgcaggtagtgatgattaccaacctac
tgctgagctagcacttcccgagccccgggacacgttctctctgccaattgtcttctt
ggctgagctccccaagctccatctgtcatgctggggagcccagtggcgttcaaagg
tctggtctccctcacaggacagctgaactccgggactggccagtgttgagaggcggag
acttgggcaattgctggacgctgcctgggcattgcacttgtctcggctctgacagtgc
cggcccaacactgcggatgctggggggaggggggattccactcctgttttgtgagt
gcgacccatgggctgccagccttaaagccagaacaagggtgtcccctgacctcgttc
cactgccctcctcccgttcccatcttccccctaccttccccttaggcacgtctgag
aatggtggatgtggtggagaaagaagatgtgaatgaagccatcaggctaatggagatg
tcaaaggactctcttctaggagacaagggggcagacagctaggtagtggtttagtga
ggacaaagct

 5' splice site

 3' splice site

Part of *MCM7* primary transcript

tcttctgcttccccatgaaccttccccacagcaggcggttacatagccatgtgcccgc
agaagcagcccatggtgccagagtctctggctgactacatcacagcagcatacgtgga
gatgaggcgagaggcttgggctagtaaggatgccacctatacttctgcccggaccctc
ctggctatcctgcgcccttccactgctctggttaagtgccaaattgctggagggccat
ctgttttgacccttaaaggggtagctccttaccgtgctctcattgccgcctccccacc
tcccgtccagccctgccggggctaaagtgctgacagtgcagatagtggtcctctccg
tgctaccgcactgtgggtacttgctgctccagcagggcacgcacagcgtccgtggagg
gaaaggccttttccccacttcttaaccttactgagaggggtggttggggctctgtttca
ctccatgtgtcctagatcctgtgctacagaccttctttctgtcctcccgtcttggac
ctcagtcctgggggctccaaagtgctggtcgtgcaggtagtgtgattaccaacctac
tgctgagctagcacttcccagagccccgggacacgttctctctgccaatgtcttctt
ggctgagctccccaaagctccatctgtcatgctggggagcccagtggcgttcaaaggg
tctggtctccctcacaggacagctgaactccgggactggccagtgttgagaggcggag
acttgggcaattgctggacgctgccctgggcattgcacttgtctcggctctgacagtgc
cggcccaacactgcggatgctggggggaggggggattccactcctgttttgtgagtag
gcgacccatgggctgccagccttaaagccagaacaagggtgtcccctgacctcgttc
cactgccctcctcccgttcccatctttccccctaccttccccttaggcacgtctgac
aatggtggatgtgggtggagaaagaagatgtgaatgaagccatcaggctaataaggagatc
tcaaaggactctcttctaggagacaagggggcagacagctaggtgagtggtttagtga
ggacaaagct

 exons  pri-miRNA

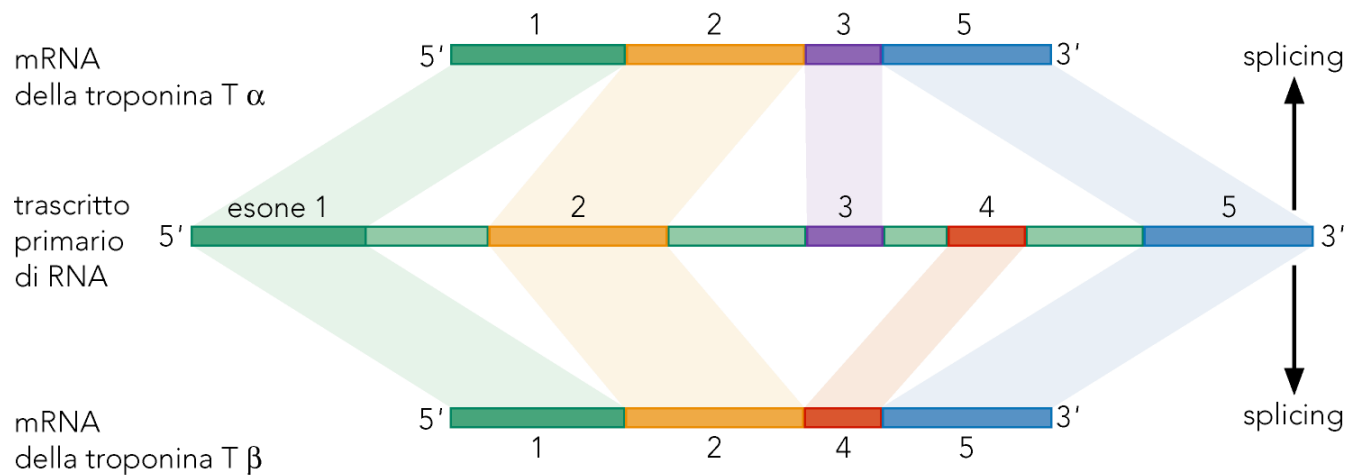
Functions of alternative splicing

A piece of pre-mRNA...

*the*aertejr adensgfzdefhbncwhtienasjjfnaeixnsjaeodnandeo zngzon
dncoznec*earth*nieoznciezodejaifijeoznvaqndkgfjnigore*is*joigrep
lfdzmkogfrnrbchfzofrezjceozf*blue*jjanfeozspfekfeapeftjgpoiurtu
fjeisaqwsht*as*hejeogedkgeeejfebnvhgjfdlsmqpaozeirutghvfjans
ediefe*an*kogkorpzkoeritorzgedgklpmpadgas*orange*dezfjgnetonskcc

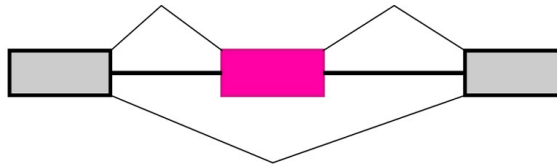
Splicing alternativo

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

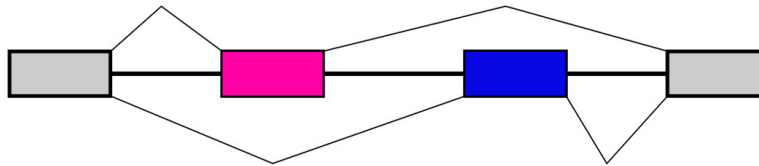


Splicing alternativo

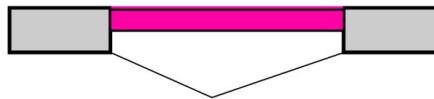
Cassette Exon



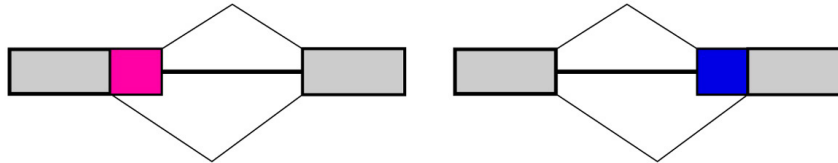
Mutually Exclusive Exons



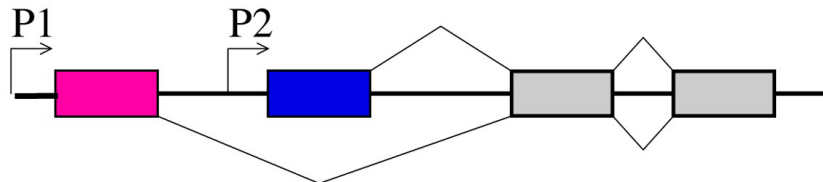
Intron Retention



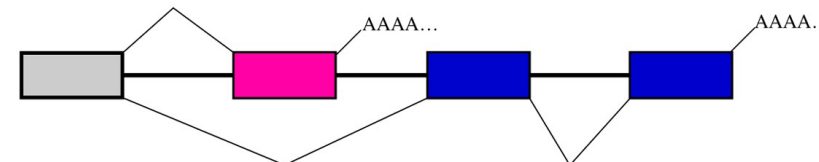
Alternative 5' or 3' Splice Sites



Alternative Promoters

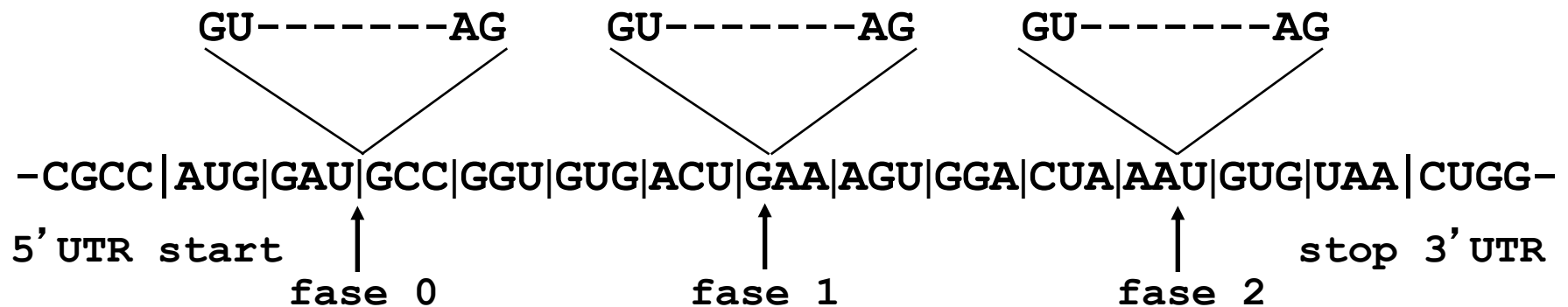


Alternative Splicing and Polyadenylation



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%).

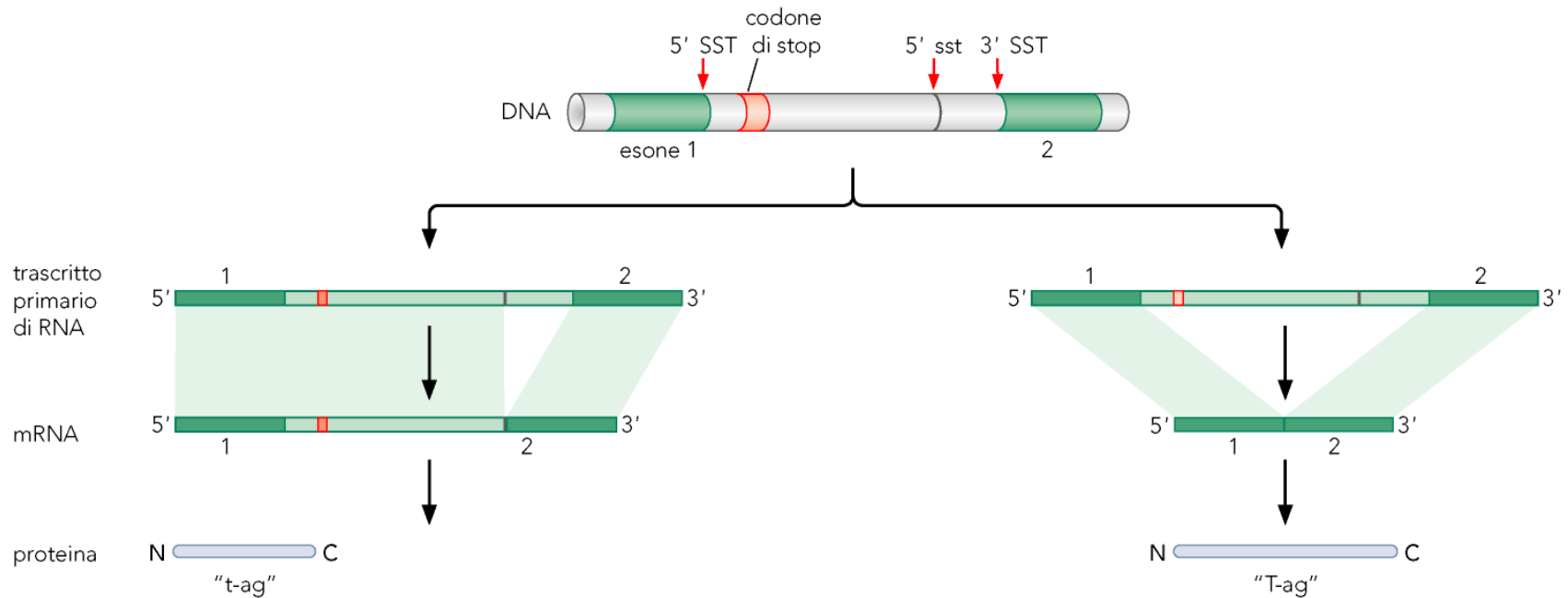


La fase degli introni

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**.



Esempio di Splicing alternativo costitutivo



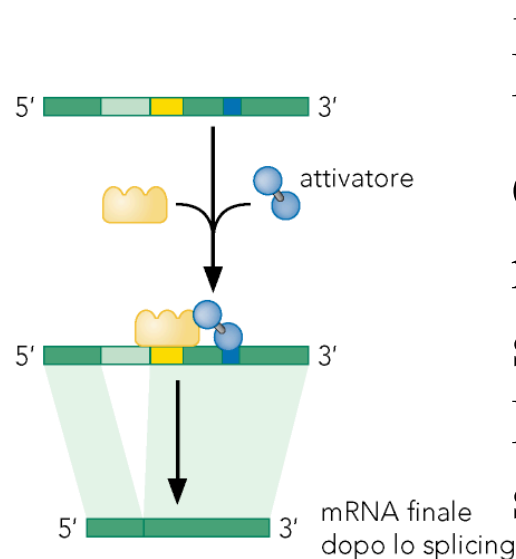
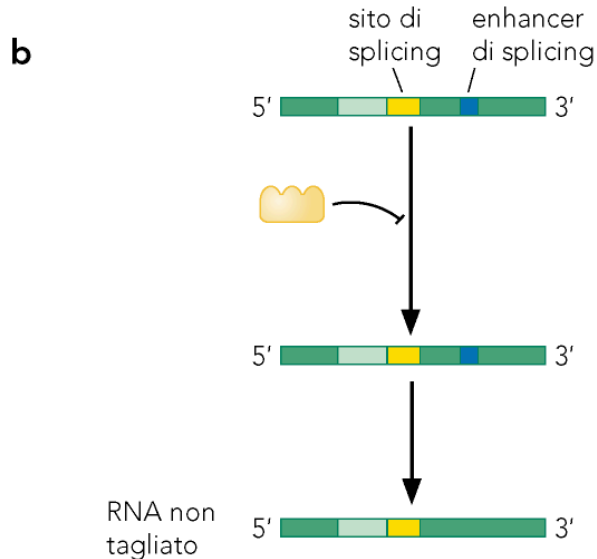
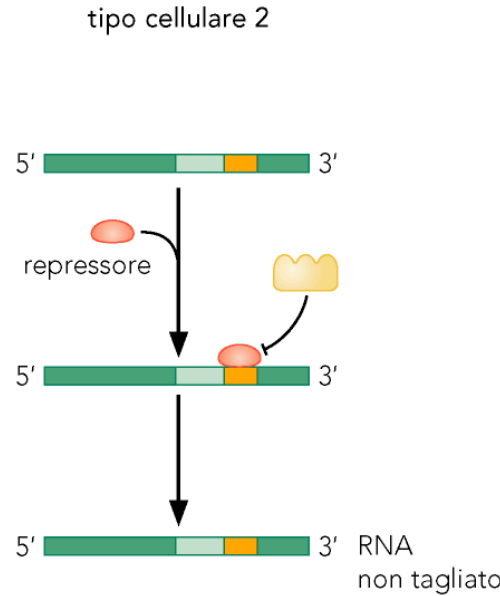
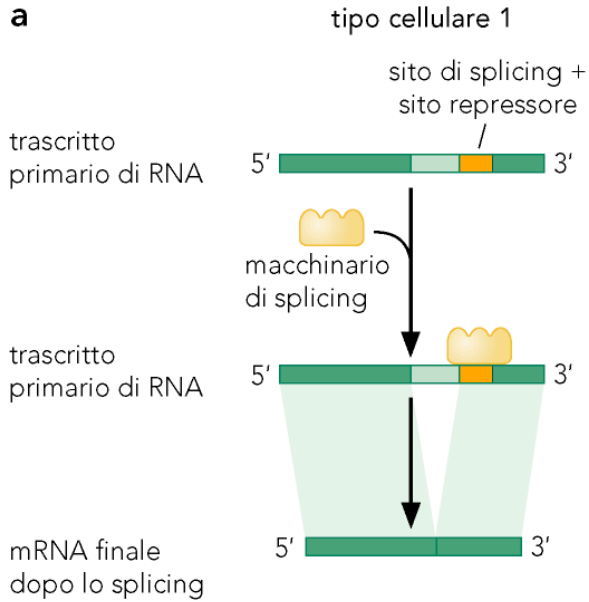
L' antigene T del virus della scimmia SV40 ha 2 5' splicing site alternativi (5' SST e 5' sst).

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 delle proteina di splicing SF2/ASF

Esempio di Splicing alternativo regolato



Repressori: intronic-exonic splicing silencers (ESS o ISS).

Si legano a hnRNP (**heterogenous nuclear ribonucleoproteins**) e non hanno il dominio SR per il legame a U1 o U2AF.

Bloccano i siti di enhancer

Gli **attivatori** (ESE o ISE) riconoscono una sequenza specifica e con il dominio RS reclutano i fattori di splicing

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.

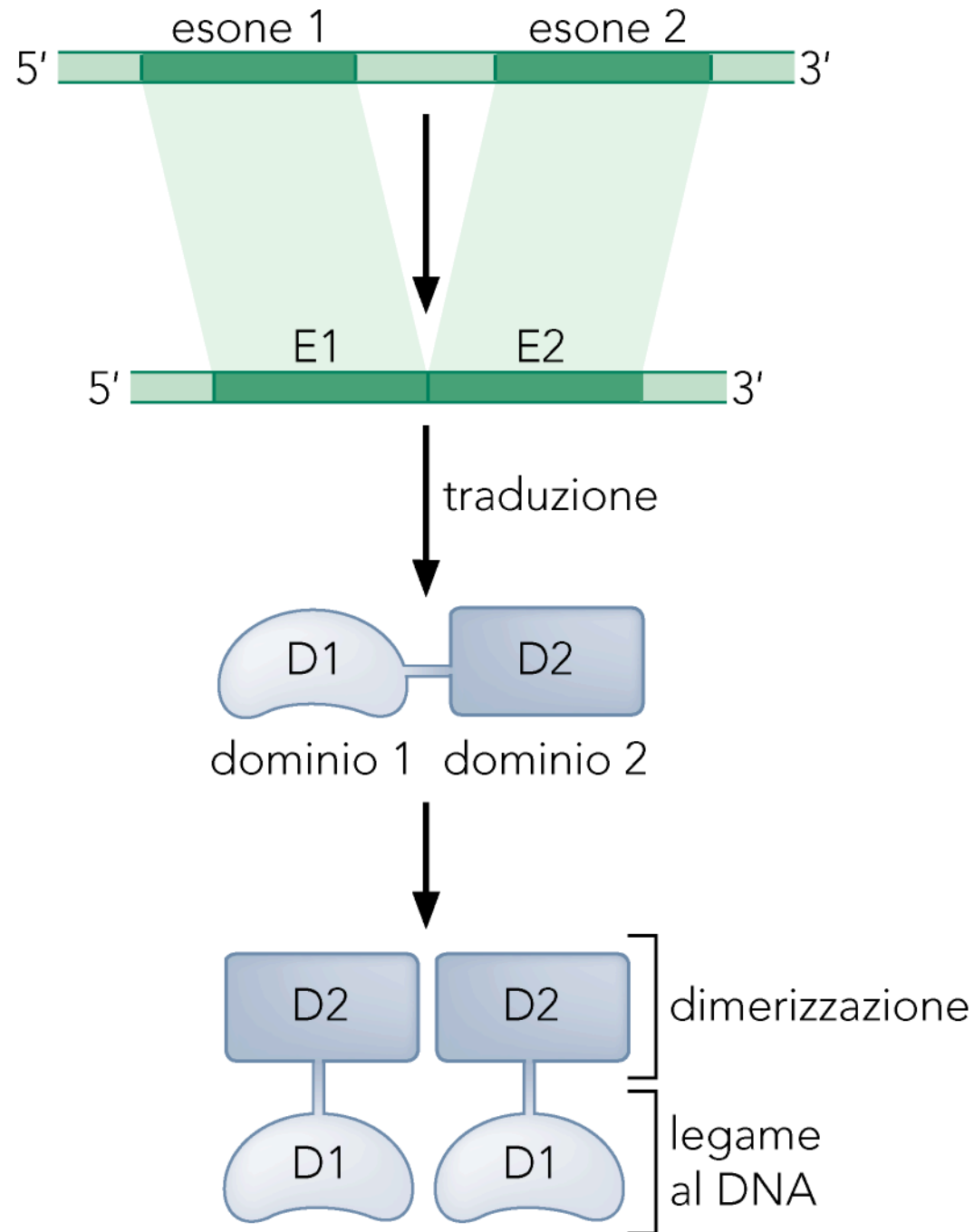
Ad es. un tipo di beta-talassemia è causato da una mutazione nel primo introne del gene della beta-globina che determina la formazione di un sito 3' per lo splicing generando un trascritto anomalo.

Vantaggi degli esoni:

- 1) possibilità di generare prodotti proteici multipli attraverso lo splicing
- 2) Creazione di nuovi geni attraverso il rimescolamento degli esoni.

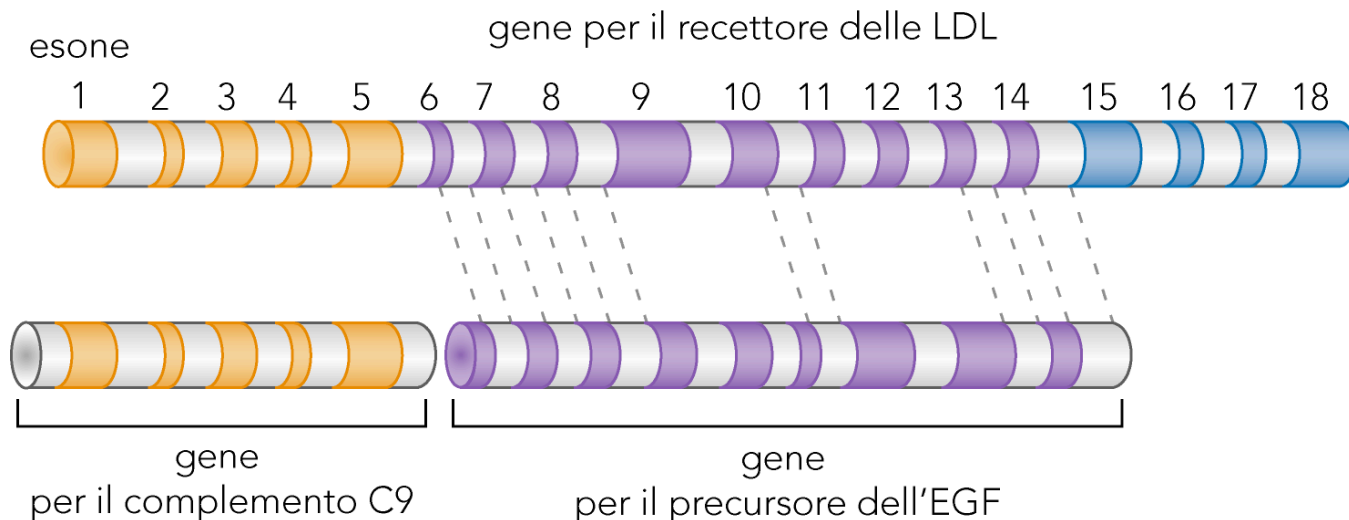
Spesso gli esoni codificano domini strutturali con funzioni distinte.

(Es: DNA-binding e dimerizzazione)



Gli esoni: ruolo evolutivo

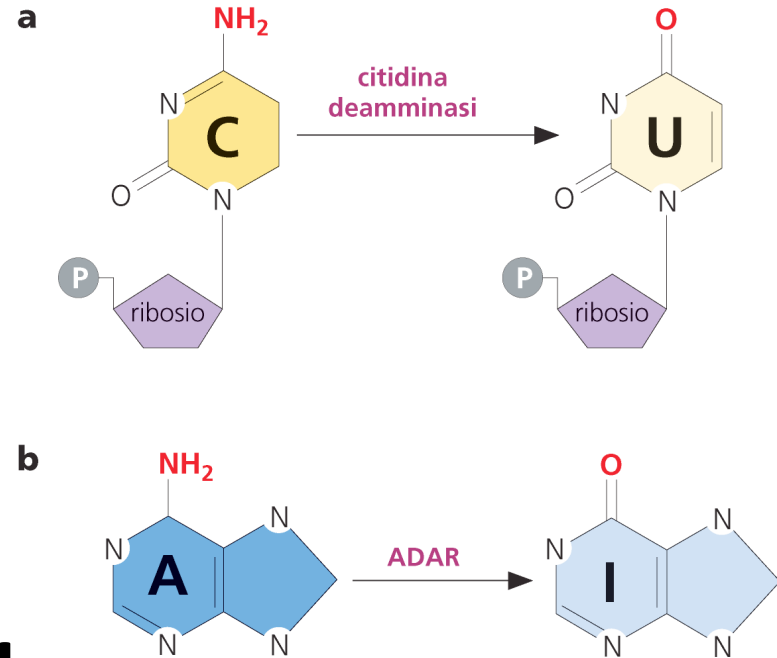
- Molti geni si sono evoluti duplicando gli esoni
- Esoni simili si possono trovare in proteine molto diverse



RNA editing

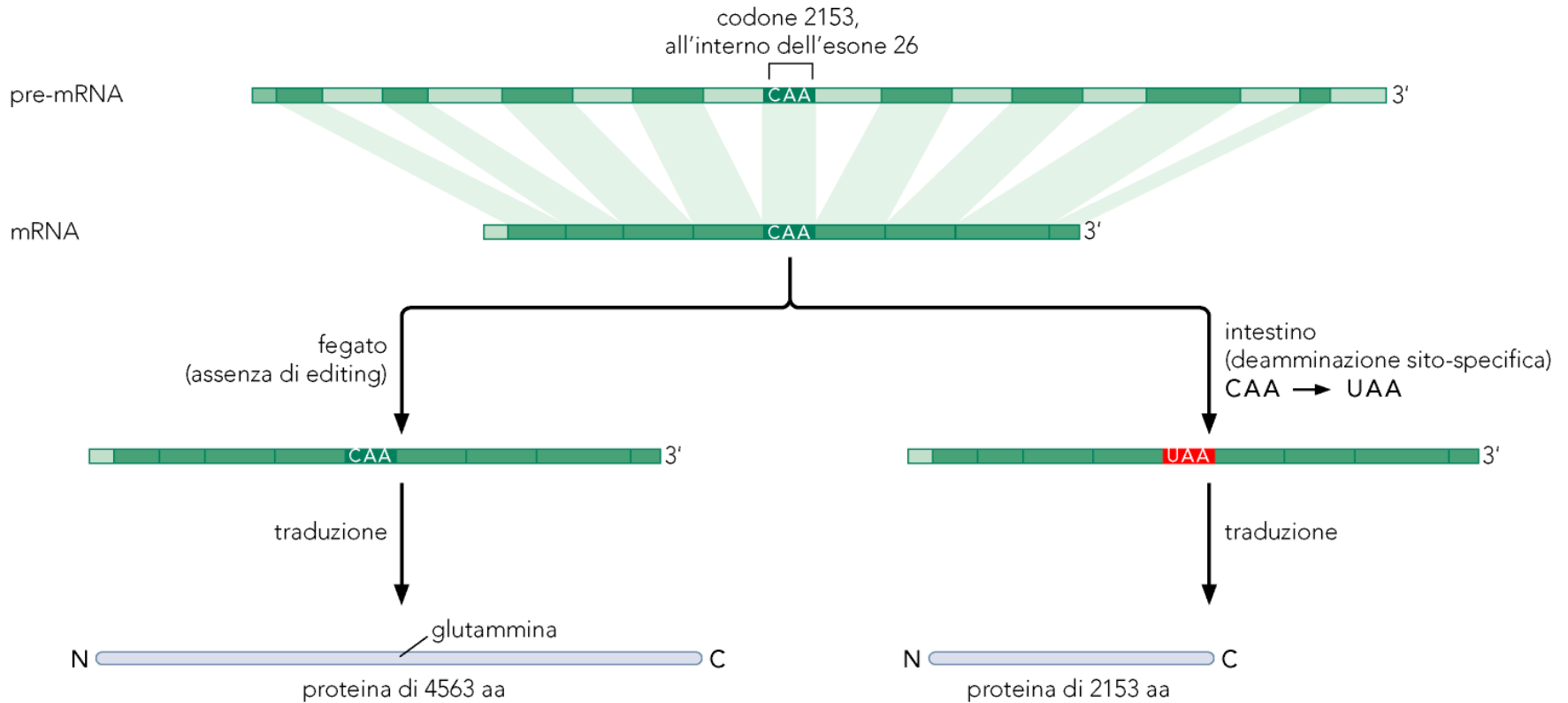
Rappresenta un altro modo per modificare la sequenza di un RNA

- **deamminazione** sito-specifica (C → U o A → Inosina)
- **Inserzione o delezione di U** diretta da RNA guida



ADAR: adenosina deamminasi che agisce sull'RNA

Esempio di deamminazione sito-specifica



Gene dell' apolipoproteina-B umana.

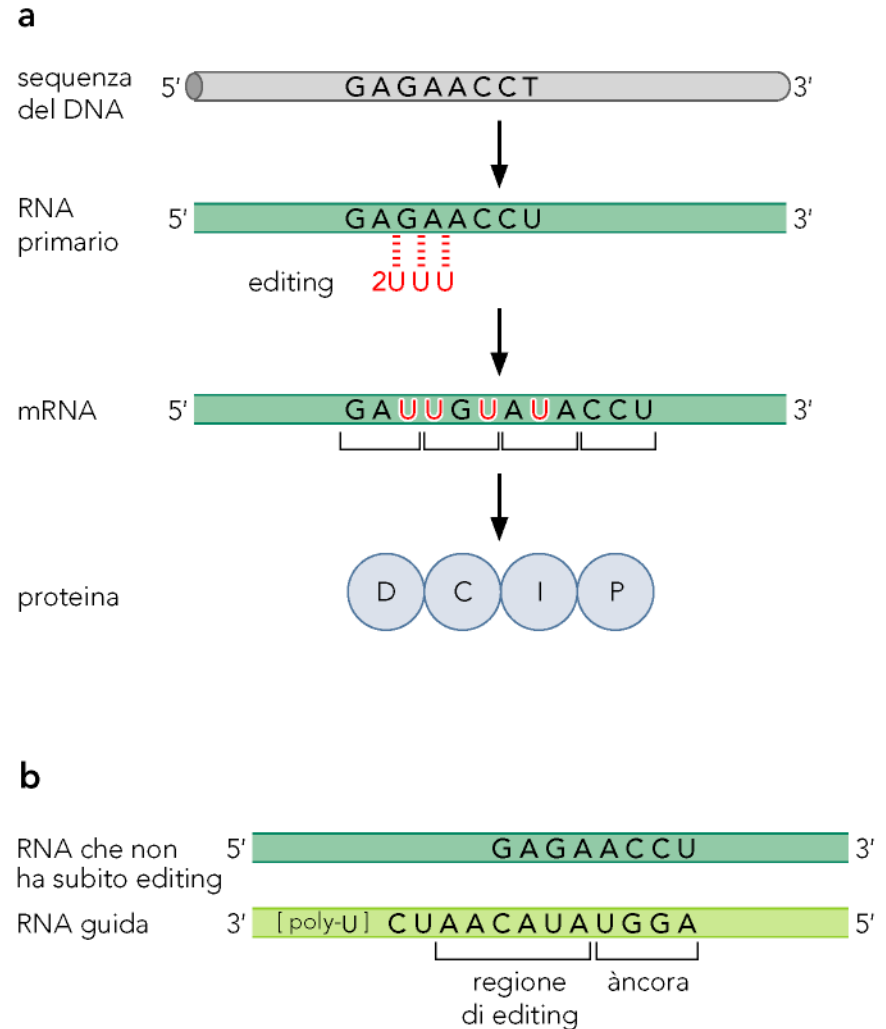
La deamminazione, introduce uno stop codon, e quindi una proteina troncata.

Editing con inserzione di U, mediato da RNA guida

Forma trovata nel gene mitocondriale *coxII* di tripanosoma.

Vengono aggiunte delle U, modificando il frame di lettura.

Gli **RNA guida (gRNA)** hanno un' ancora di attacco al 5', la regione di editing ed un tratto poli-U al 3'.



Meccanismo

Il gRNA (regione ancora, editing e poliU) si attacca con l' ancora.

Induce la formazione di **anse** sull' RNA.

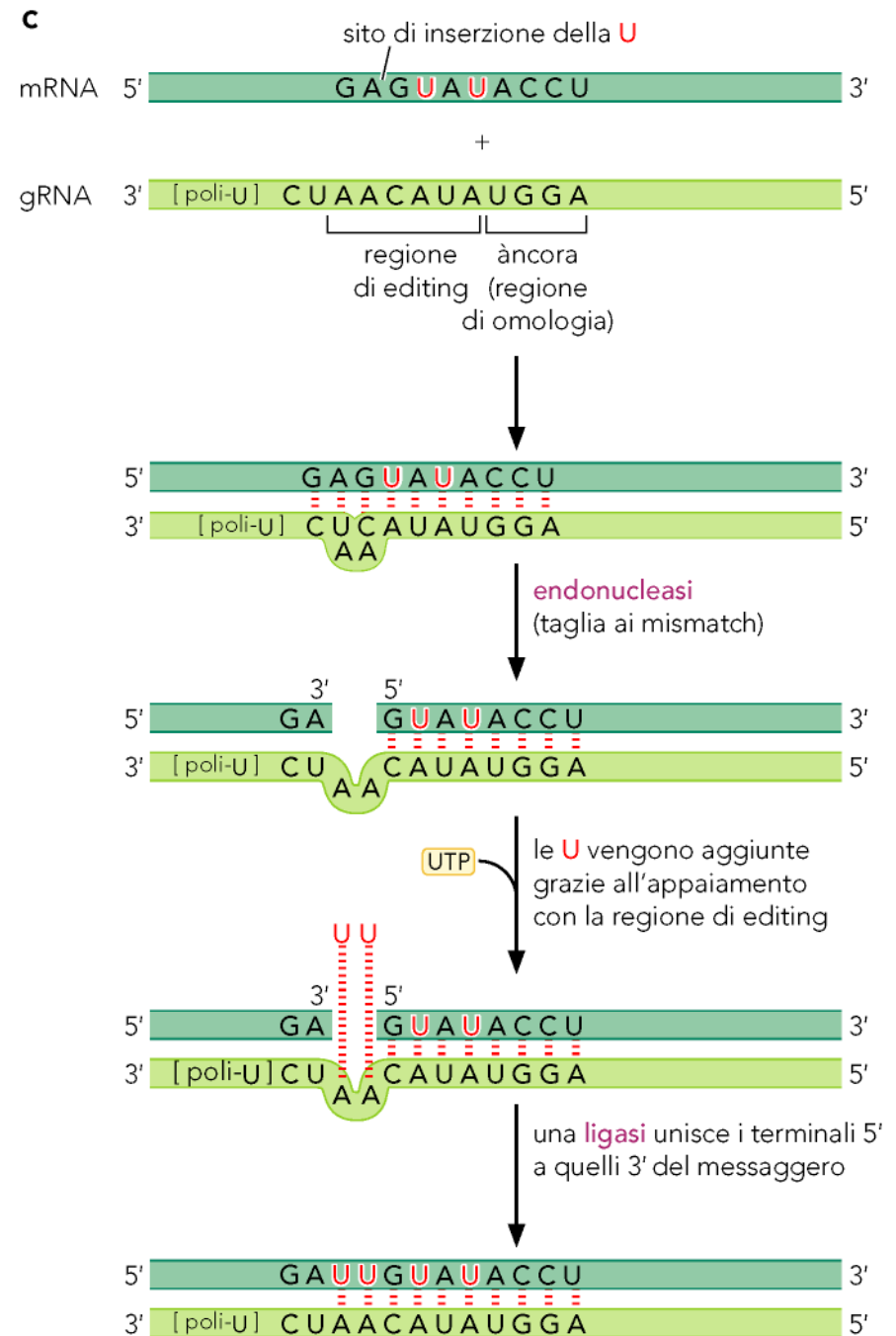
Taglio endonucleasico.

Inserimenti di U da parte di uridil-transferasi 3' terminale (**TUTasi**).

Poi la Ligasi.

Il tratto PoliU potrebbe aumentare la complementarità dell' attacco.

Lo stesso gRNA può modificare siti diversi.



Il fenomeno dell' autosplicing e i ribozimi

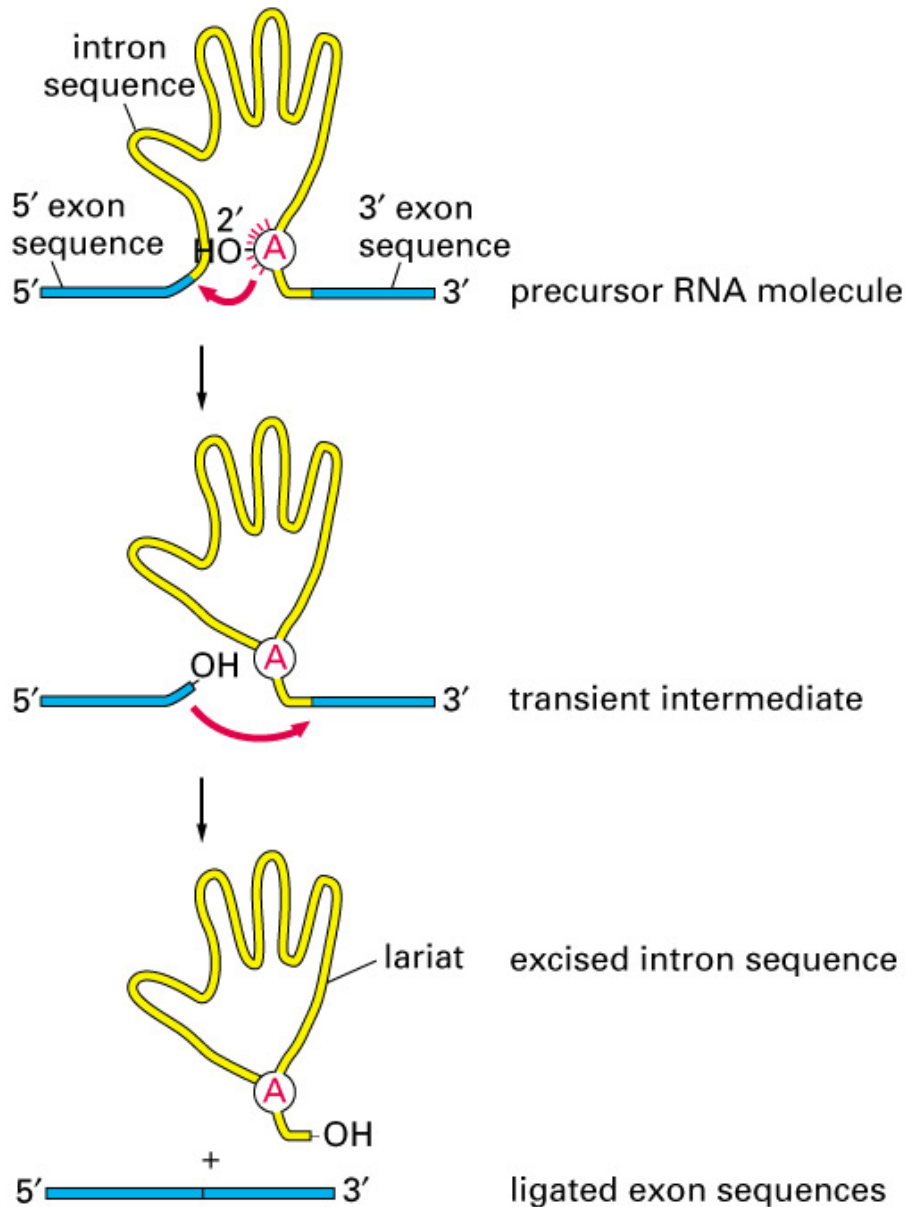
Verso la metà degli anni ottanta venne scoperto l' inatteso fenomeno per cui i trascritti primari di alcuni **rRNA** eliminano da sé alcuni ben definiti segmenti interni, **senza intervento di enzimi proteici**.

Ne sono stati scoperti due tipi (**gruppo I e gruppo II**) caratterizzati da meccanismi leggermente diversi.

Successivamente venne evidenziato come, anche in altre situazioni, attività biochimiche altamente specifiche sono attuate da porzioni di RNA, che furono chiamati **ribozimi**.

La scoperta che l' RNA è capace sia di contenere informazione nella sua sequenza (come il DNA) sia di possedere attività enzimatica (come le proteine) stimolò la proposta della **teoria del “mondo a RNA”**, secondo cui all' origine dell' evoluzione della vita il **primo biopolimero apparso sia stato l'RNA**, il quale solo in seguito abbia demandato quasi tutta l' **attività enzimatica a polipeptidi**, e quindi a proteine, molto più versatili in tal senso, e successivamente la **funzione informazionale al DNA**, molecola chimicamente molto più stabile (ma anche molto meno reattiva).

Group II self-splicing intron sequences



Introni **Self-splicing** di **gruppo II**.

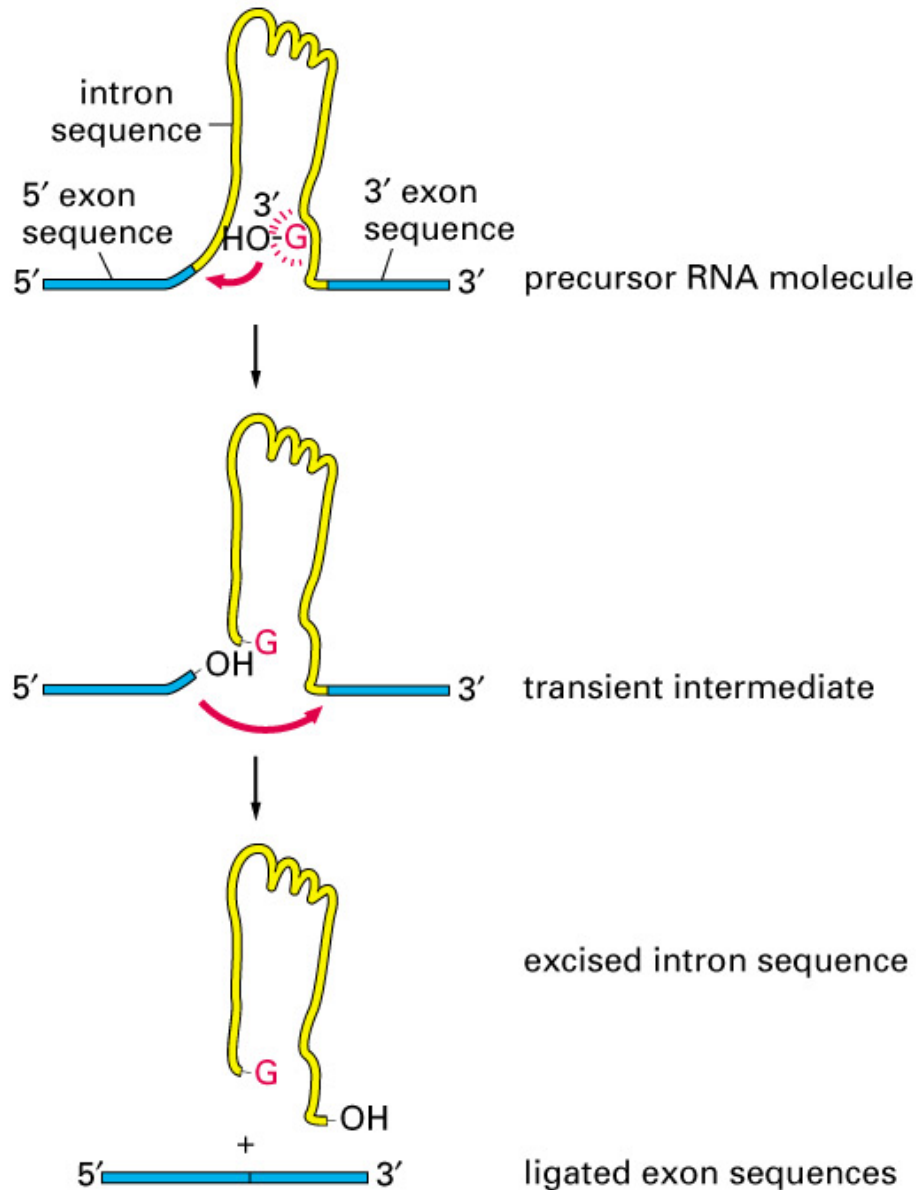
Rari introni di organelli.

Dimensione di 400-1000 nt.

Lo splicing non necessita della presenza di proteine.

Il meccanismo è simile a quello dello spliceosoma.

Group I self-splicing intron sequences



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

Rari introni di eucarioti, rRNA o organelli.

Dimensione di 400-1000 nt.

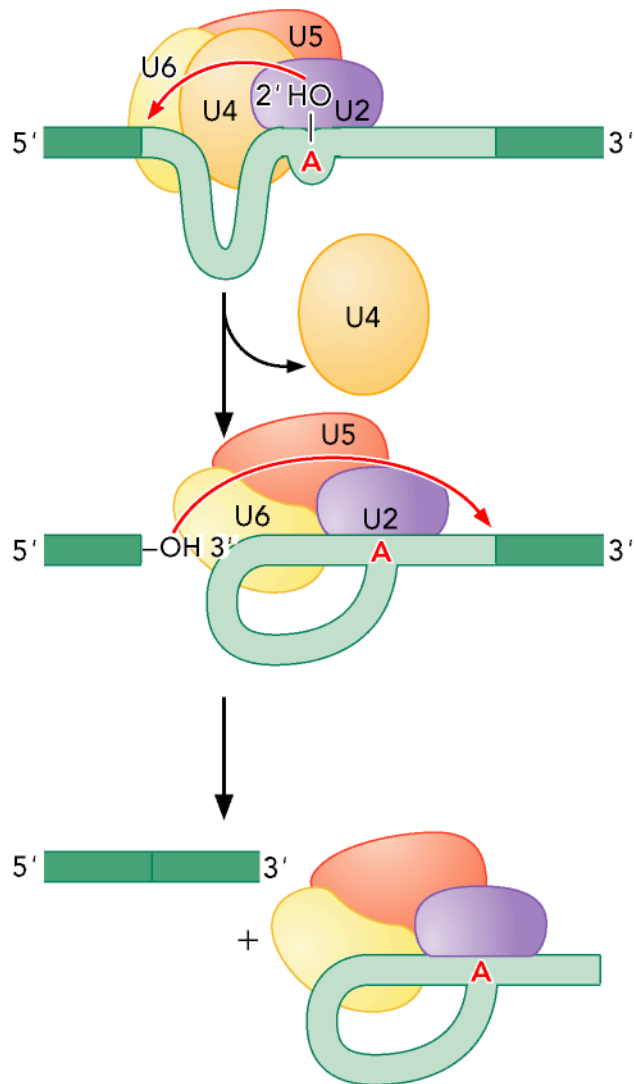
Una **G** si **lega ad una tasca** ed attacca il 5' splicing site.

Hanno una sequenza di guida interna che si appaia alla sequenza del sito al 5'.

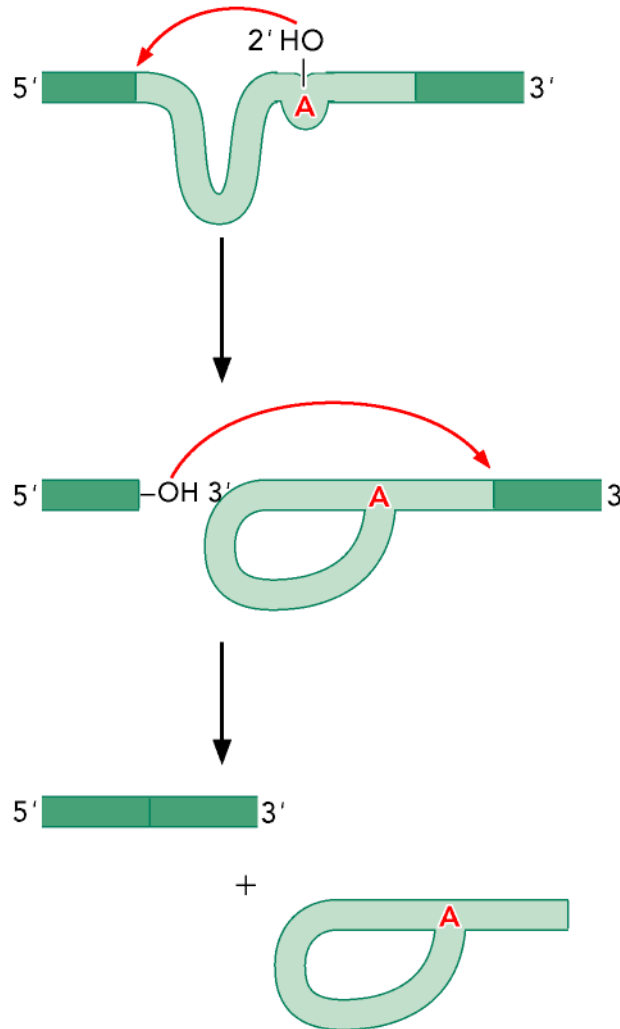
Lo splicing non necessita della presenza di proteine.

I diversi meccanismi di splicing

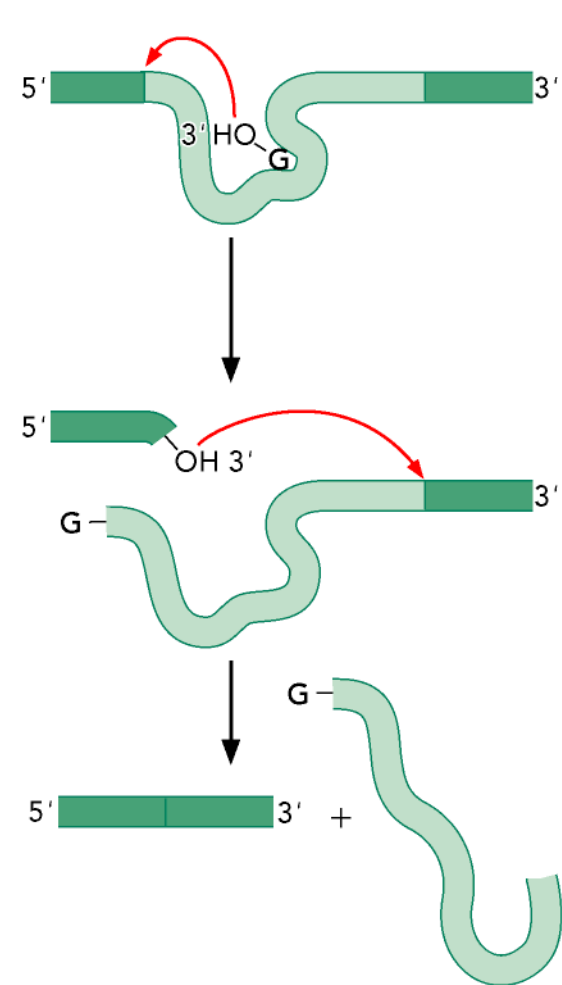
a spliceosoma dei pre-mRNA



b introni self-splicing del gruppo II



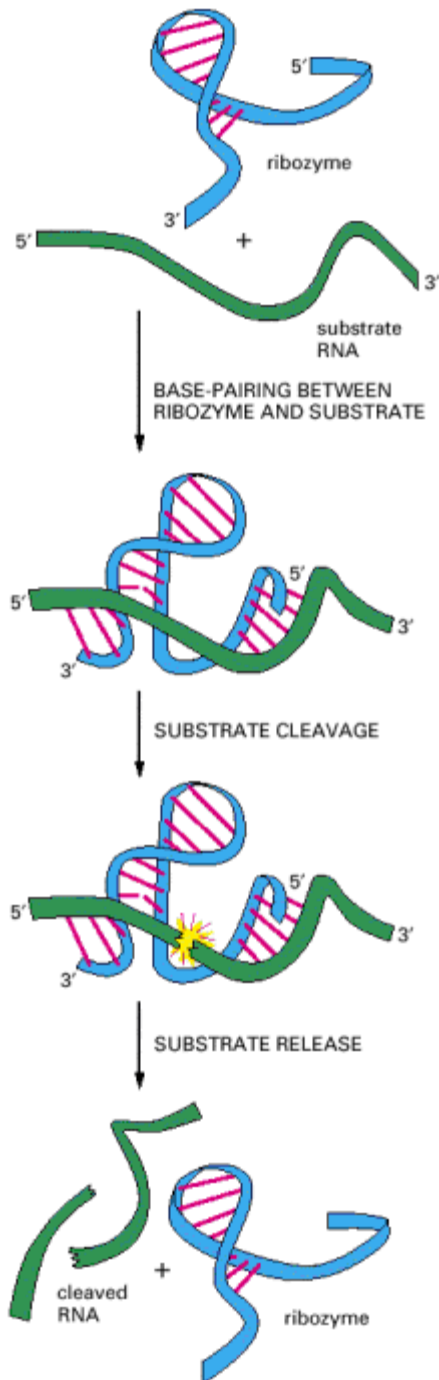
c introni self-splicing del gruppo I



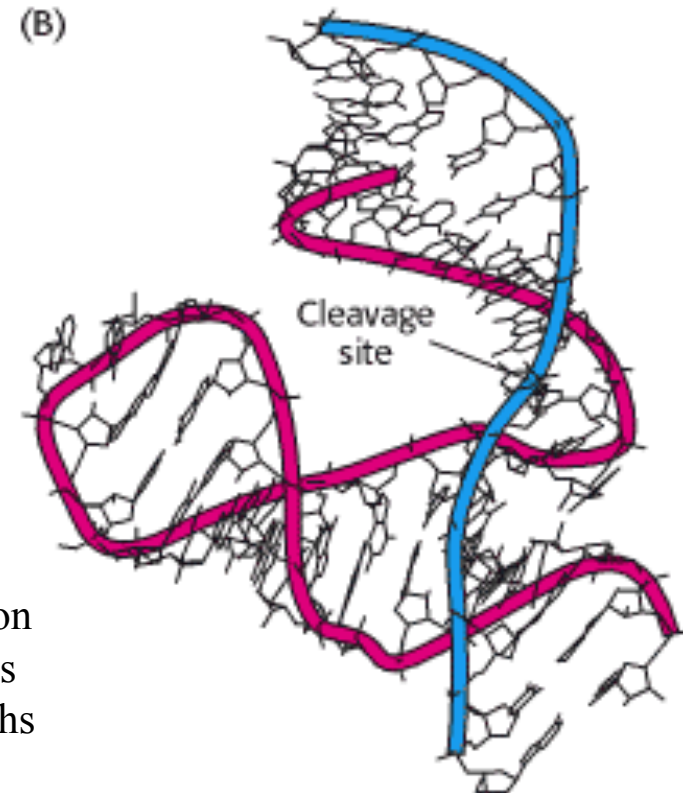
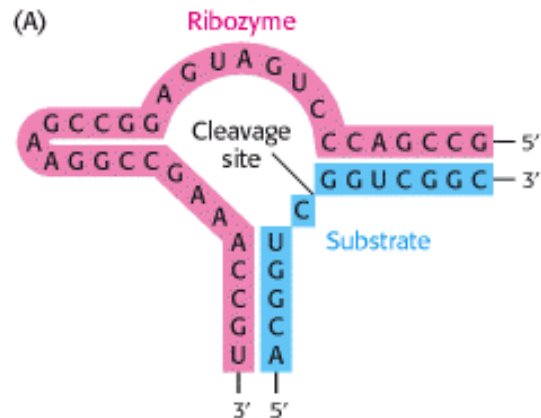
I diversi meccanismi di splicing

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



A ribozyme. This simple RNA molecule catalyzes the cleavage of a second RNA at a specific site. This **ribozyme** is found embedded in larger RNA genomes—called **viroids**—which infect plants. The cleavage, which occurs in nature at a distant location on the same RNA molecule that contains the ribozyme, is a **step in the replication of the viroid genome**. Although not shown in the figure, the reaction requires Mg^{2+} positioned at the active site.



Catalytic RNA.

(A) The base-pairing pattern of a “hammerhead” ribozyme and its substrate. (B) The folded conformation of the complex. The ribozyme cleaves the bond at the cleavage site. The paths of the nucleic acid backbones are highlighted in red and blue.

Examples of ribozymes

Ribozyme

Description

Self-splicing introns

Some introns of Groups I and II splice themselves by an autocatalytic process. There is also growing evidence that the splicing pathway of GU-AG introns includes at least some steps that are catalyzed by snRNAs

Ribonuclease P

The enzyme that creates the 5' ends of bacterial tRNAs consists of an RNA subunit and a protein subunit, with the catalytic activity residing in the RNA

Ribosomal RNA

The **peptidyl transferase activity** required for peptide bond formation during protein synthesis is **associated** with the **23S rRNA** of the large subunit of the ribosome

tRNA^{Phe}

Undergoes **self-catalyzed cleavage** in the presence of divalent lead ions

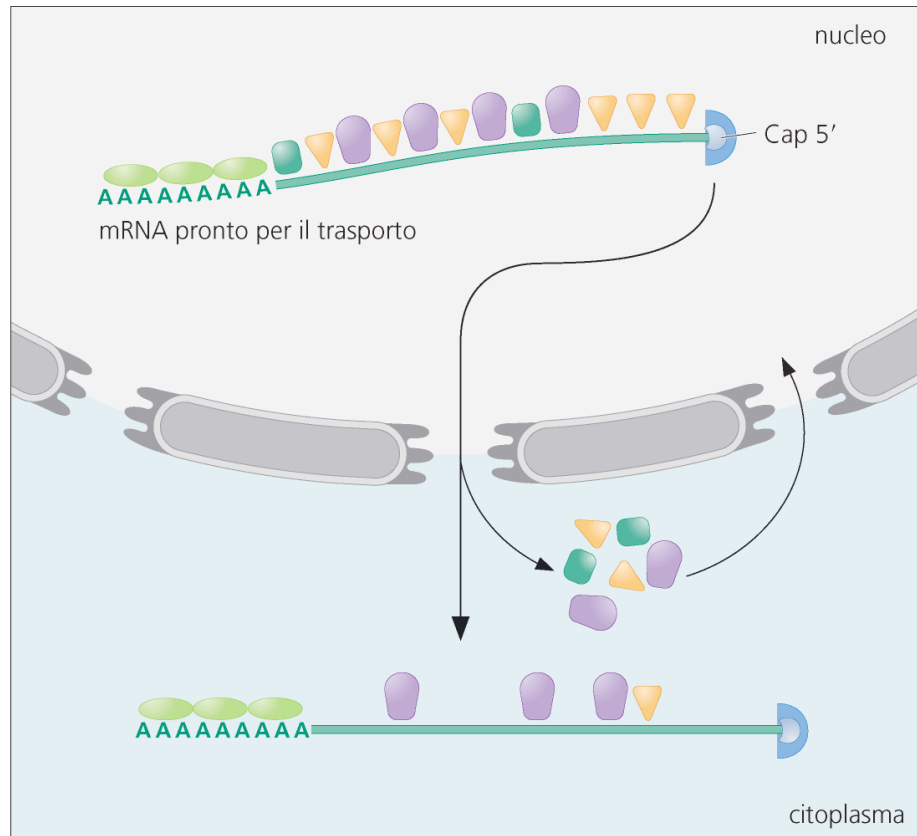
Virus genomes

Replication of the RNA genomes of some viruses involves self-catalyzed cleavage of chains of newly synthesized genomes linked head to tail. Examples are the plant viroids and virusoids and the animal hepatitis delta virus. These viruses form a diverse group with the self-cleaving activity specified by a variety of different base-paired structures, including a well-studied one that resembles a **hammerhead**.

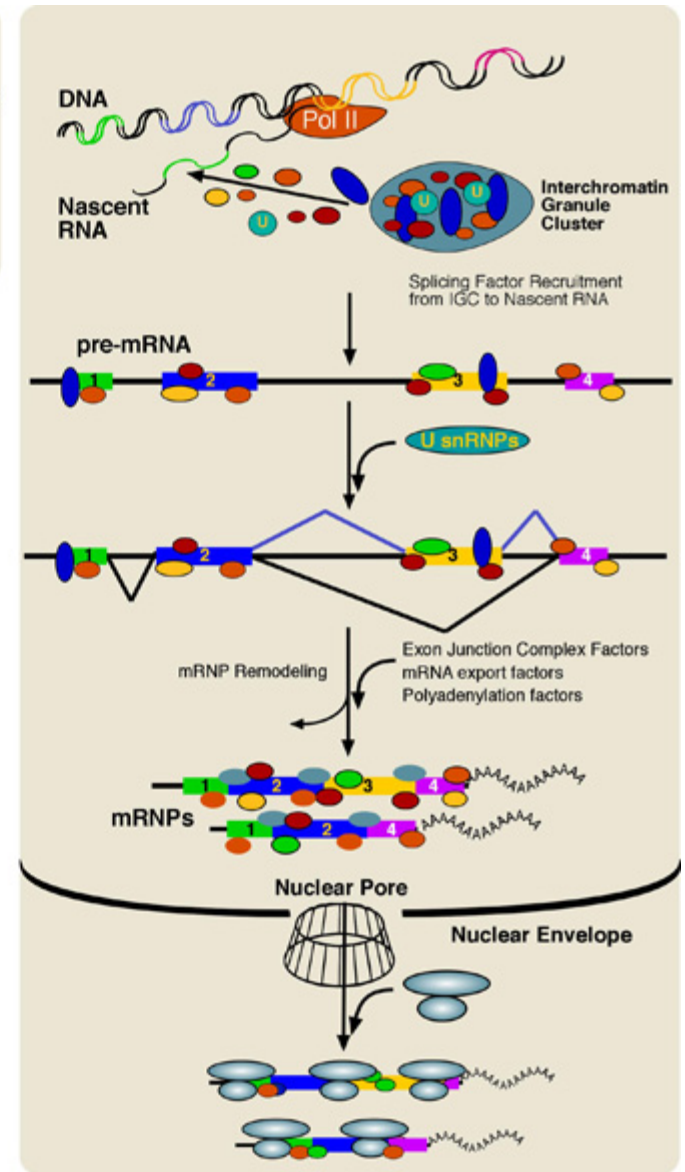
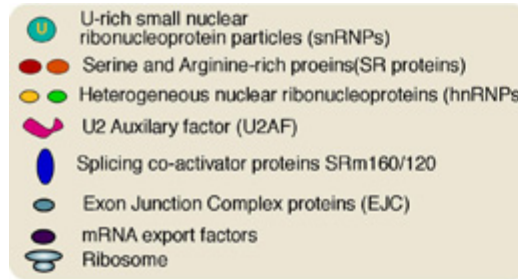
Il trasporto dell'mRNA

mRNA maturo (con capping, splicing, poliA e proteine aggiunte) viene rilasciato dal nucleo con un meccanismo regolato

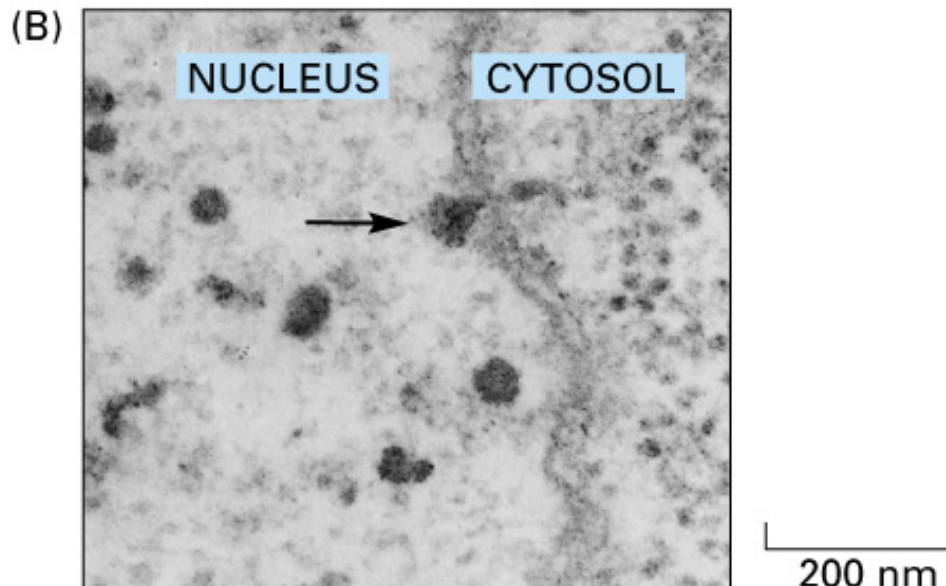
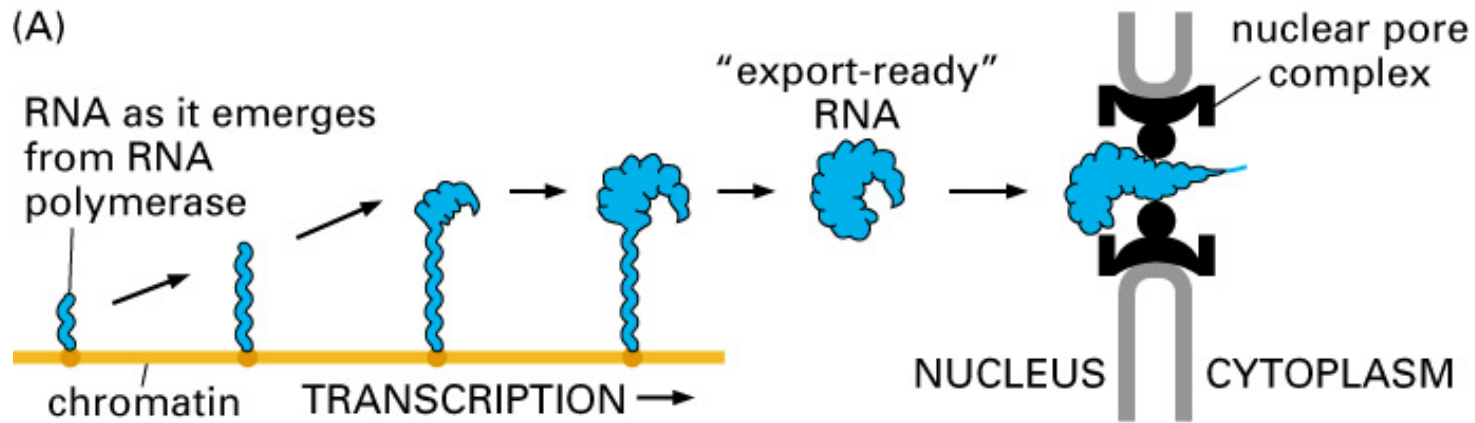
Attraverso il poro nucleare, che usa la GTPasi Ran.



- Passaggi del processamento del RNA in eucarioti.
- Il pre RNA viene processato
- L' RNA maturo passa nel nuclear pore.

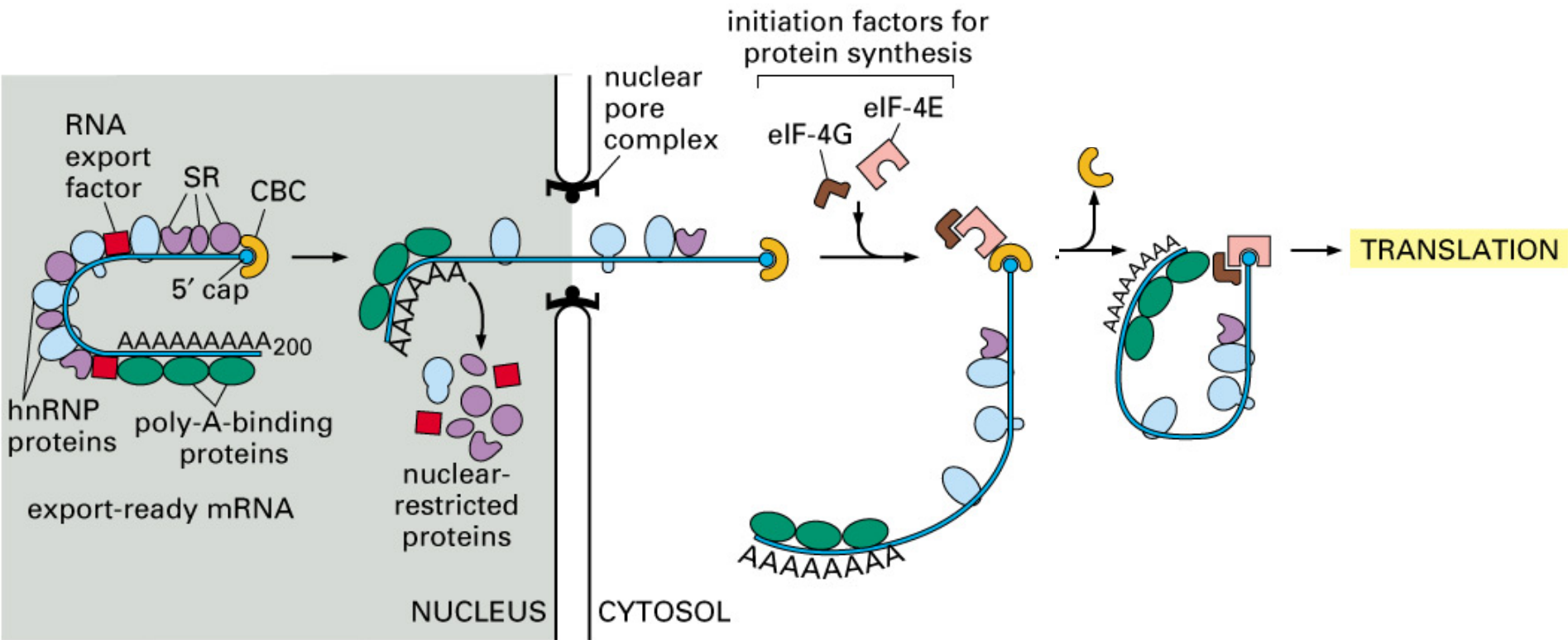


Trasporto attraverso il nuclear pore complex



L' RNA maturo deve essere trasportato fuori dal nucleo con un processo regolato, attraverso il nuclear pore complex.

Trasporto di mRNA



Nel trasporto l'RNA si dissocia da alcune proteine, ma non Cap binding protein (CBP) e nel citoplasma si lega a elongation factors eIF-4G e eIF-4E

Video

RNA processing

<https://www.youtube.com/watch?v=nTRN04puZ3s>

Calcitonin (APA)

https://www.youtube.com/watch?v=FE8q_7OM6gY

Splicing

<https://www.youtube.com/watch?v=GYi5fuS-R7I>

https://www.youtube.com/watch?v=Dp_b9eITxdc

myZanichelli

Diversi video sulla maturazione dell'RNA