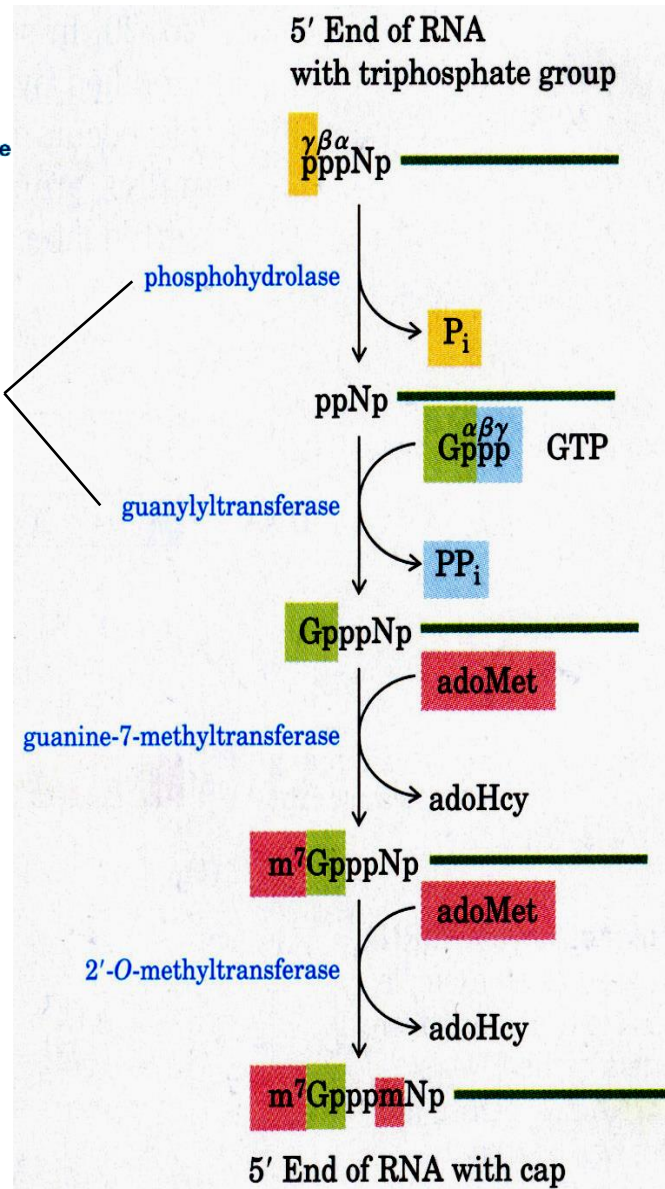
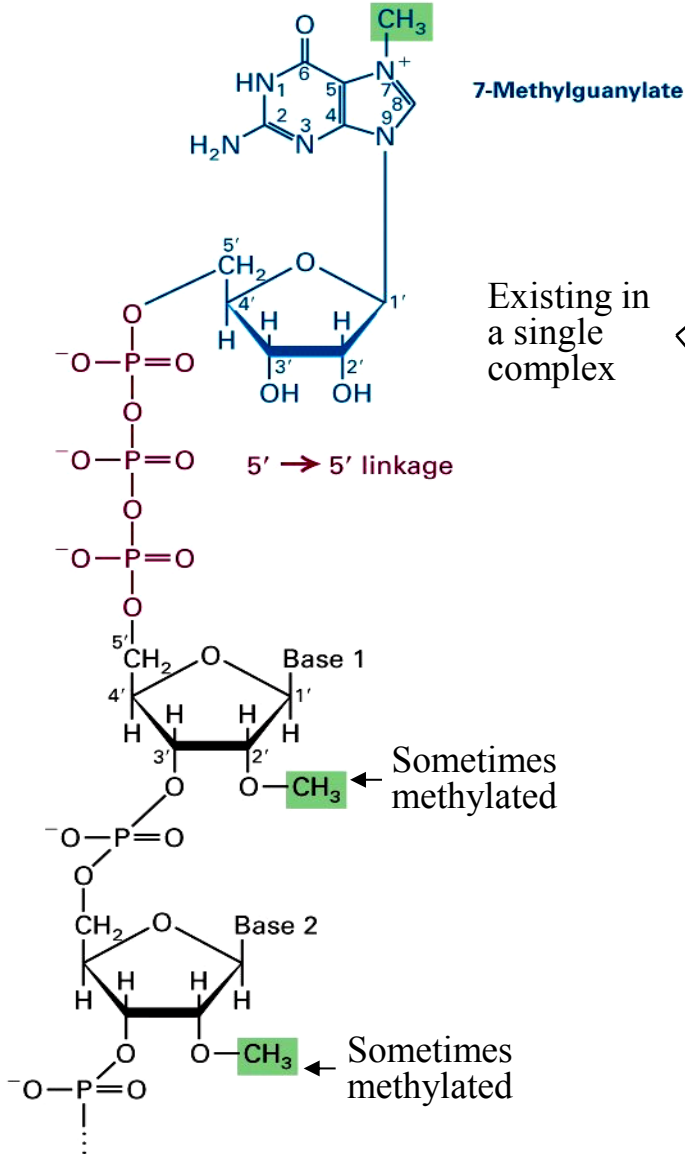


Processamento dell'mRNA e sintesi proteica

Capping dell'mRNA e poliadenilazione

Processi Post-trascrizionali: Aggiunta del 5' Cap site



Il Capping stabilizza l'mRNA e stimola la traduzione, lo splicing e favorisce l'export dell'mRNA nel citoplasma.

Processi Post-trascrizionali:

Poliadenilazione del Pre-mRNA

- La maggior parte degli mRNA citoplasmatici possiedono una coda di polyA (3' end) lunga circa 50-250 Adenine
- Viene aggiunta dopo la trascrizione dagli enzimi, polyA polimerasi

Funzioni della coda di PolyA

1. Migliora la stabilità dell'mRNA
2. La de-adenilazione (accorciamento della coda di polyA) può causare la rapida degradazione dell'mRNA
3. Aumenta la traduzione
 - promuove l'aggancio dell'mRNA ai ribosomi
 - Si lega alla proteina PAB1 che riconosce il polyA nel citoplasma
 - Effetto sinergico con il Cap site

Table 15.1 Synergism Between Poly(A) and Cap during Translation of Luciferase mRNA in Tobacco Protoplasts

mRNA	Luciferase mRNA Half-life (min)	Luciferase Activity (light units/mg protein)	Relative Effect of Poly(A) on Activity	Relative Effect of Cap on Activity
Uncapped				
Poly(A) ⁻	31	2941	1	1
Poly(A) ⁺	44	4480	1.5	1
Capped				
Poly(A) ⁻	53	62,595	1	21
Poly(A) ⁺	100	1,331,917	21	297

L'mRNA dell'enzima luciferasi è stato inserito in cellule eucariotiche in presenza/assenza di cap site e poliadenilazione. L'attività luciferasica è stata misurata a vari intervalli di tempo per verificare la stabilità dell'mRNA.

Sequenze segnale della Poliadenilazione

- L'esamero **AAUAAA** è usato come segnale per la poliadenilazione nei mammiferi e piante

Sono usati altri esameri anche se meno efficienti

- A valle del sito AAUAAA sono importanti altre sequenze:
 1. Una sequenza ricca in GU
 2. Una sequenza costituita da poli-U

Il Meccanismo di Poliadenilazione:

Avviene in 2 fasi

- Fase 1: richiede il sito AAUAAA
- Fase 2: Il segnale AAUAAA serve per attaccare le prime 10A, l'ulteriore adenilazione non necessita di questo sito

Proteine richieste per la Poliadenilazione

Fase I:

1. CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor), che si lega alla sequenza AAUAAA
2. PolyA polimerasi

Fase II:

1. PolyA polimerasi (PAP II)
2. PolyA Binding Protein II (PAB II)
 - PAB II si lega alla coda corta di poly-A
 - Incentiva la poly-A polimerasi II (PAPII) a sintetizzare catene più lunghe di poly-A

Il Meccanismo di Poliadenilazione:

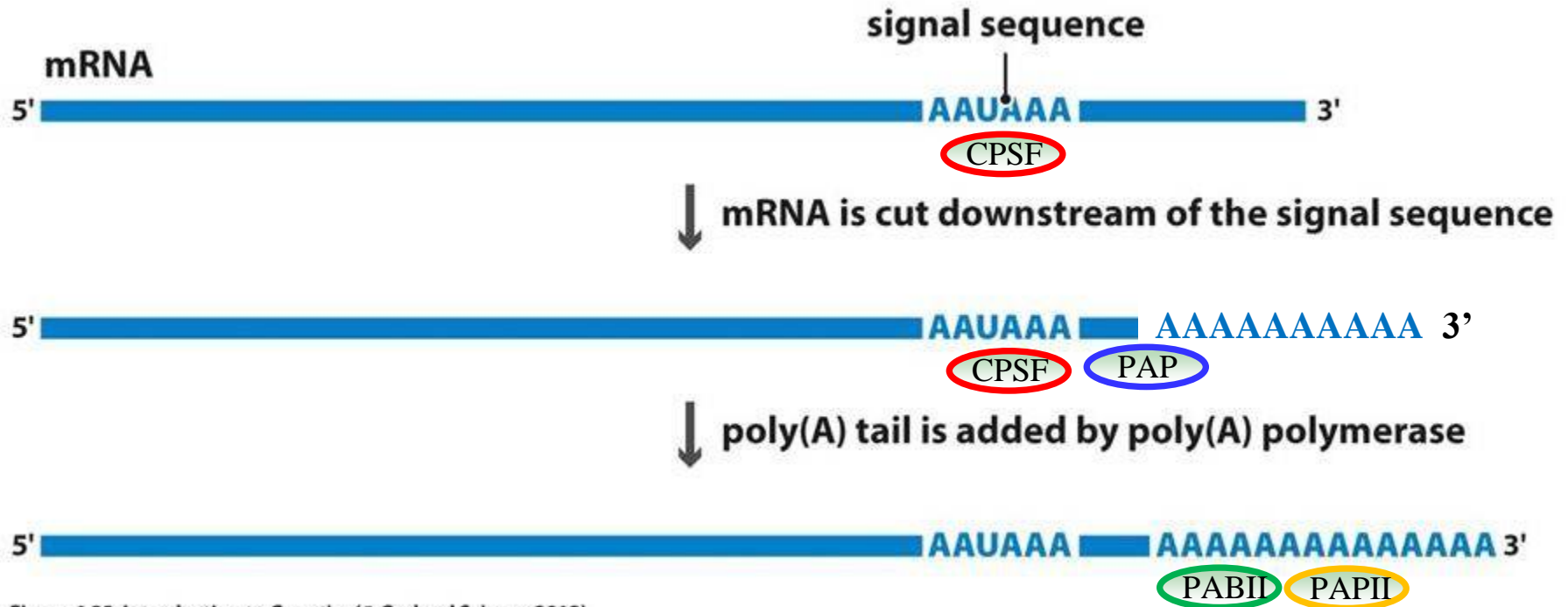


Figure 4.33 Introduction to Genetics (© Garland Science 2012)

Splicing dell'mRNA

Splicing dell'mRNA

1. Nei batteri e fagi: la sequenza codificante è contigua, non sono presenti introni.
2. Negli eucarioti: La sequenza codificante è interrotta da sequenze non-coding dette introni.

Splicing dell'mRNA

Introni

1. Il loro numero è estremamente variabile.

Es.

50 nel gene del collagene del pollo.

363 nel gene che codifica per la *Titina* umana.

2. La dimensione di introni ed esoni è variabile, ma spesso gli introni sono più grandi degli esoni.

Es.

① 150 nucleotidi formano alcuni esoni: 800 kilo basi, la grandezza di alcuni introni.

② Il gene per l'enzima diidrofolato reduttasi contiene 6 esoni che corrispondono 2 kilo basi su un totale di 31kilo basi dell'mRNA. La regione codificante rappresenta meno del 10% della lunghezza totale.

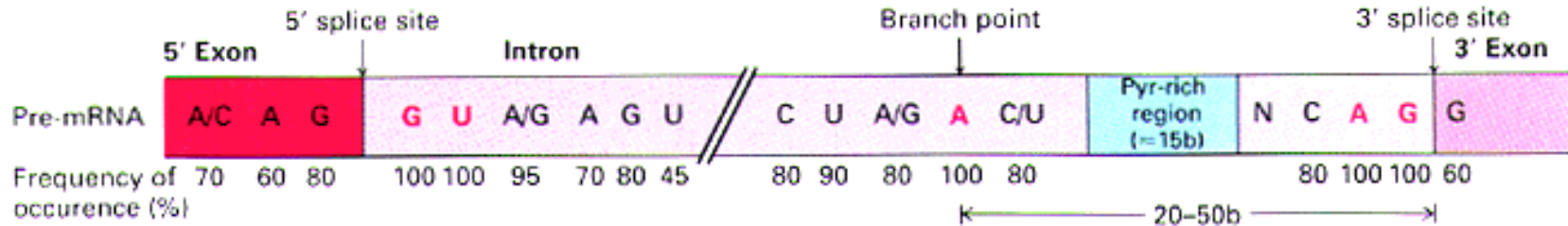
Splicing dell'mRNA

● **Lo splicing dell'mRNA:** è il processo che permette la rimozione degli introni dal trascritto primario.

● **Lo splicing alternativo:** è il processo in cui alcuni pre-mRNA possono essere processati in più modi, generando mRNA alternativi. Il 60% dei geni umani sono processati in questo modo.

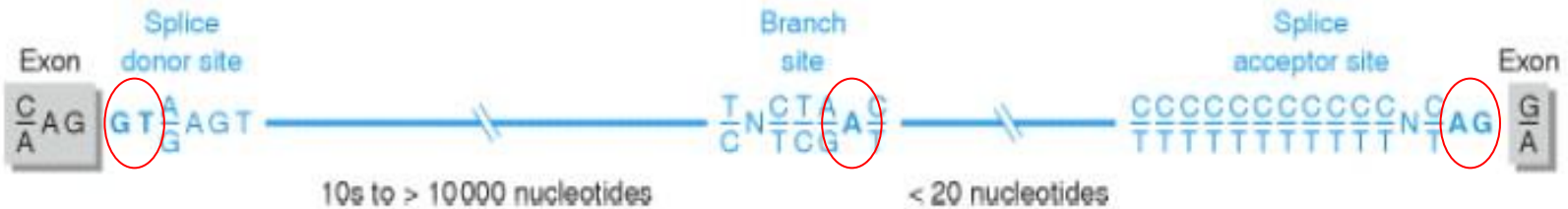
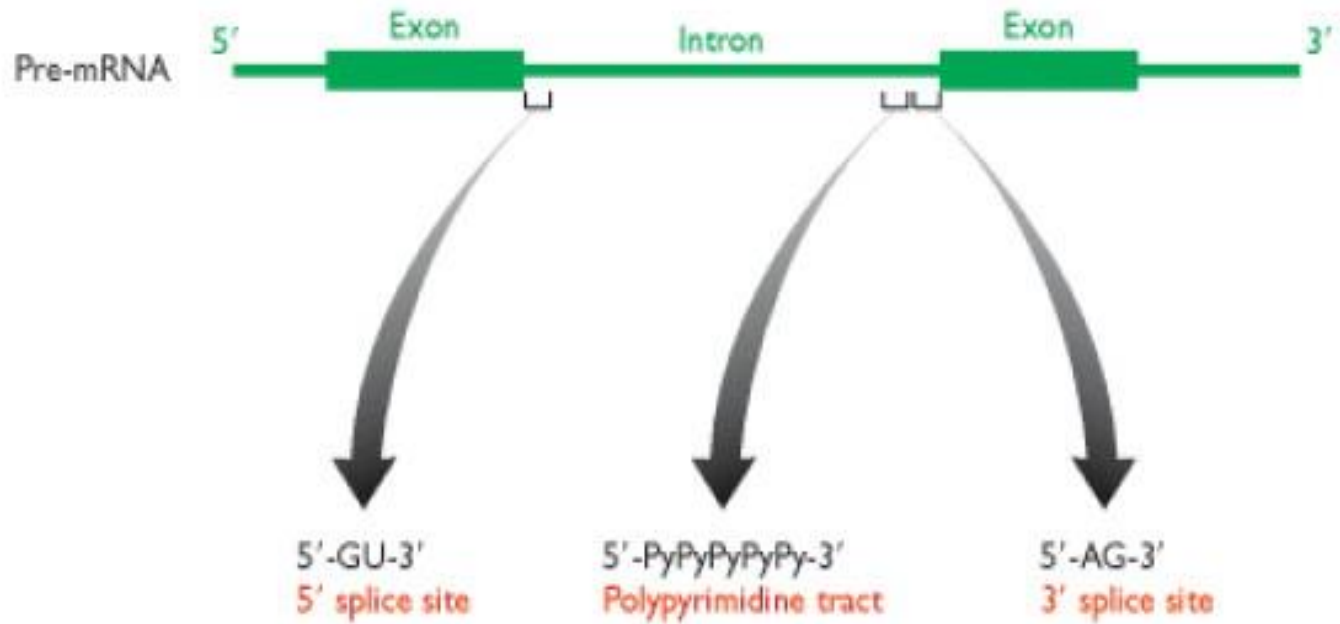
Splicing dell'mRNA

Il complesso dello splicing riconosce sequenze conservate



- **Il sito 5' di splicing:** l'estremità 5' dell'introne inizia generalmente con GU
- **Il sito 3' di splicing:** l'estremità 3' dell'introne termina generalmente con AG
- **Il sito di ramificazione:** è formato da una A vicina all'estremità 3' dell'introne, la quale è seguita da un tratto di polipirimidine

Splicing dell'mRNA



Splicing dell'mRNA

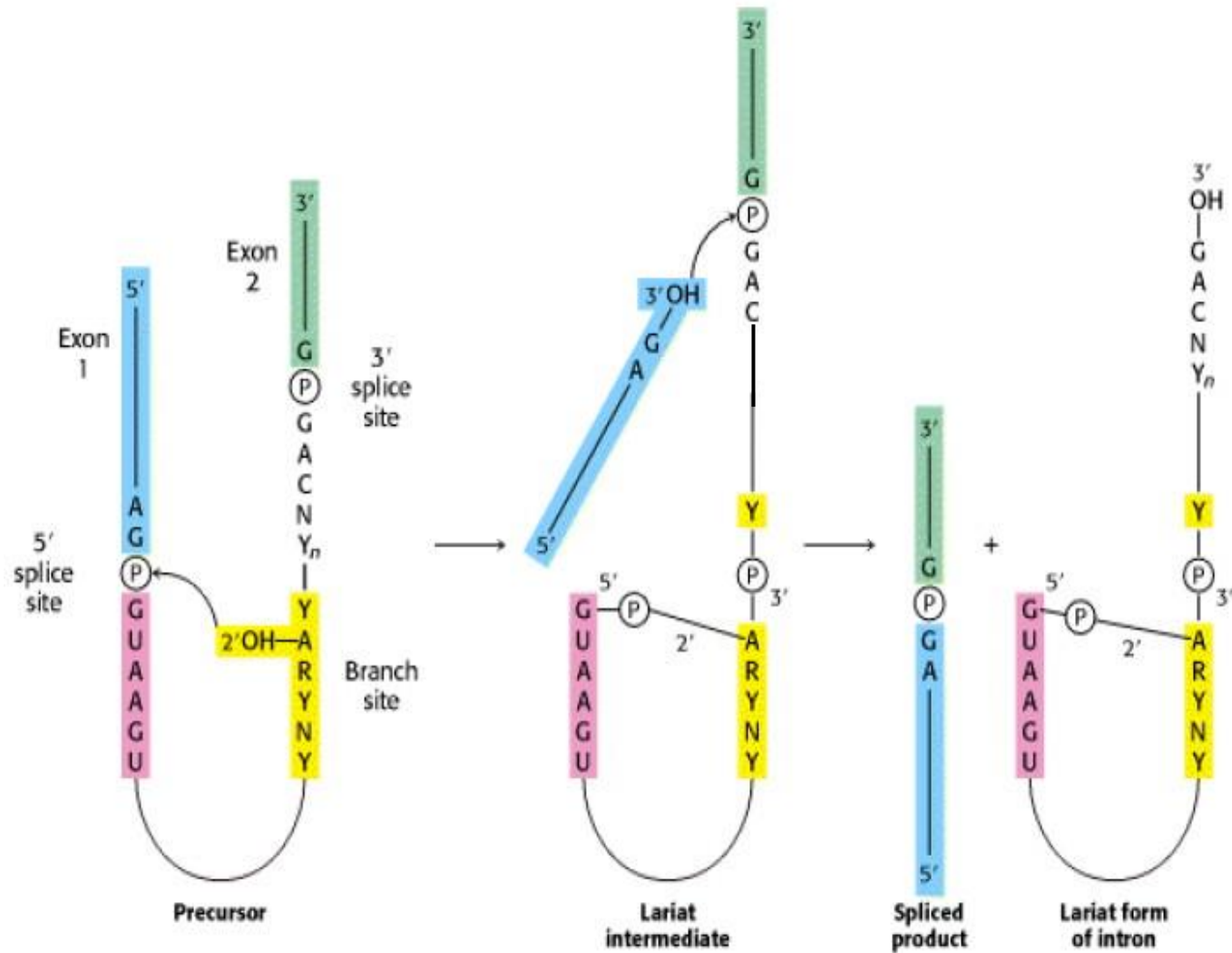
Gli introni sono rimossi mediante un processo chiamato splicing

Consta di due successive reazioni di **transesterificazione**

Step1: L'OH dell'adenina conservata (sito di ramificazione) forma un legame con il gruppo fosfato della guanina conservata presente al sito 5' di splicing. L'esone all'estremità 5' è rilasciato e l'estremità 5' dell'introne forma una struttura a cappio.

Step 2: L'OH libero dell'esone 5' forma un legame con il gruppo fosfato del primo nucleotide dell'esone successivo. Ne consegue il legame dei due esoni, mentre l'introne si sgancia in una struttura contorta a forma di cappio.

Splicing dell'mRNA



Splicing dell'mRNA

Lo splicing dell'mRNA è condotto da un grosso complesso chiamato spliceosoma

- Il processo descritto precedentemente (splicing) è mediato dallo **spliceosoma**.
- Lo spliceosoma è costituito da circa 150 proteine e 5 “Small Nuclear” **snRNA**.
- Molte funzioni dello spliceosoma sono esplicate dalla sua componente di RNA.

Splicing dell'mRNA

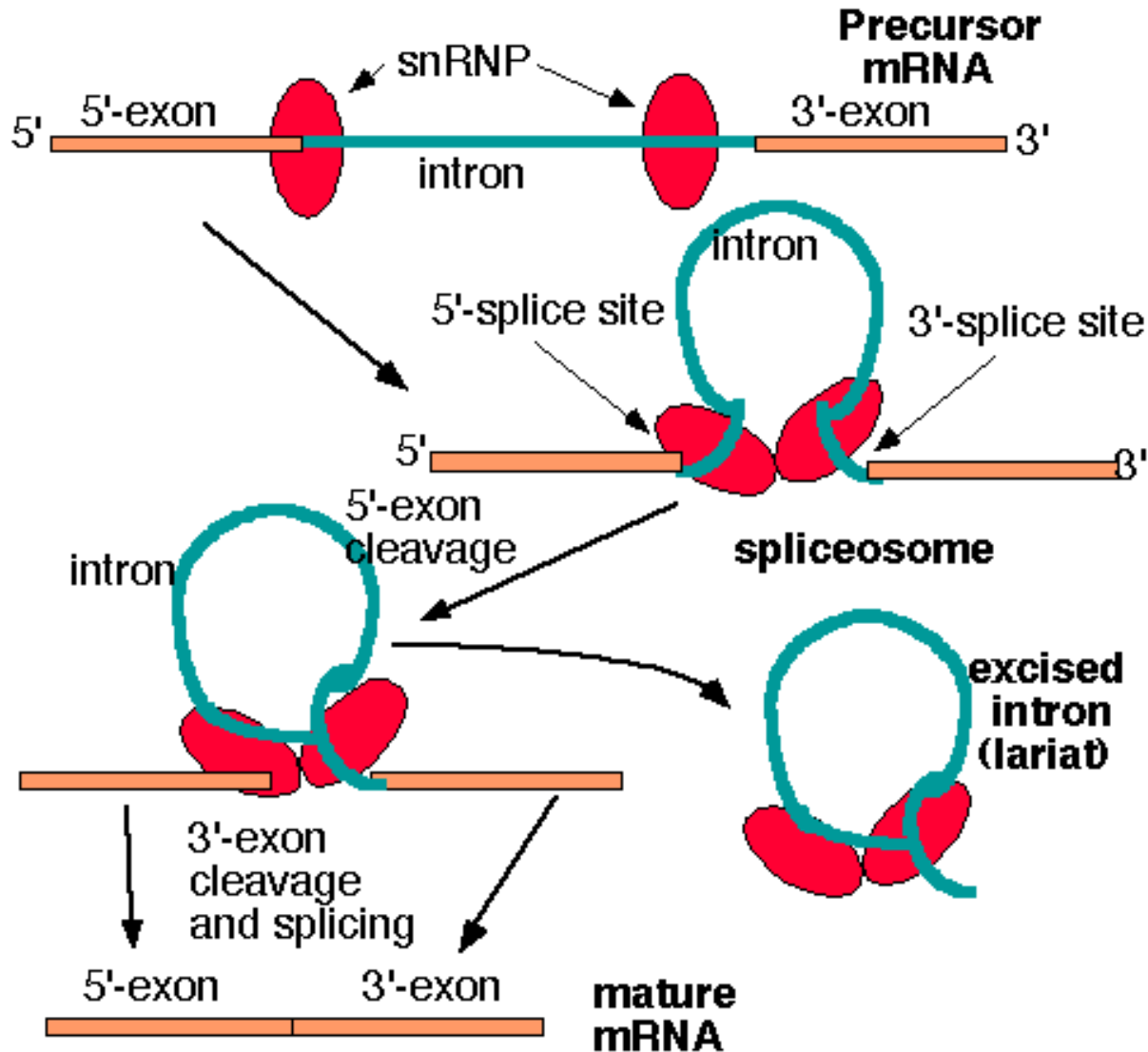
- I 5 RNA detti (U1, U2, U4, U5, e U6, 100-300 nt) sono definiti **small nuclear RNA (snRNAs)**.
- I complessi formati da snRNA e proteine sono detti **small nuclear ribonuclear proteins (snRNP)**, si pronuncia “snurps”).

Splicing dell'mRNA

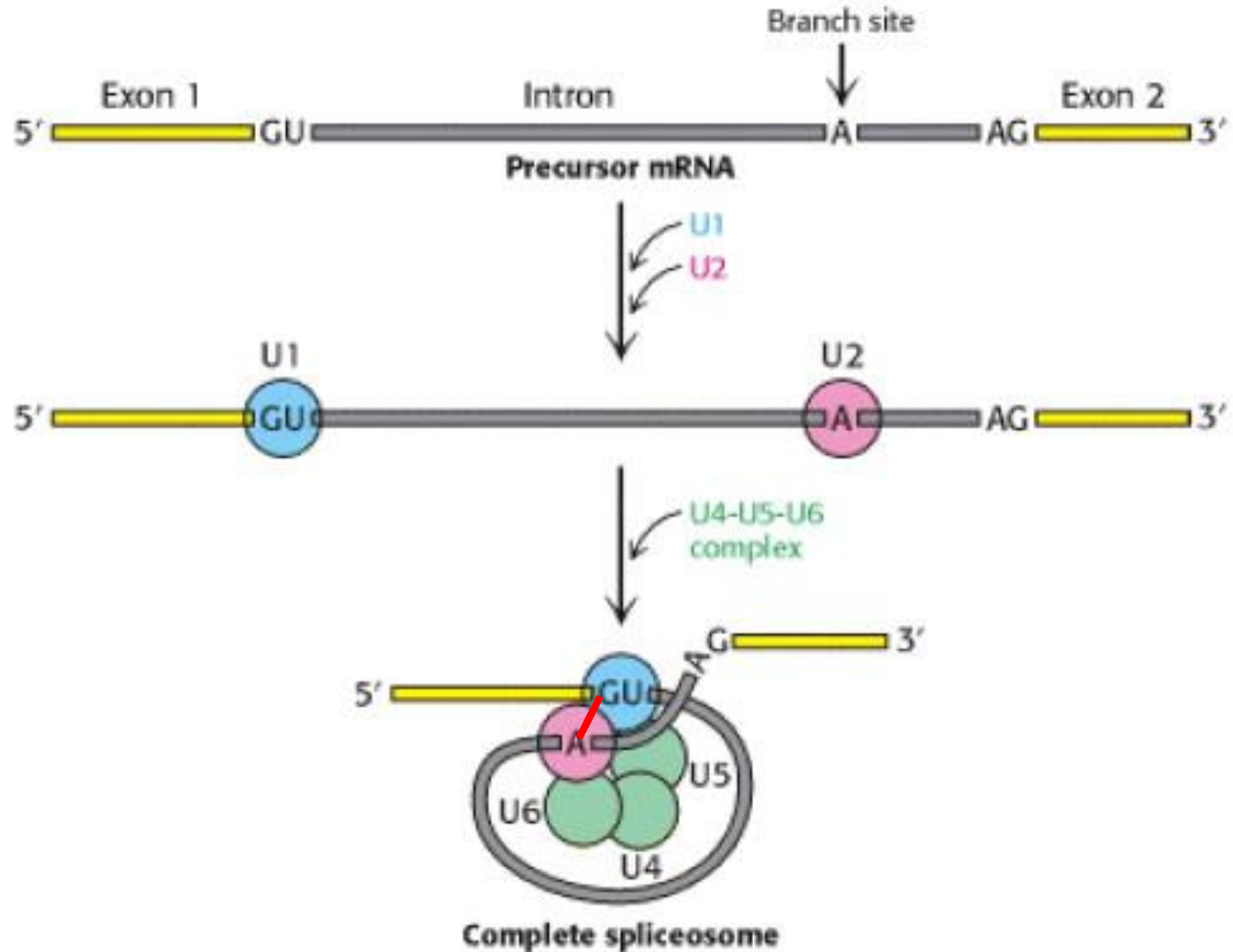
Nello splicing le snRNPs hanno tre ruoli:

1. **Riconoscere** il sito 5' di splicing ed il sito di ramificazione.
2. **Avvicinare** questi siti.
3. **Catalizzare** il taglio dell'RNA.

Splicing dell'mRNA



Splicing dell'mRNA

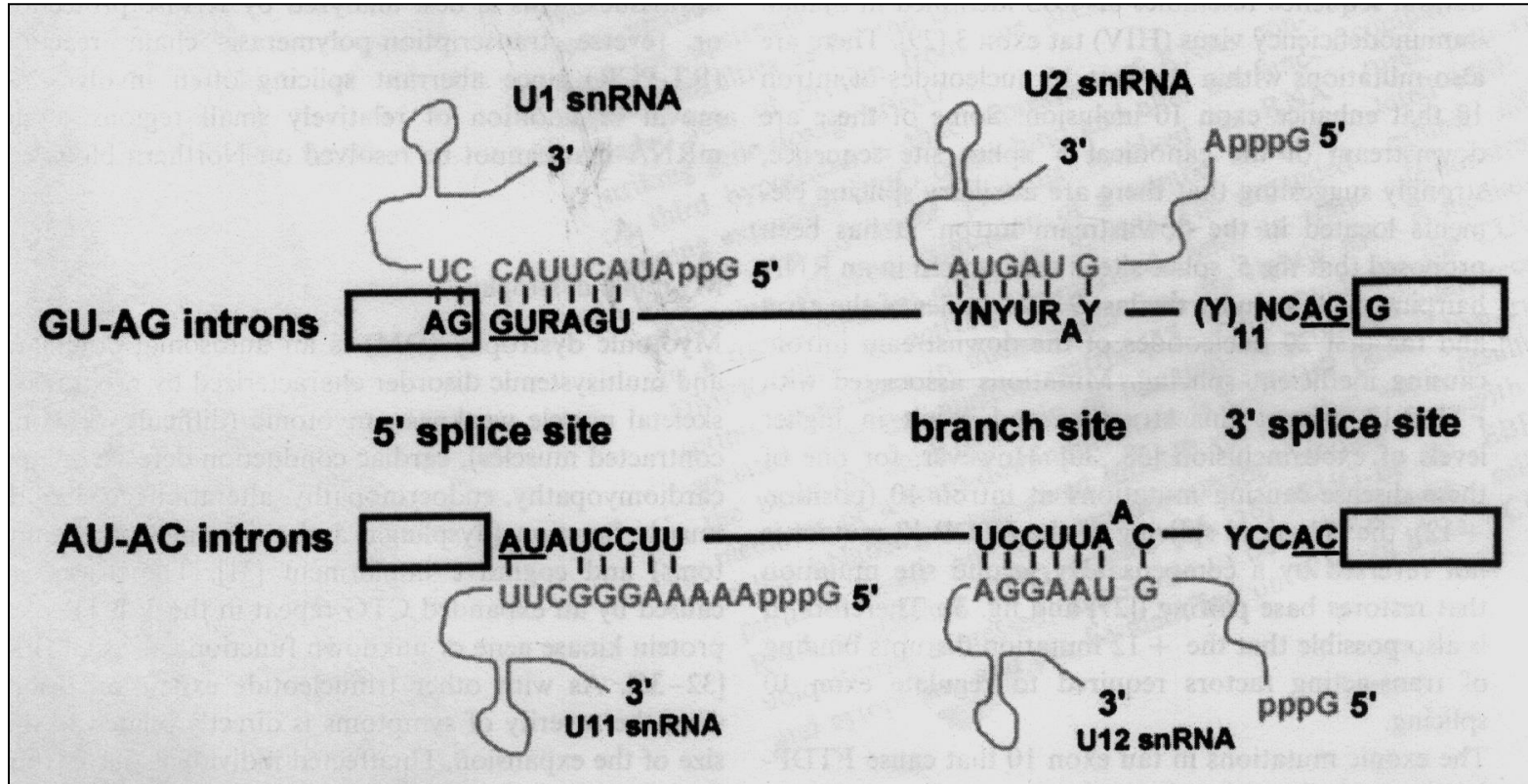


Splicing dell'mRNA

TIPI DI INTRONI

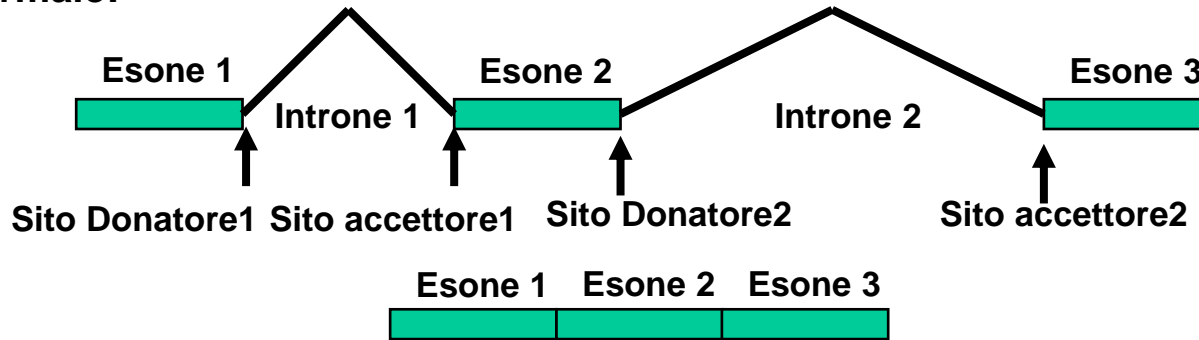
- INTRONI 'GU – AG';
- INTRONI 'AU – AC';

Splicing dell'mRNA

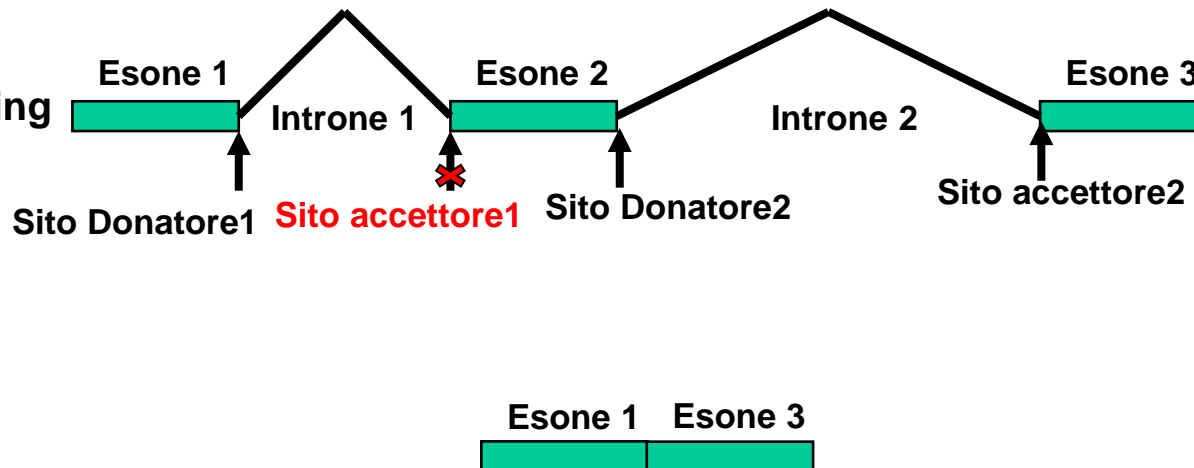


SPLICING ALTERNATIVO

Splicing normale:



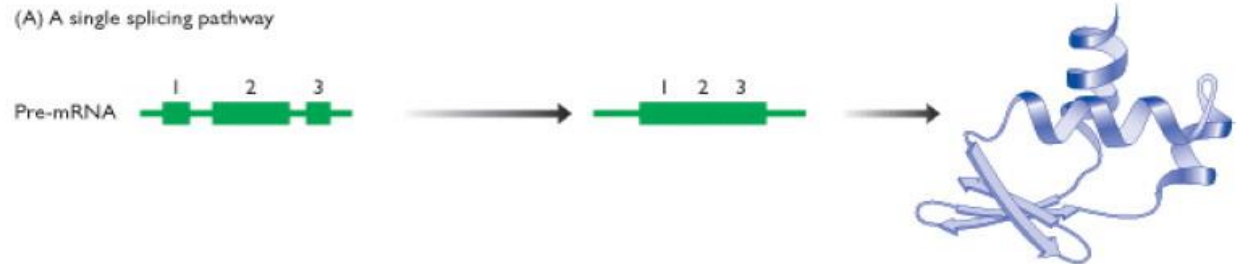
Exon Skipping



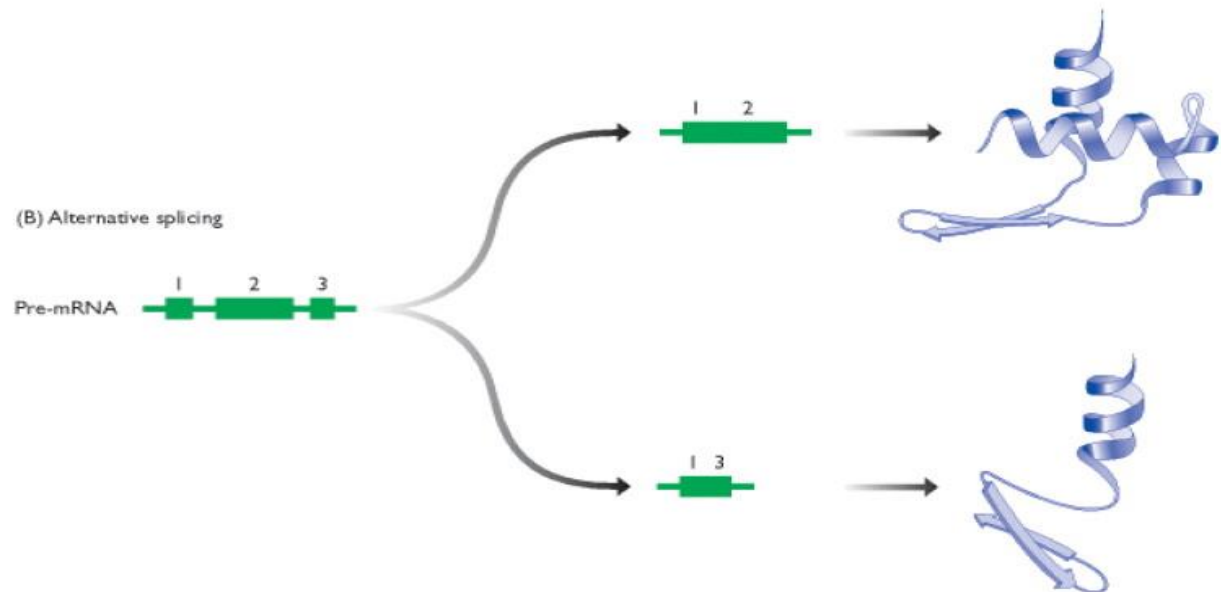
SPLICING ALTERNATIVO

- Un esone = un dominio della proteina
(Lo scambio dei domini tra le proteine = evoluzione)

Splicing normale



Exon Skipping



SPLICING ALTERNATIVO

CONSEGUENZE POSITIVE:

LO SPLICING DIFFERENZIALE AVVIENE:

- IN TESSUTI DIVERSI
- IN DIFFERENTI STADI DELLO SVILUPPO

SPLICING ALTERNATIVO

CONSEGUENZE NEGATIVE:

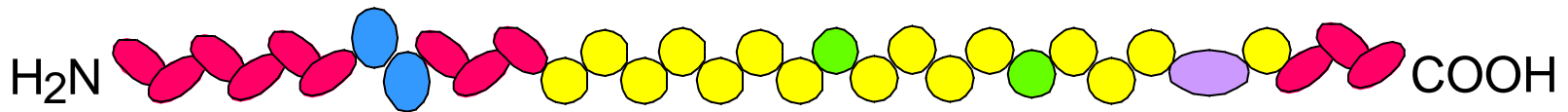
- MUTAZIONI NELLA SEQUENZA NUCLEOTIDICA DEL DNA CHE DANNEGGIANO I SITI DI SPLICING POSSONO CAUSARE SPLICING ANORMALI CON FORMAZIONE DI PROTEINA NON FUNZIONANTI E QUINDI PATOLOGIE.
- PRINCIPALMENTE MALATTIE NEURODEGENERATIVE (DISTROFINOPATIE, ATROFIA MUSCOLARE SPINALE ETC).

SPLICING ALTERNATIVO

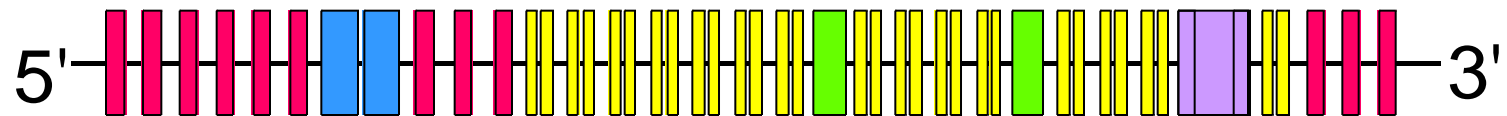
Esempi

Il gene della fibronectina si è evoluto mediante duplicazione degli esoni

Fibronectina:



Gene della Fibronectina:



Domini

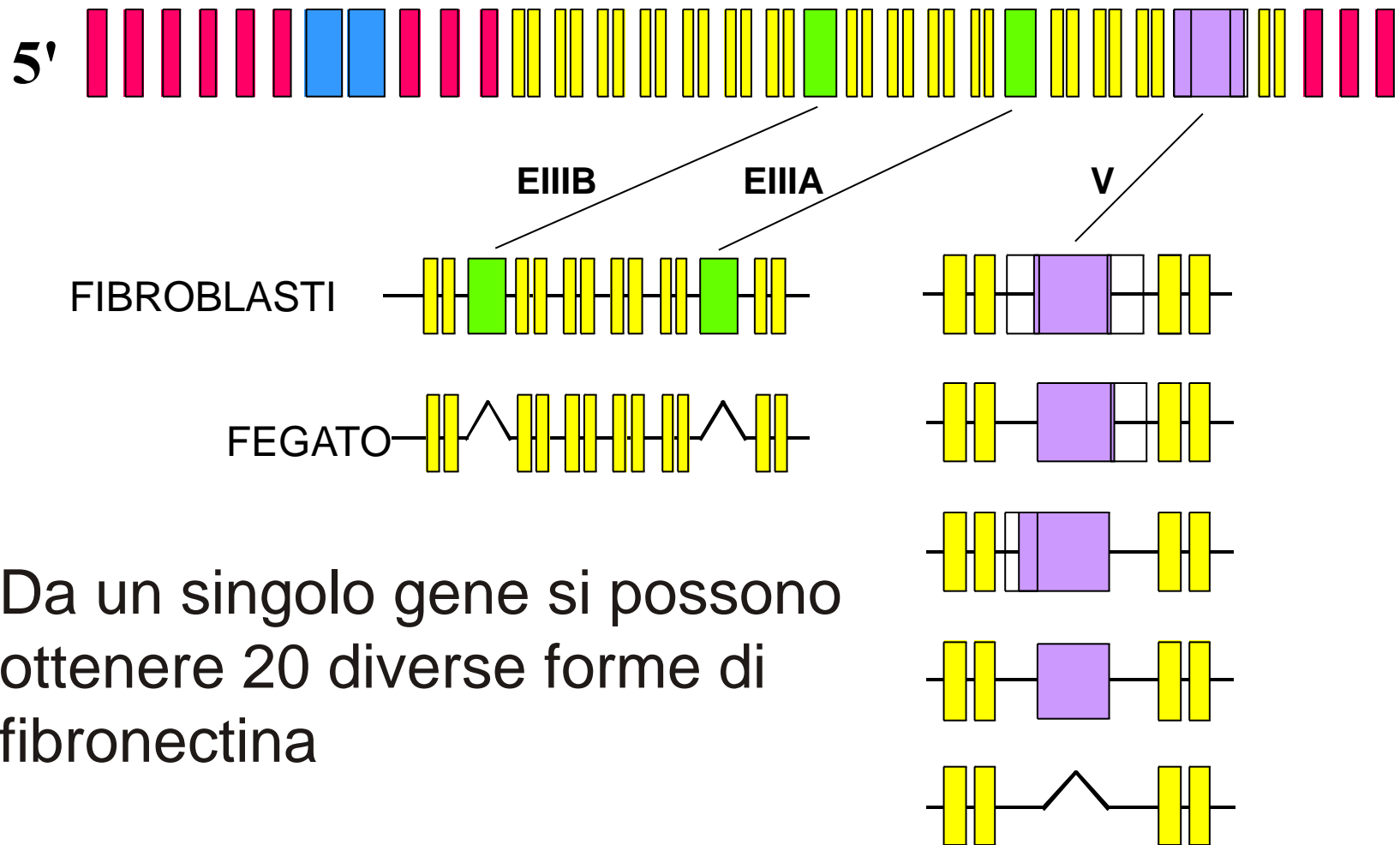
Tipo I  - Simile all'attivatore del Plasminogeno

Tipo II  - Simile ai domini di proteine della coagulazione

Tipo III  - Presente in recettori di membrana e in proteine della matrice extracellulare

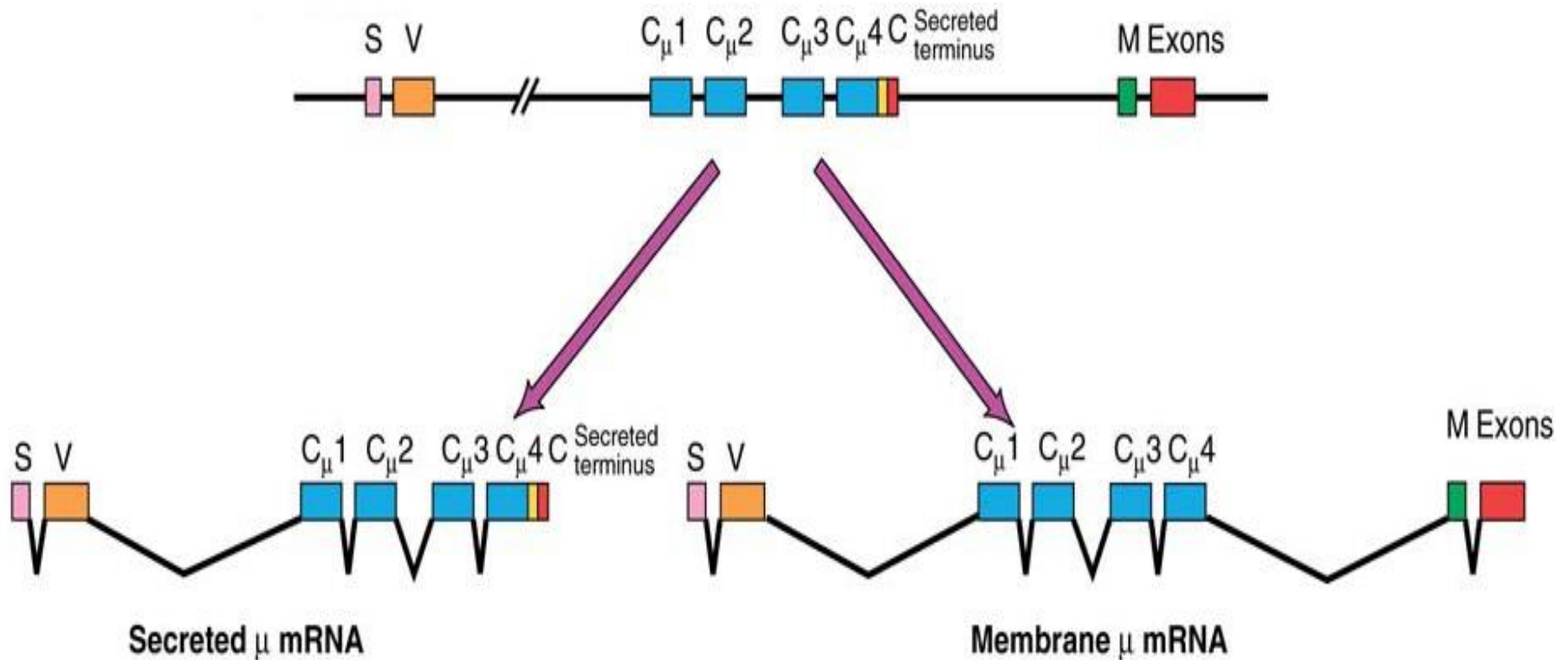
SPLICING ALTERNATIVO

SPLICING ALTERNATIVO DELLA FIBRONECTINA



SPLICING ALTERNATIVO

Splicing alternativo dell'mRNA per le immunoglobuline del topo



S = peptide segnale
V = regione variabile
Rosso = UTR

C = regione costante
Verde = ancora di membrana
Giallo = stop della traduzione per la forma secreta

SPLICING ALTERNATIVO

Il pre-mRNA della Troponina T (proteina del muscolo) viene processato alternativamente in modo da produrre 64 differenti isoforme della proteina

