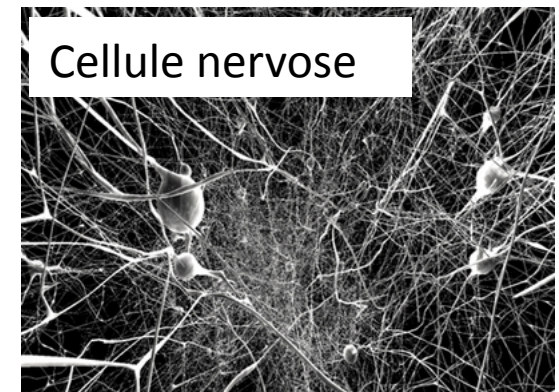
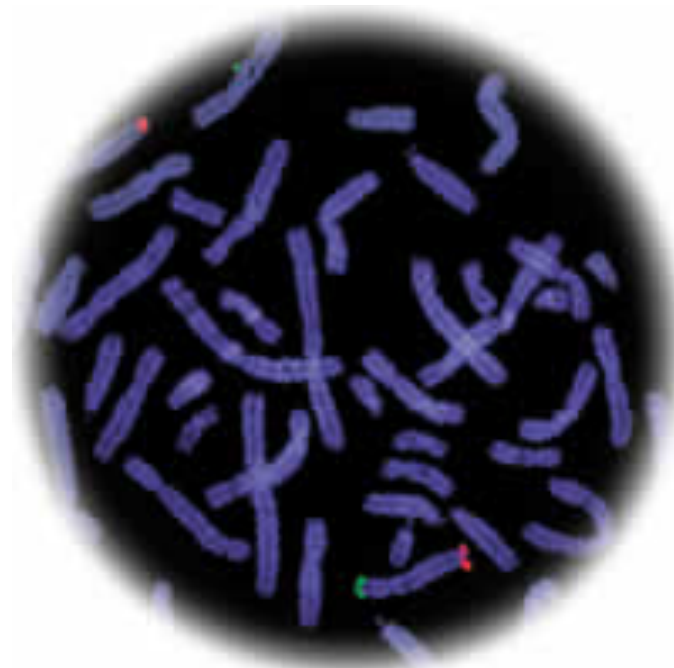
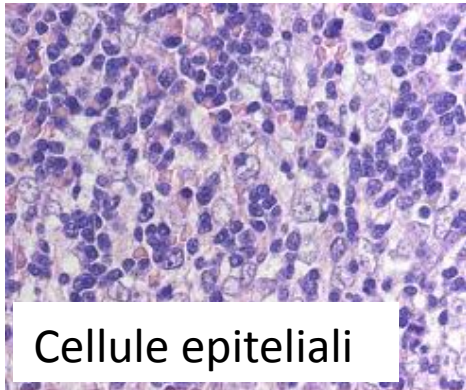


Processamento degli RNA messaggeri

Dr.ssa Mariangela Morlando

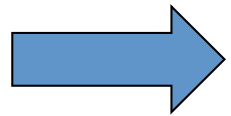


CONOSCENDO LA CONFORMAZIONE SPAZIALE DELLA MOLECOLA DI DNA SI INIZIA AD INTUIRE COME POSSA:

IMMAGAZZINARE

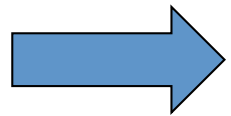
COPIARE

TRASMETTERE L'INFORMAZIONE GENETICA



DUPLICAZIONE

UTILIZZARE QUESTE INFORMAZIONI PER DARE ORIGINE
A CELLULE E TESSUTI MORFOLOGICAMENTE E
FISIOLOGICAMENTE DIVERSI



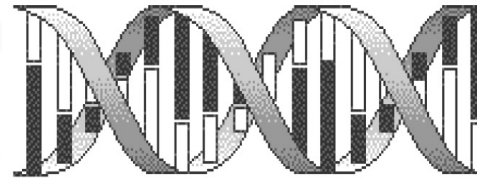
ESPRESSIONE GENICA

(TRASCRIZIONE E TRADUZIONE)

Dogma centrale

DNA è in grado di replicarsi

(DNA polimerasi)



DNA

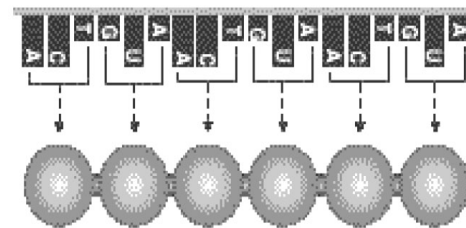
DNA di un gene è

trascritto in RNA

(RNA polimerasi I, II, III)



RNA

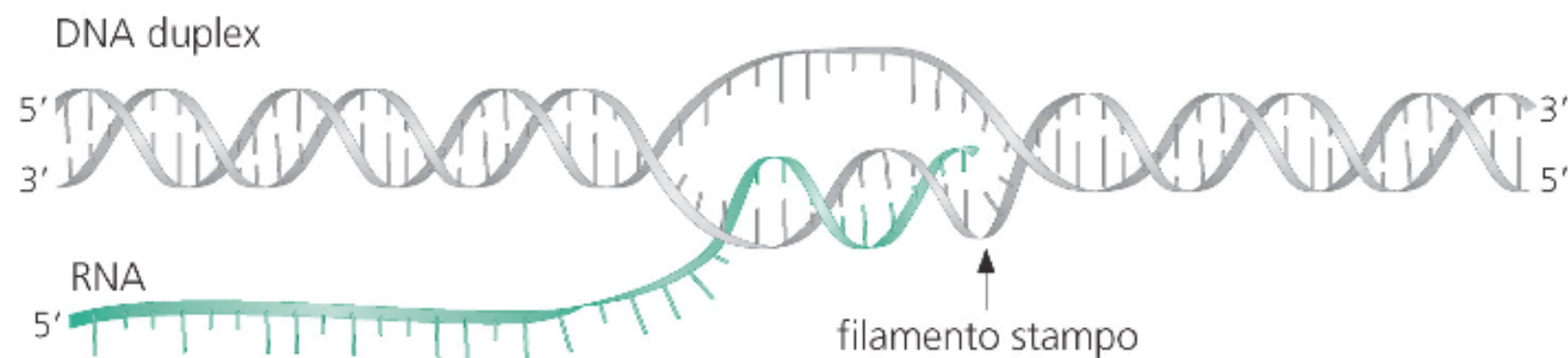


polipeptide

L'RNA è **tradotto** in proteina

(Ribosoma)





Meccanismo di Trascrizione

La Trascrizione consiste nella sintesi di RNA a partire da una molecola di DNA come stampo. L'enzima che effettua la sintesi è noto come **RNA polimerasi**.

Proprietà dell'RNA

- Prodotto a partire dal DNA stampo (trascrizione)
- Sequenza complementare a quella del DNA che ne dirige la sintesi
- Molecola a **singolo** filamento con ossatura **zucchero-fosfato**
- Presenza del **ribosio** al posto del deossiribosio
- Presenza dell'**Uracile** al posto della Timina

Tipi di RNA

- **RNA informativi** che vengono tradotti in polipeptidi: RNA messaggeri (mRNA)
- **RNA funzionali** non vengono tradotti in polipeptidi ma svolgono funzioni in quanto RNA: tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, scRNA, siRNA, miRNA.

Ai geni che codificano proteine si affiancano geni che specificano per RNA non codificanti utili alla regolazione della espressione genica.

Stime odierne:

Geni umani codificanti per proteine sono un numero di 20.000-25.000

Geni per RNA non tradotti o *non-coding* RNA (ncRNA, RNA non codificanti proteine), nei mammiferi rappresentano da 1/2 a 3/4 di tutti i trascritti



Il processo è realizzato da **enzimi** chiamati

RNA polimerasi DNA-dipendenti



l'enzima si lega ad una sequenza sul DNA detta **promotore**

Negli **eucarioti**:

RNA polimerasi I → rRNA : 28 S, 18 S, 5.8 S

RNA polimerasi II → precursori degli mRNA,
ncRNA, diversi snRNA

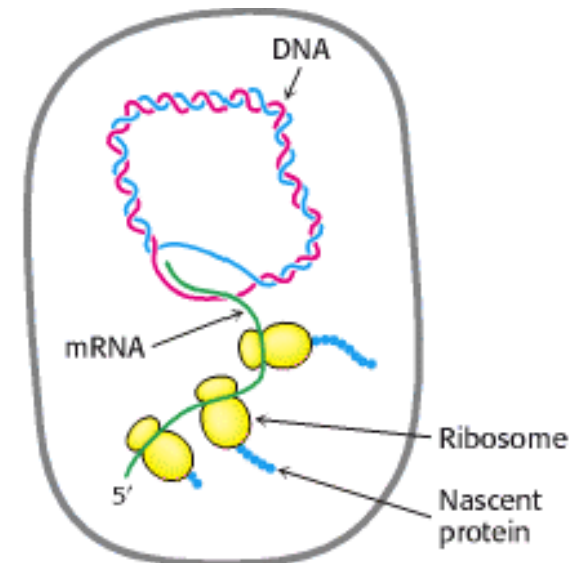
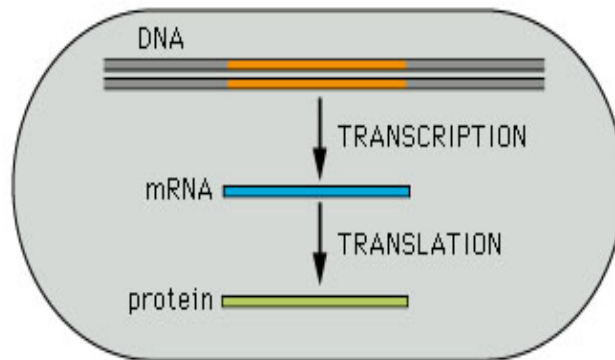
RNA polimerasi III → tRNA e rRNA 5 S e
alcuni snRNA

Gli RNA informativi

ovvero

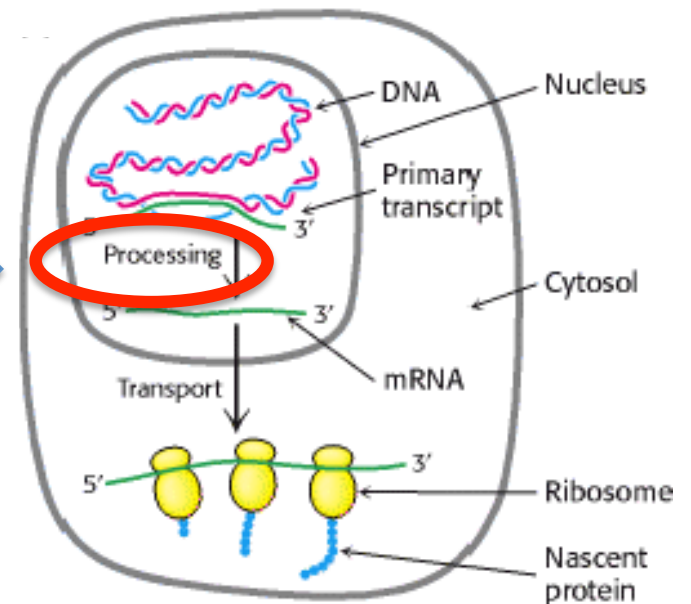
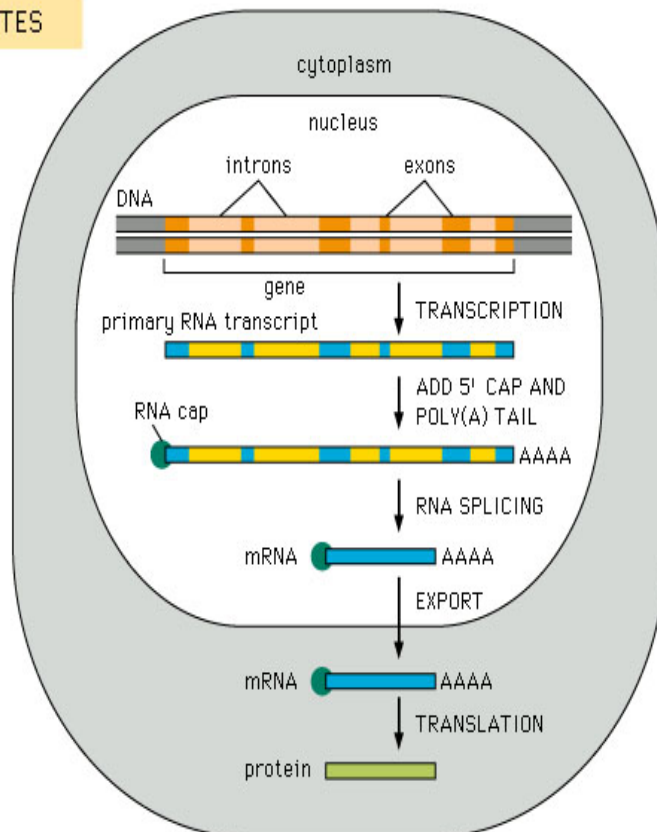
gli RNA messaggeri

PROCARYOTES



PROKARYOTE

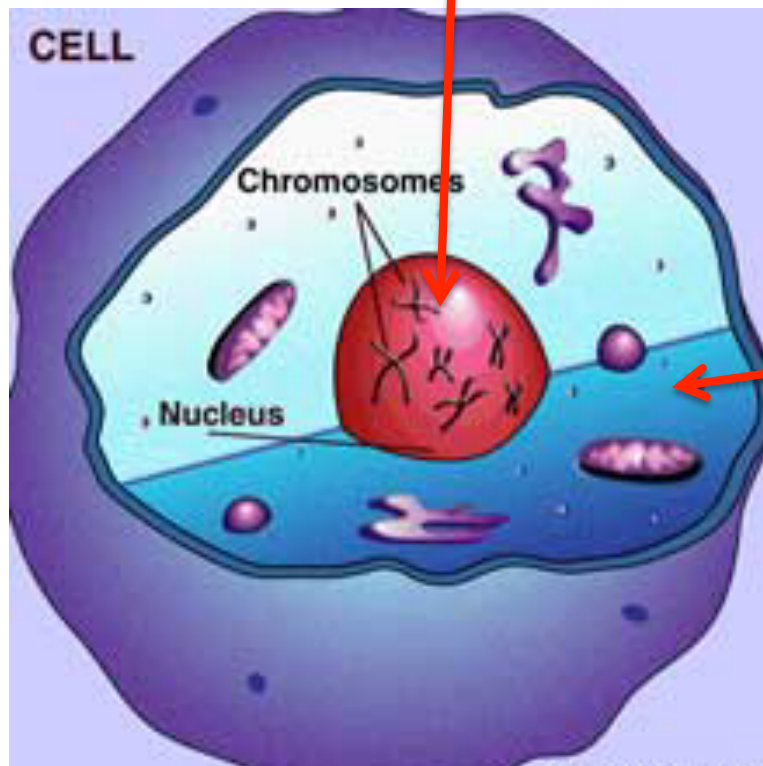
EUCARYOTES



EUKARYOTE

L'RNA deve essere trasportato nel citoplasma per essere tradotto in proteina

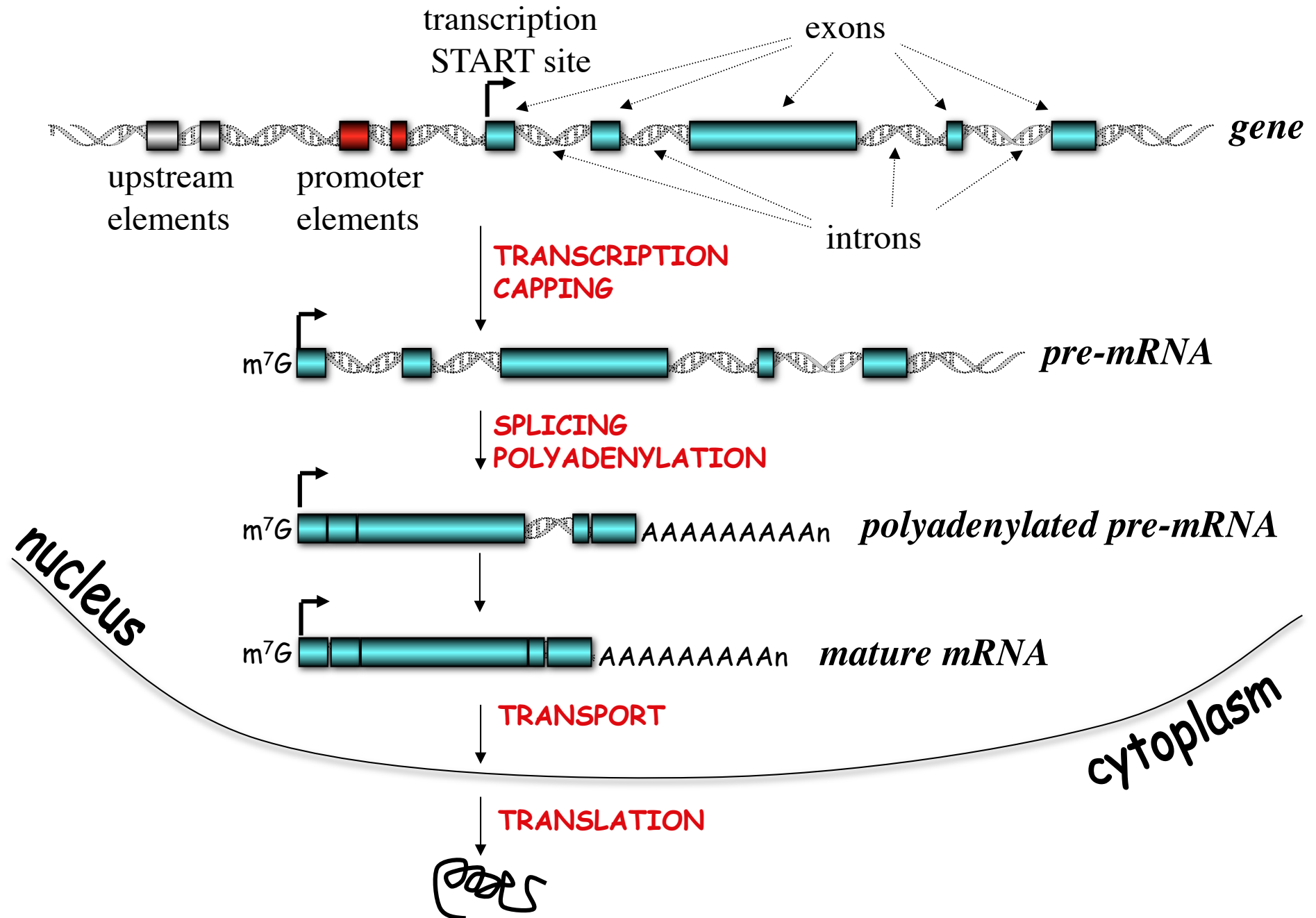
Trascrizione DNA $\rightarrow$ RNA



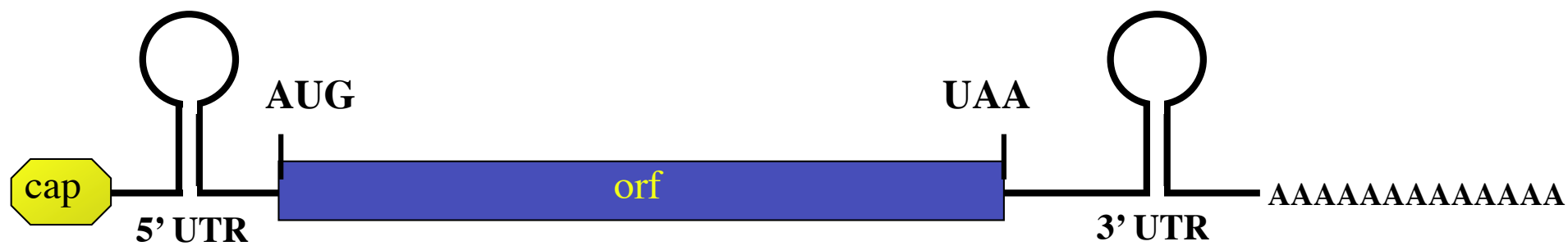
Traduzione RNA $\rightarrow$ Protein



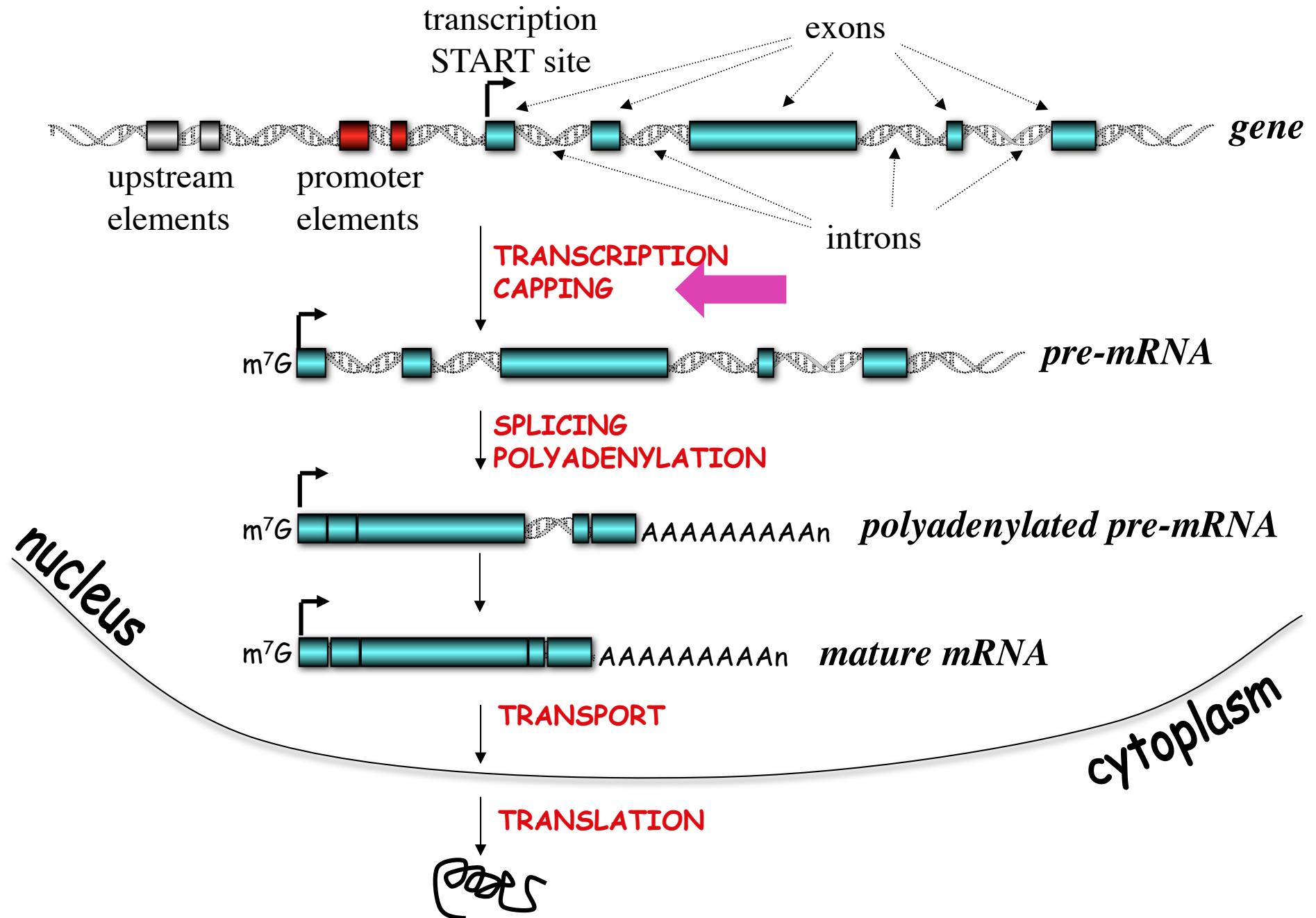
Espressione genica negli eucarioti



Struttura di un mRNA



Espressione genica negli eucarioti



Importanza del cap

- 1) Stabilità RNA
- 2) Controlla l'elongazione della trascrizione e aumenta l'efficienza di splicing
- 3) Favorisce il trasporto dell'RNA al citoplasma
- 4) Aumenta l'efficienza di traduzione (lega eIF4E che fa parte del complesso d'inizio della traduzione)

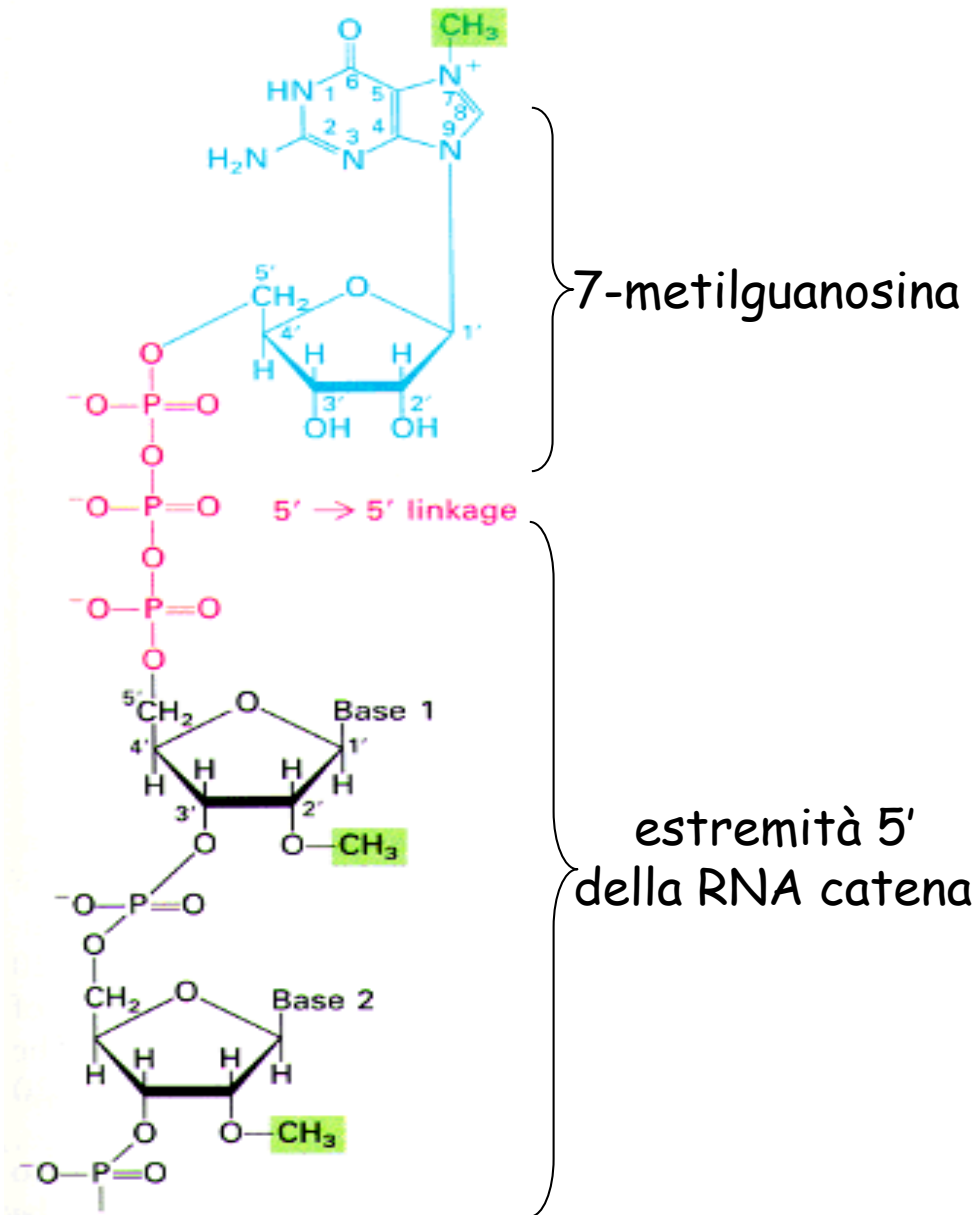
5' CAP: 3'-G-5' ppp5'-N-3'p

- Il cappuccio dell'mRNA viene aggiunto nelle prime fasi della trascrizione

- Il legame 5'-5' fosfodiesterico conferisce un'intrinseca resistenza alla ribonucleasi

- Le molecole di mRNA prodotte sperimentalmente prive di CAP vengono degradate rapidamente

il cap è un elemento di riconoscimento importante in molti processi

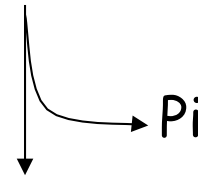


pre-mRNA capping

3 attività enzimatiche:

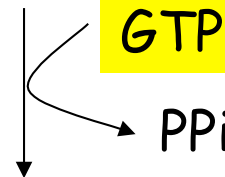
RNA triphosphatase

1. La 5' trifosfatasi rimuove un P terminale



RNA guanylyltransferase

2. La guanililtrasferasi trasferisce un GMP formando un legame 5'-3' trifosfato



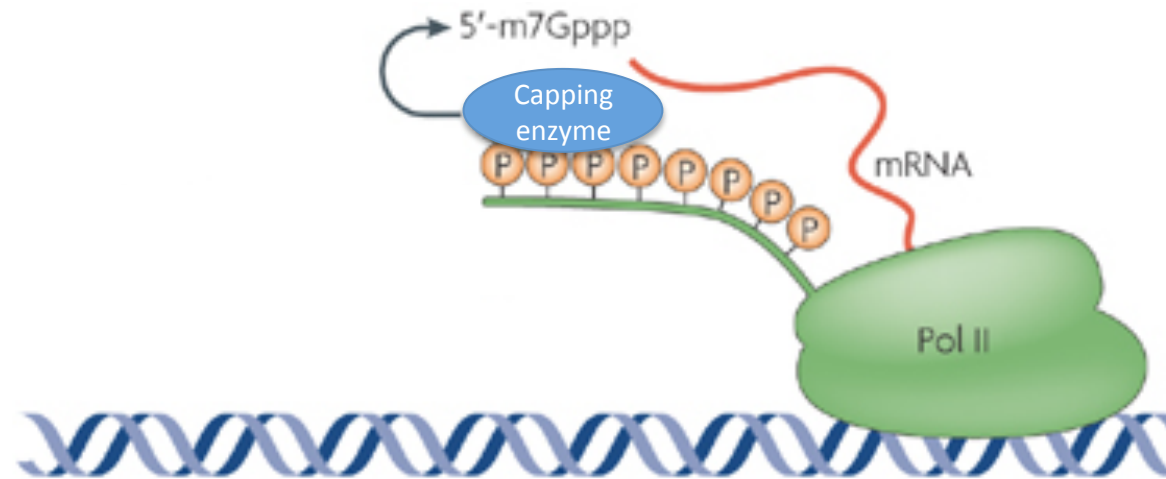
RNA(G-7-) methyltransferase

3. La Guanina-7-metiltrasferasi metila il CAP in posizione N7 (CAP 0)

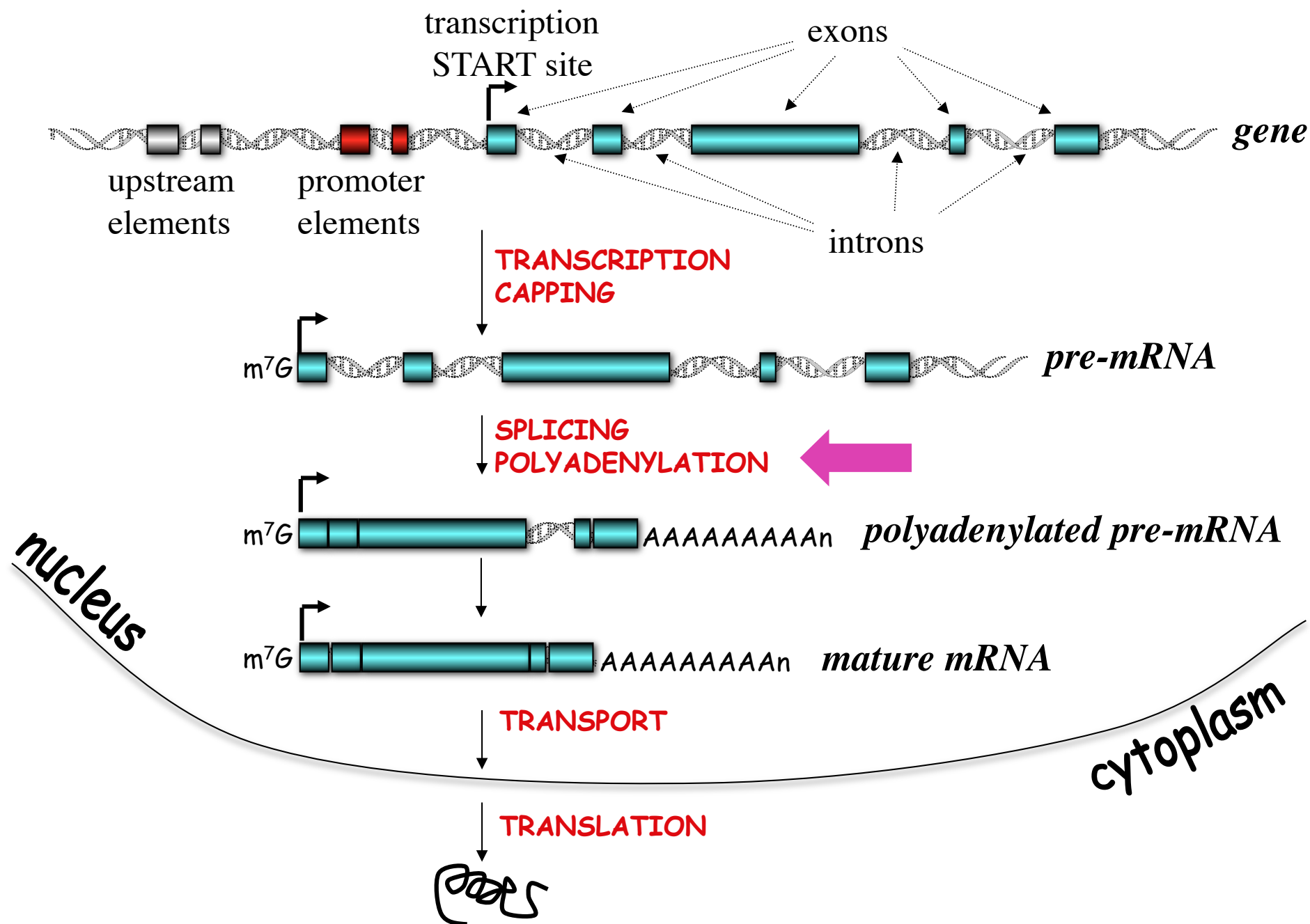
methylation



Gli enzimi di capping agiscono molto precocemente durante la trascrizione del pre-mRNA



Espressione genica negli eucarioti

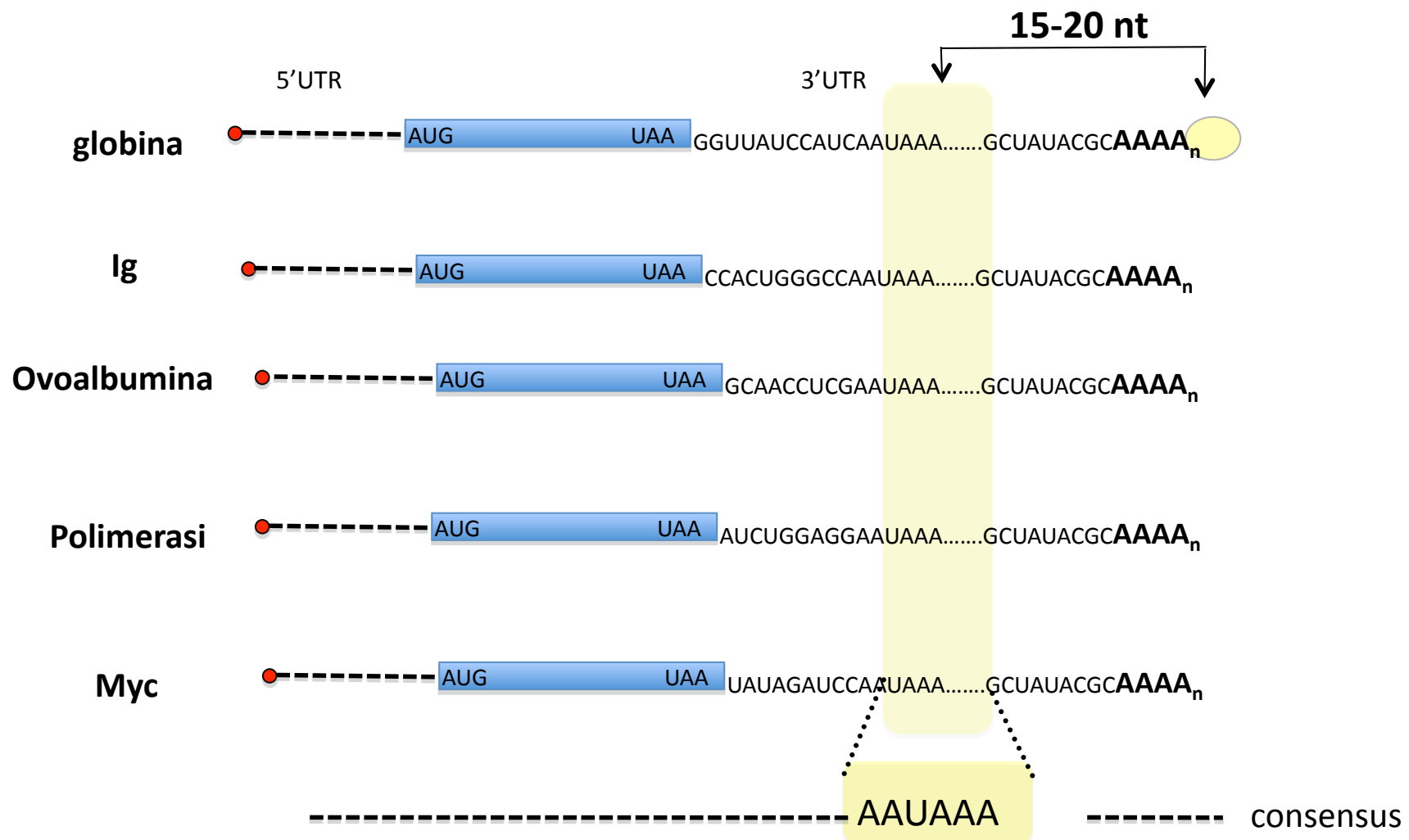


Funzioni della coda di poli-A

1. La presenza della coda di poly(A):
 - a) è importante per la stabilità dell' mRNA
 - b) stimola l'esporto dell'mRNA al citoplasma
 - c) stimola l'inizio della traduzione aumentando l'efficienza di reclutamento della subunità 40S del ribosomaIl processamento all'estremità 3' è essenziale per ottenere un'efficiente terminazione della trascrizione
2. Il processamento all'estremità 3' è essenziale per ottenere un'efficiente terminazione della trascrizione

RICERCA DI SEQUENZE CONSENSUS DELLA POLIADENILAZIONE

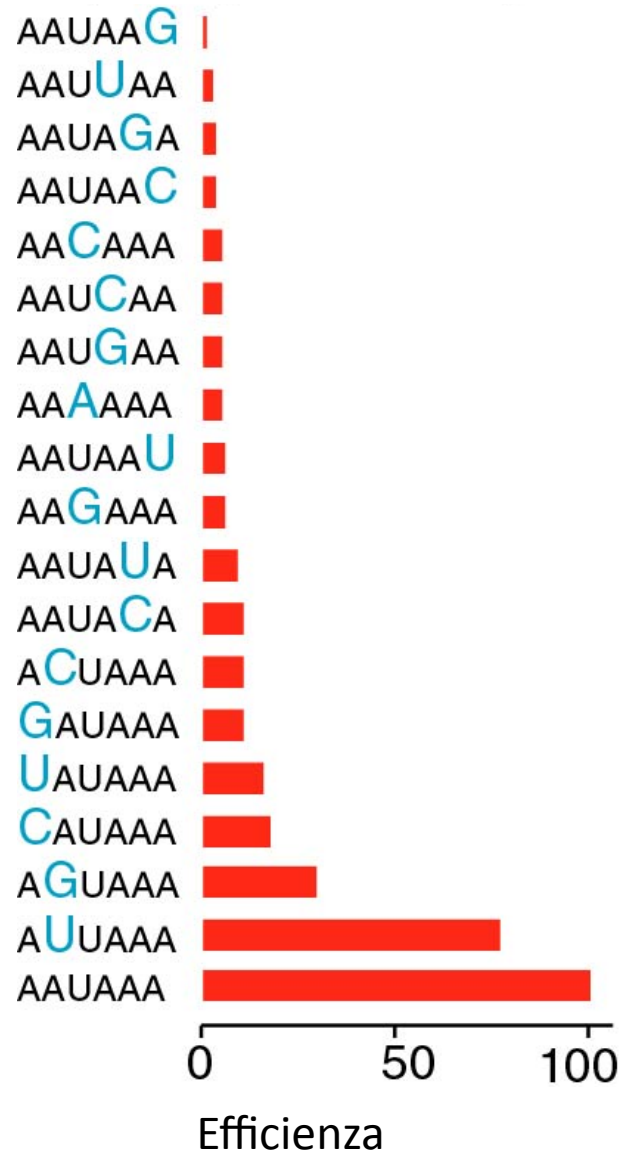
ALLINEAMENTO DI SEQUENZE di cDNA A PARTIRE DALLA CODA DI poli-A



consensus

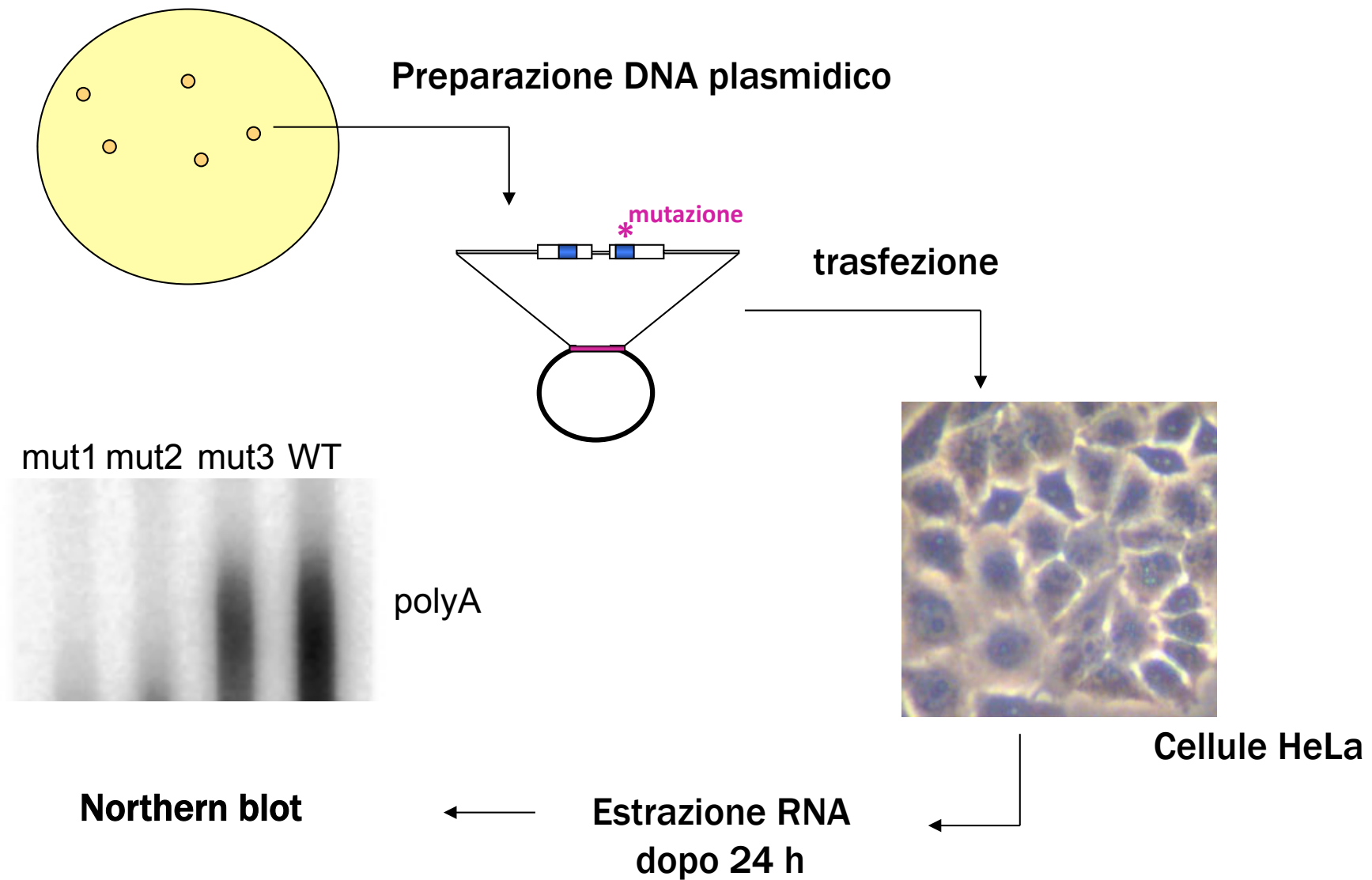
A₉₈A₈₆U₉₈A₉₈A₉₅A₉₆
U₁₂

Efficienza della reazione di poliadenilazione

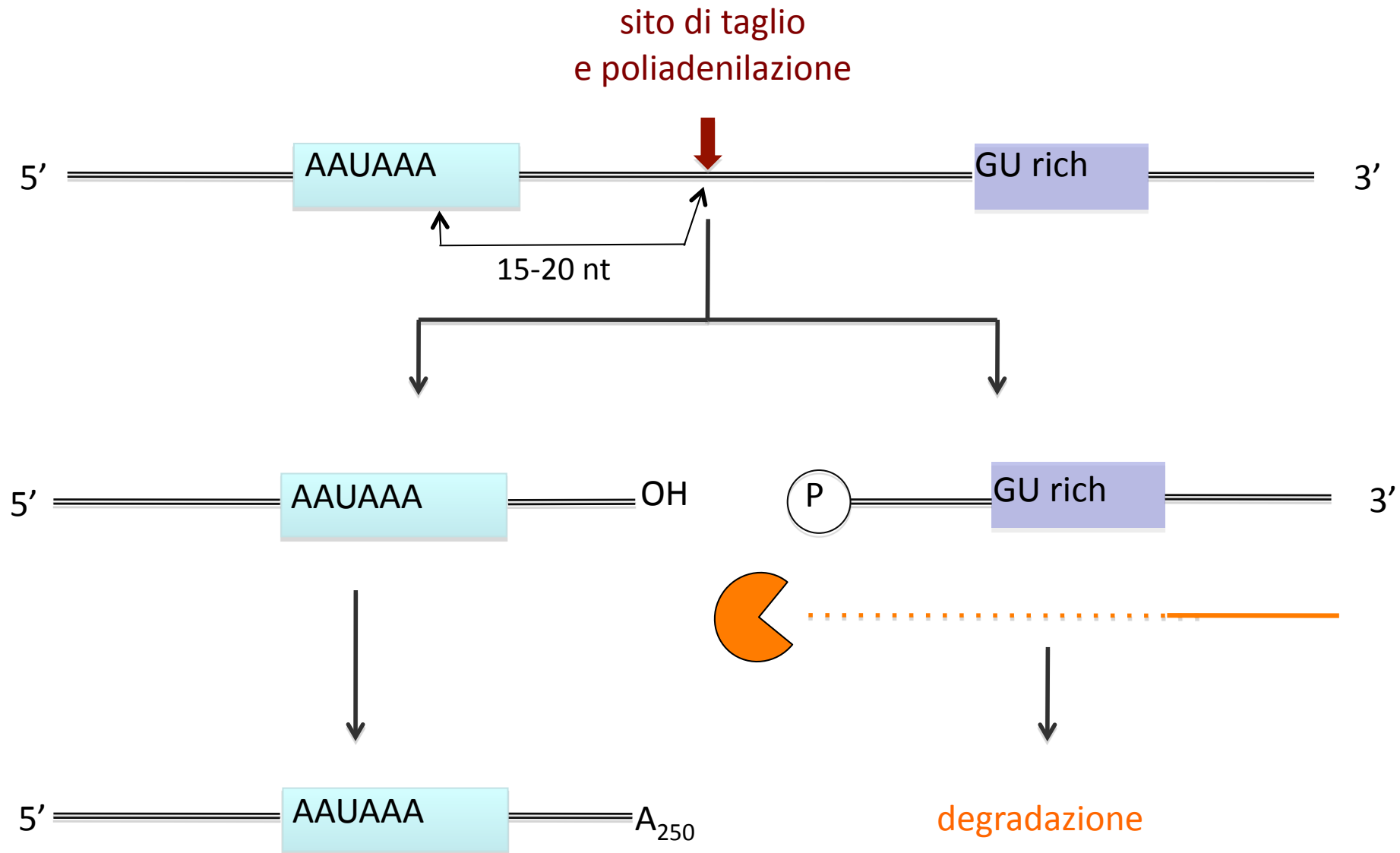


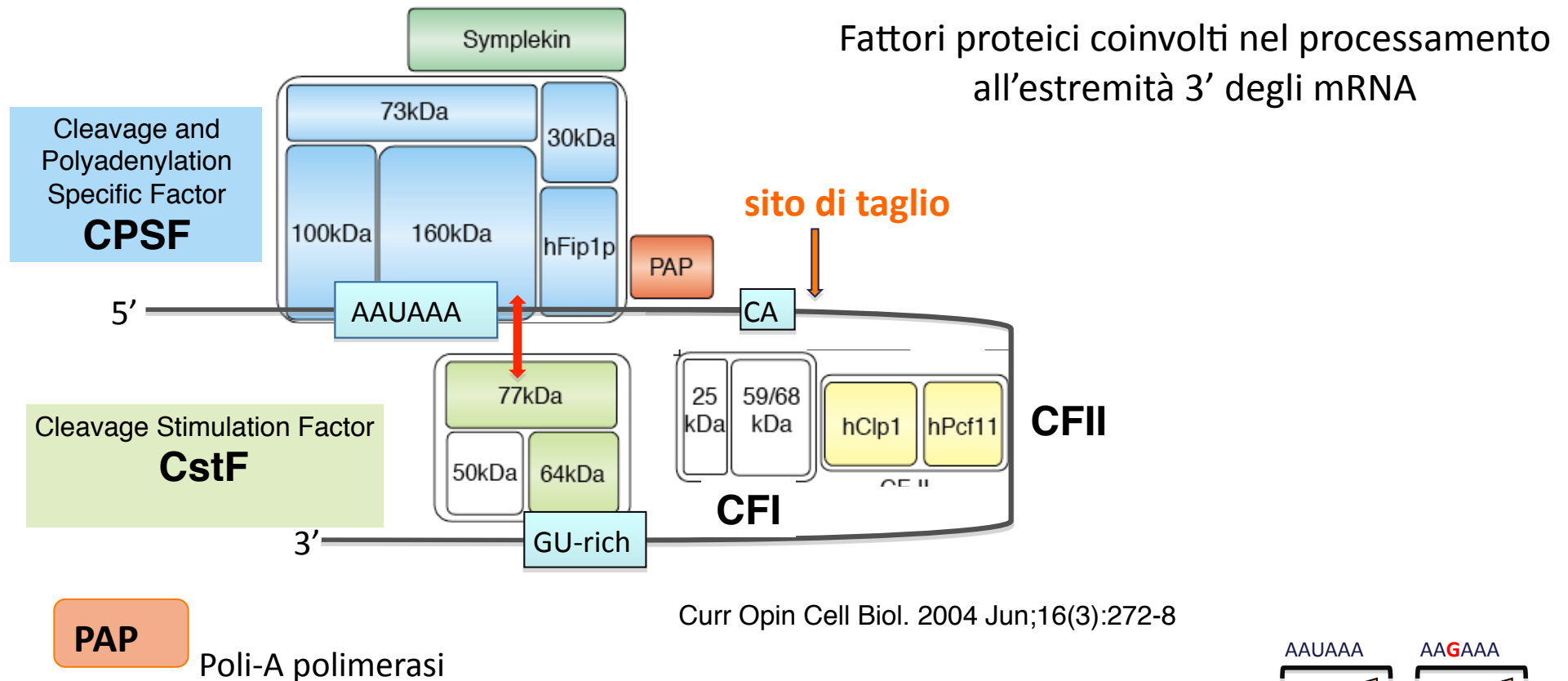
**Importanza della
sequenza
consensus
AAUAAA**

Analisi di mutazioni sito-specifiche

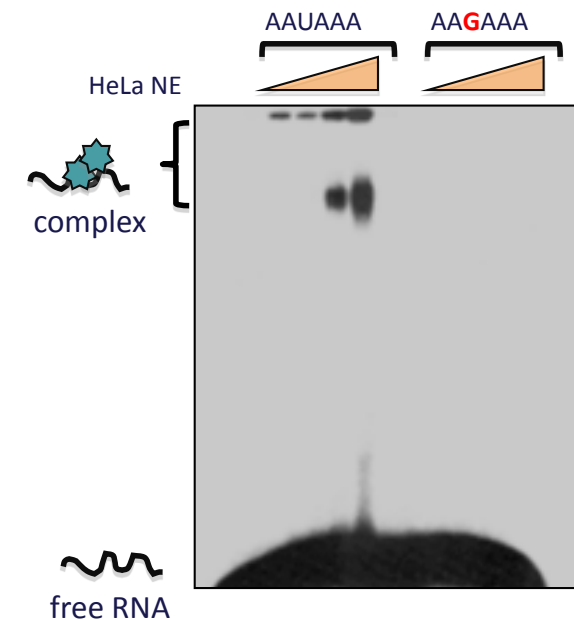


Produzione dell'estremità 3' degli RNA messaggeri in cellule di mammifero

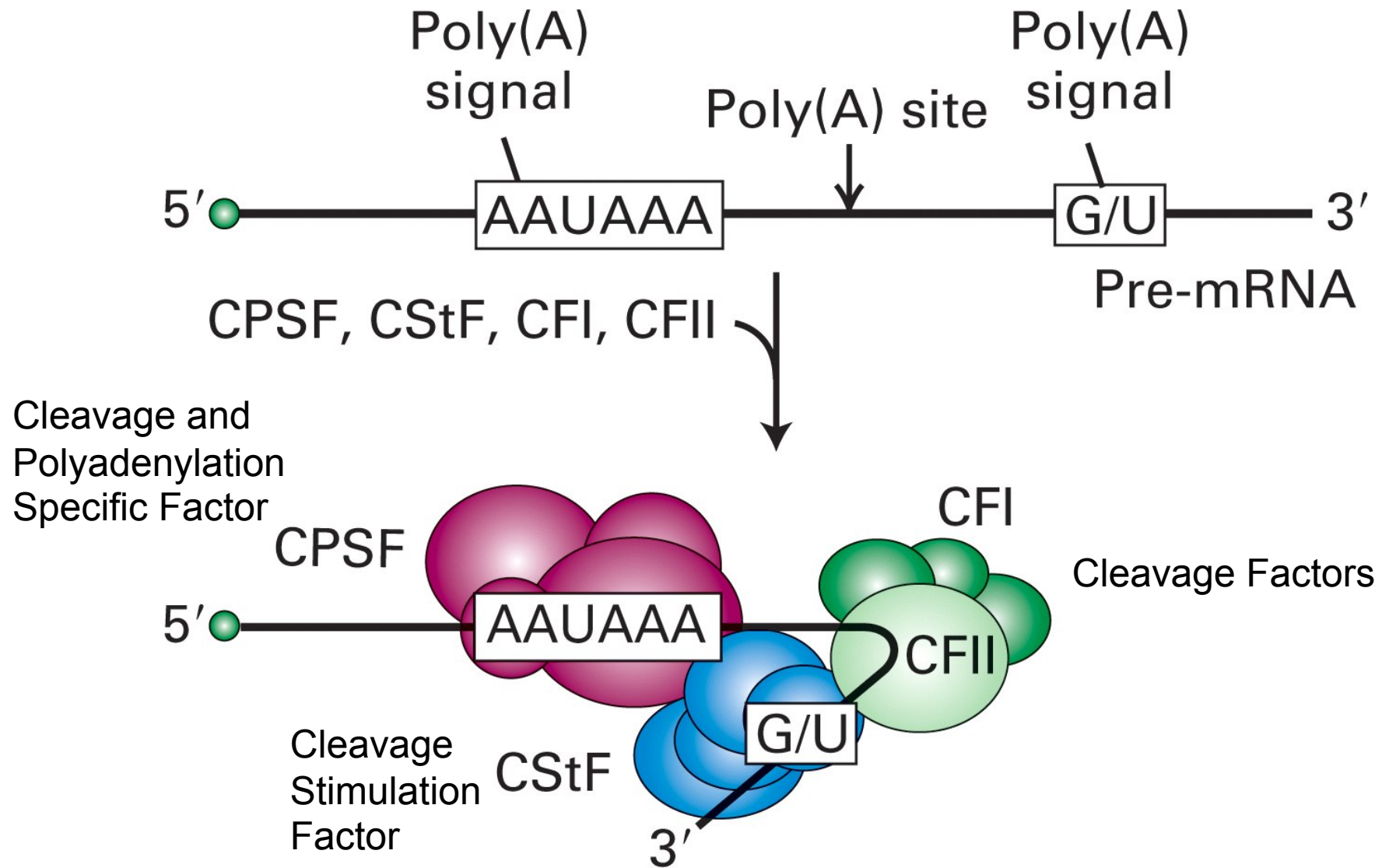




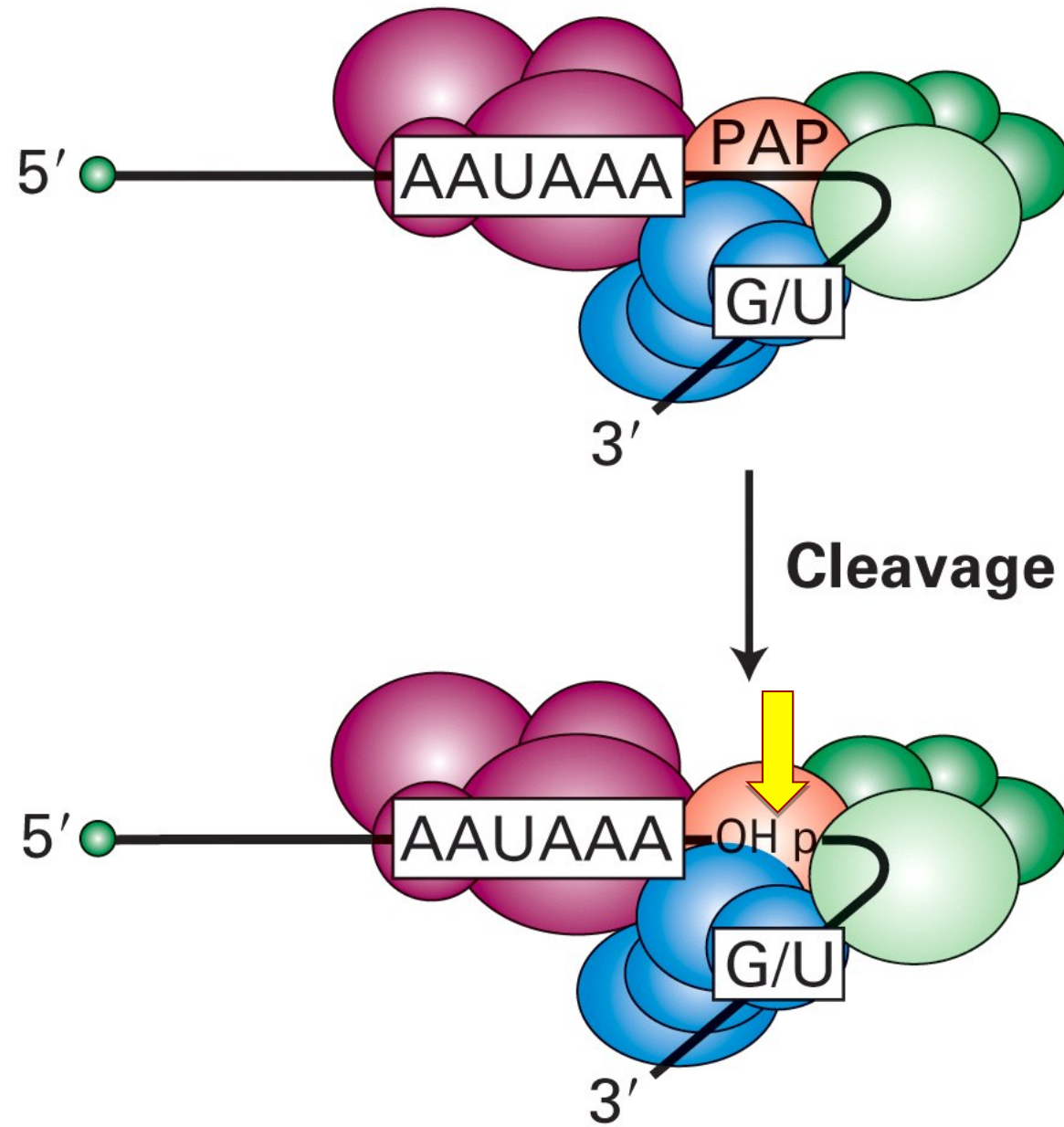
Analisi per band shift dell'interazione della subunità 160 KD del complesso CPSF con l'RNA

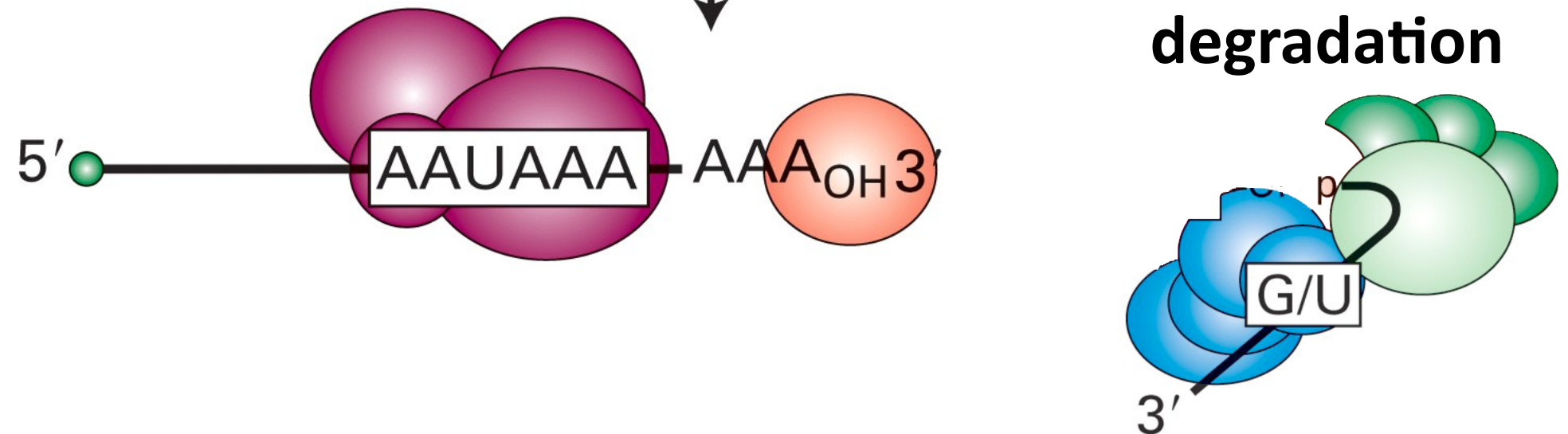
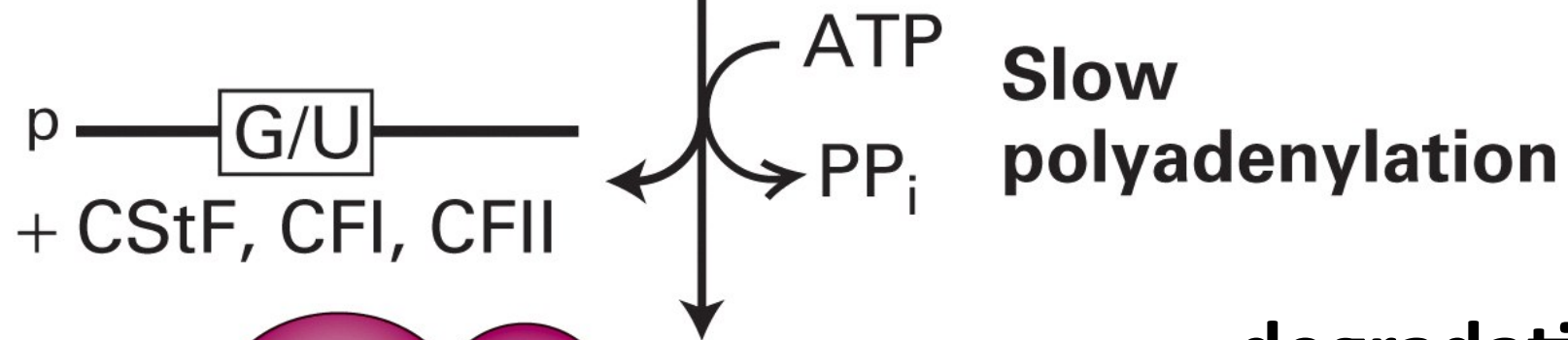
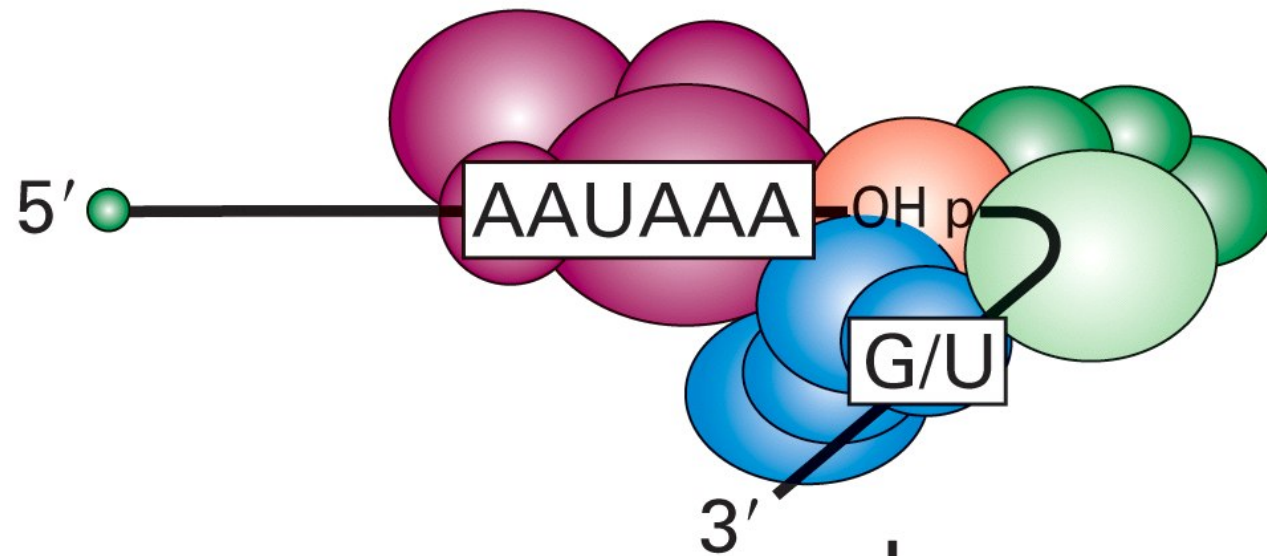


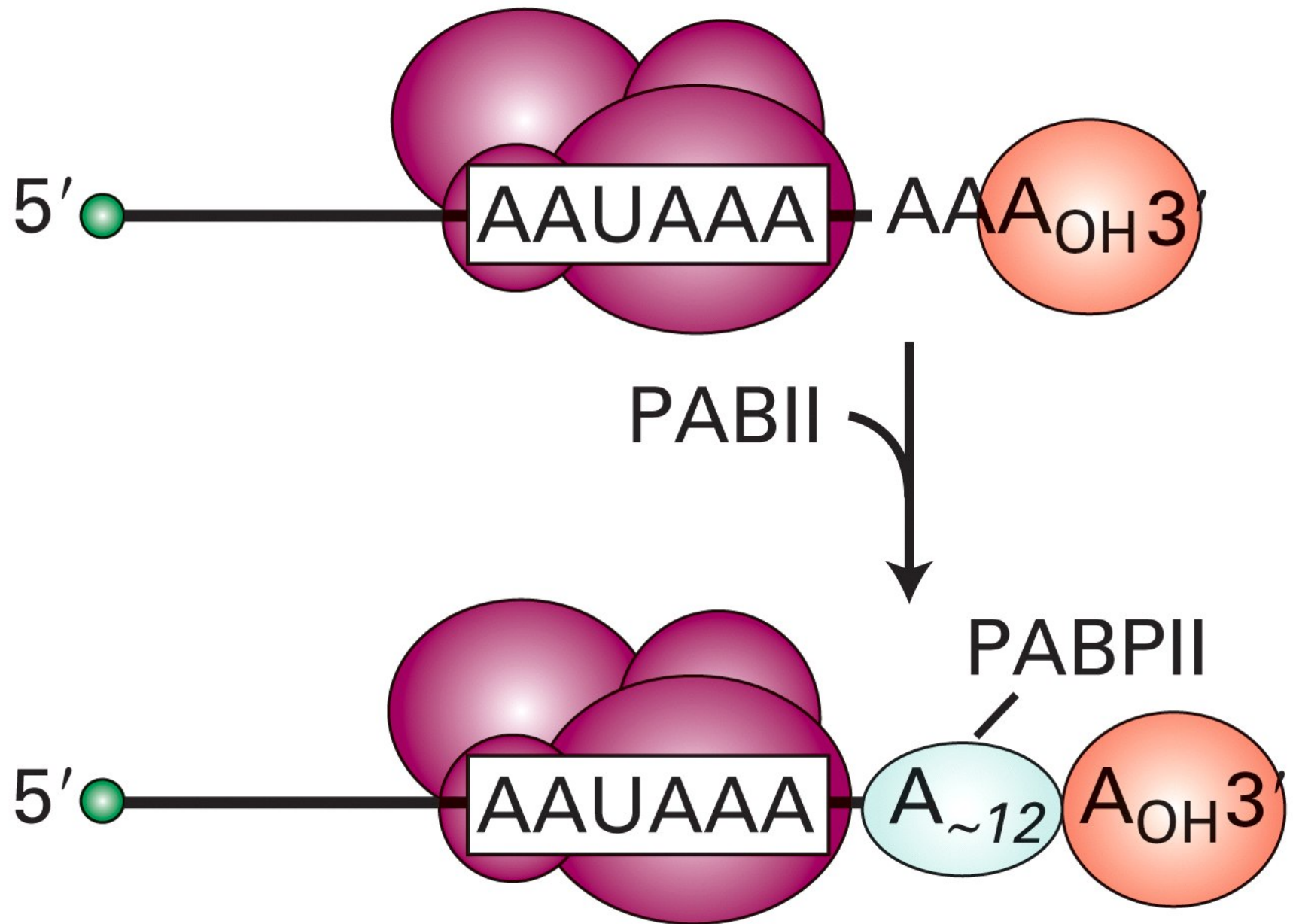
3'-End Formation: RNA Processing

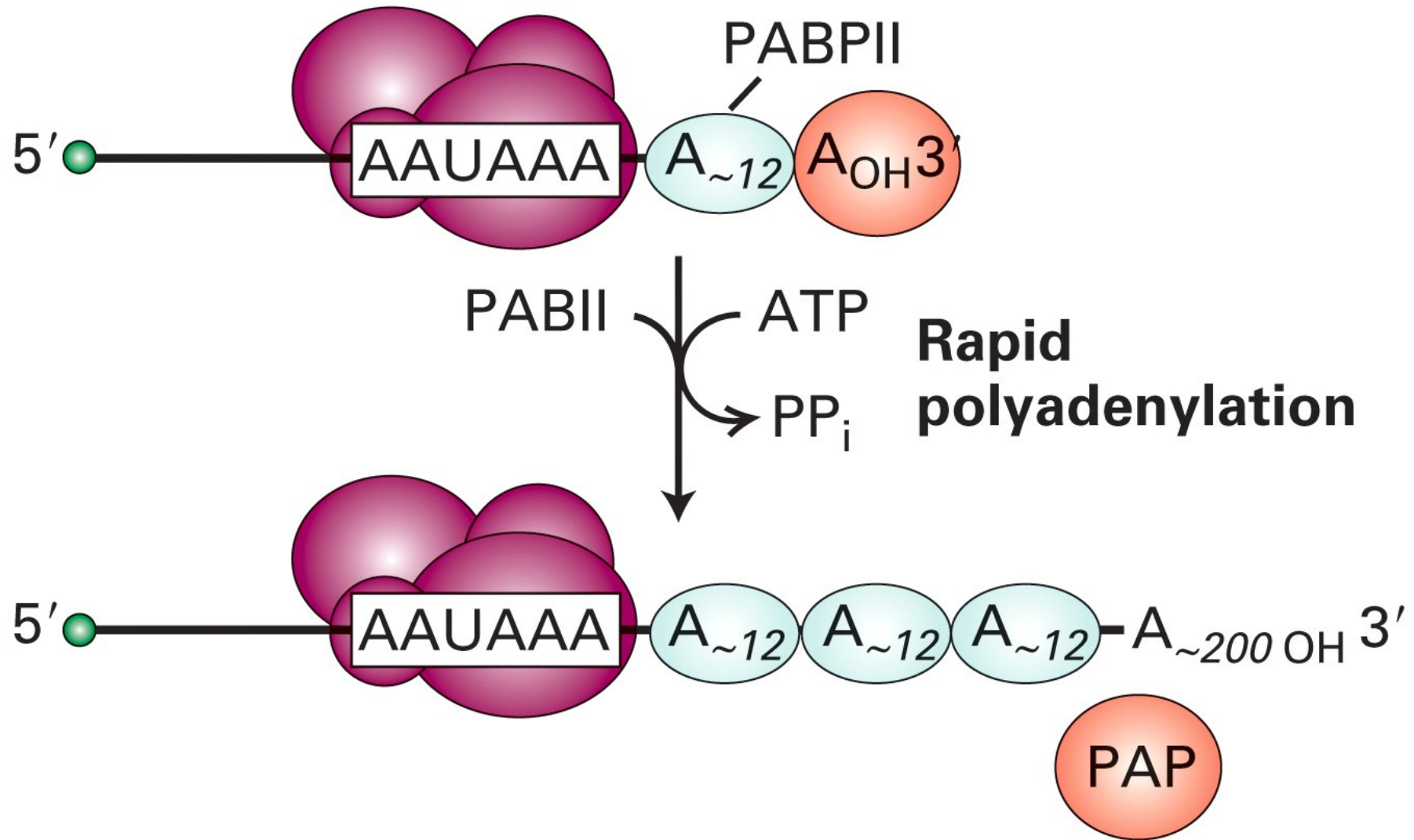




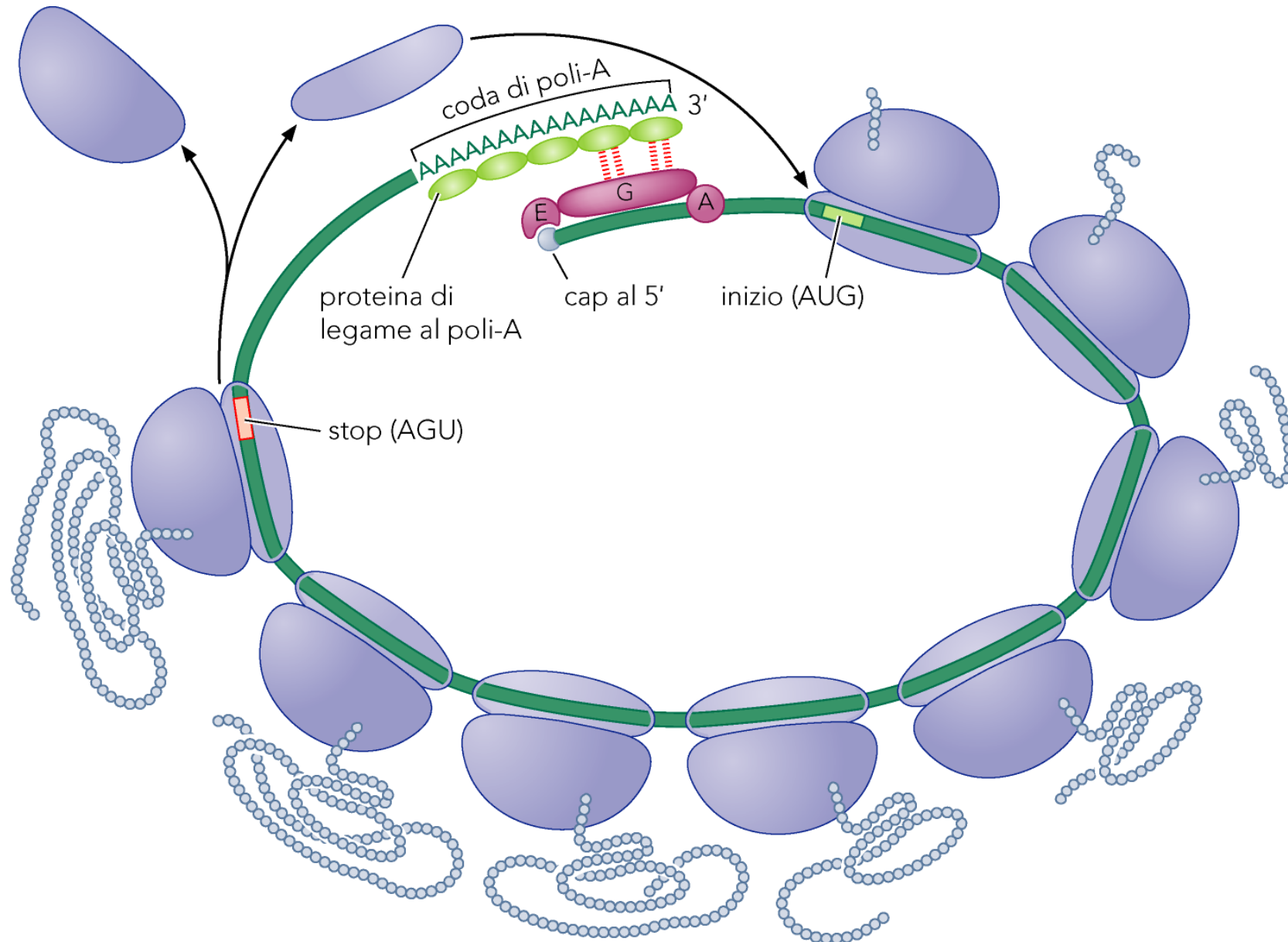






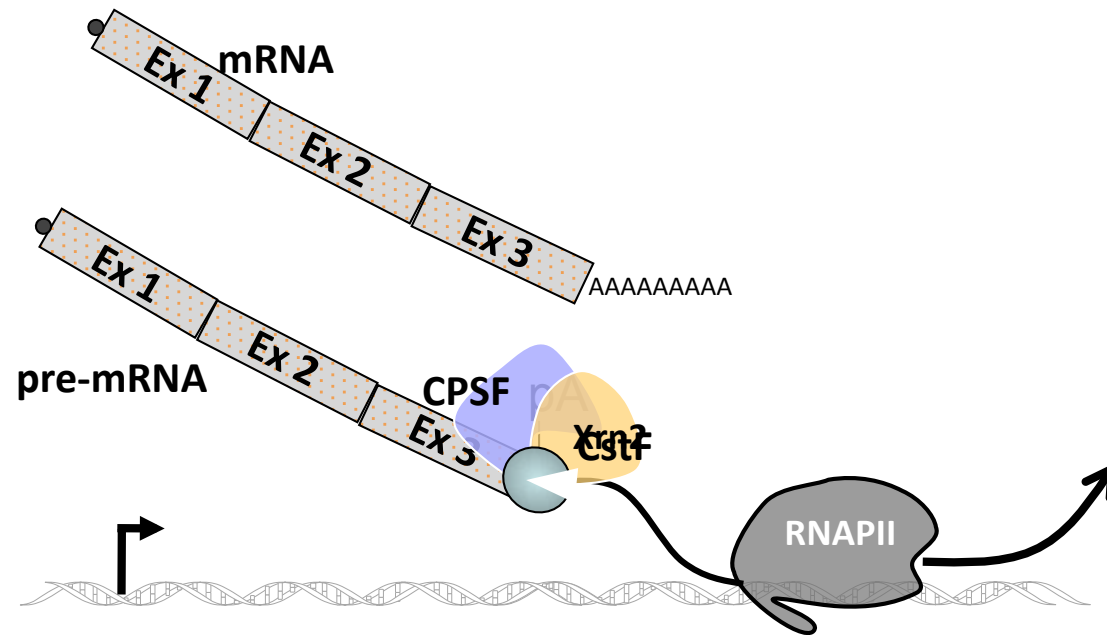


Inizio della Traduzione

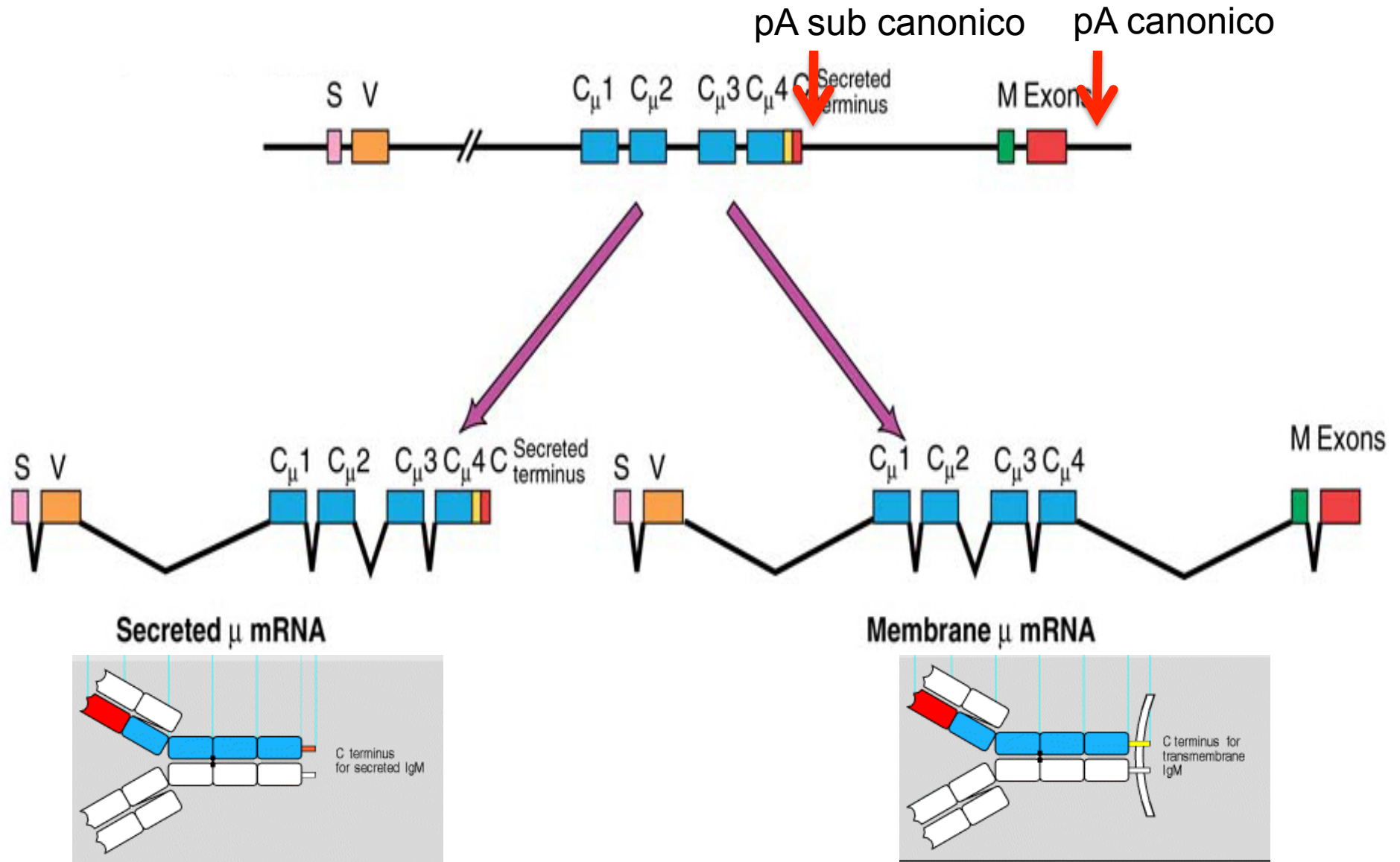


Pol II genes transcription termination

Torpedo Model

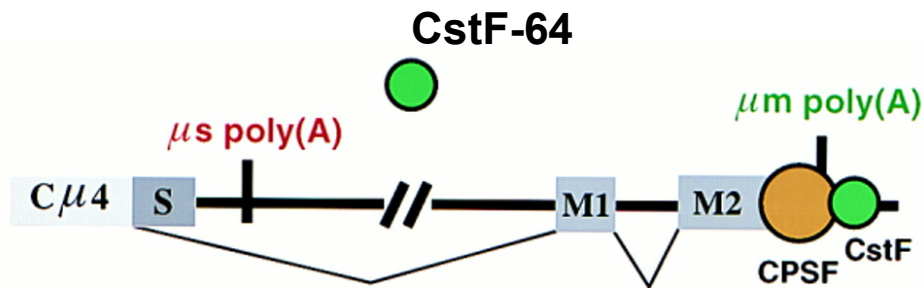


Alternative polyadenylation of the immunoglobulin μ heavy chain gene



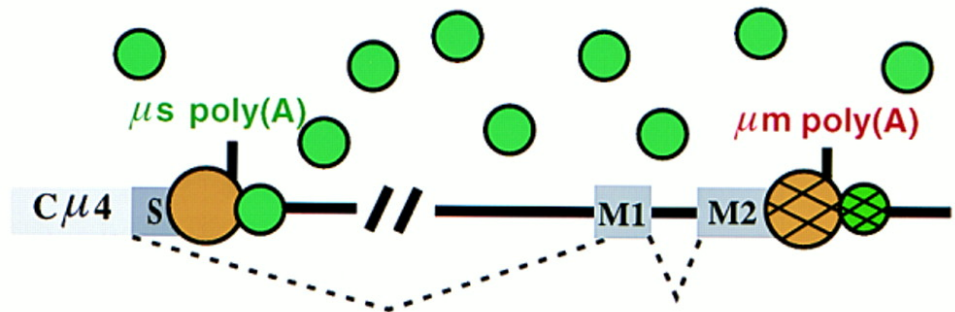
Le forma transmembrana e quella secreta delle immunoglobuline derivano dallo stesso mRNA grazie ad un evento di poliadenilazione alternativa.

B cells ($\mu m \geq \mu s$ mRNA)



CstF limiting - Strongest site wins (μm)

Plasma cells ($\mu s \gg \mu m$ mRNA)



CstF not limiting - First come, first served (μs)

I livelli di CstF-64 controllano il processamento alternativo di μ mRNA. In cellule B non attivate la concentrazione limitante di CstF permette il riconoscimento del segnale di poliadenilazione a valle che è quello più forte. L'immunoglobulina prodotta conterrà quindi la porzione di legame alla membrana. Successivamente all'attivazione delle cellule B i livelli di CstF vengono incrementati e questo consente l'uso del sito di poliadenilazione più debole che diventerà anche quello preferenzialmente utilizzato perchè sarà il primo ad essere trascritto.

The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation.

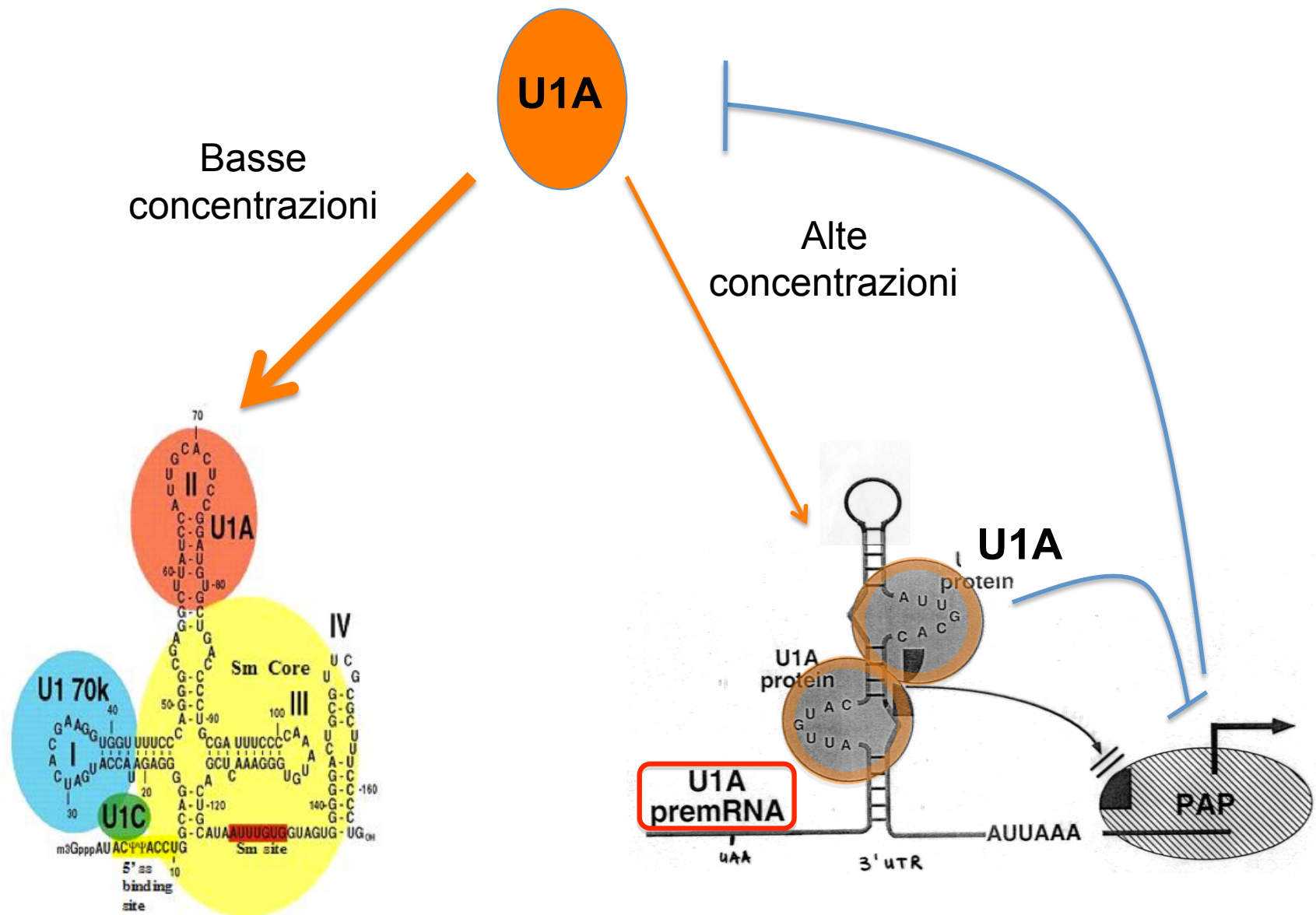
Takagaki Y, Seipelt RL, Peterson ML, Manley JL.

Cell 1996 Nov 29;87(5):941-52

**L'espressione di un gene può essere controllata interferendo
con la reazione di poliadenilazione**

La regolazione del gene che codifica per la proteina U1A

- ✱ **La proteina U1A e' presente nell'U1 snRNP, particella ribonucleoproteica coinvolta nel processo di splicing**
- ✱ **E' in grado di legare una sequenza sul proprio pre-mRNA, a monte del sito di taglio e poliadenilazione, contenente due motivi di sequenza simili a quello a cui si lega sull'U1 RNA.**
- ✱ **Quando il livello della proteina U1A supera i livelli cellulari dell'U1 snRNA l'accumulo della proteina viene bloccata!**
- ✱ **Esempio di regolazione on/off della reazione di taglio e poliadeniazione**



Il sequenziamento del gene codificante U1A ha rivelato la presenza al 3', vicino al sito di poliadenilazione (AUUAAA), di 2 sequenze simili a quella del sito di legame sull' U1 snRNA. Il controllo su U1A è di tipo a feed-back ed ha come target la corretta formazione del 3' del suo messaggero. Man mano che la quantità di U1A nel nucleo aumenta, questa si va a legare al 3' del proprio mRNA impedendo la poliadenilazione e di conseguenza destabilizzando il trascritto che viene degradato.