

## PROCESSAMENTO E MATURAZIONE DELL'mRNA

### Processo di maturazione dell'mRNA

Questi processi di maturazione non sono fondamentali soltanto per creare un RNA che sia funzionale, ma costituiscono un ulteriore livello di regolazione dell'espressione genica.

Negli eucarioti, più precisamente nel nucleo, avviene il processo di trascrizione dell'RNA; invece nel citoplasma, in particolare nei ribosomi avviene il processo di traduzione.

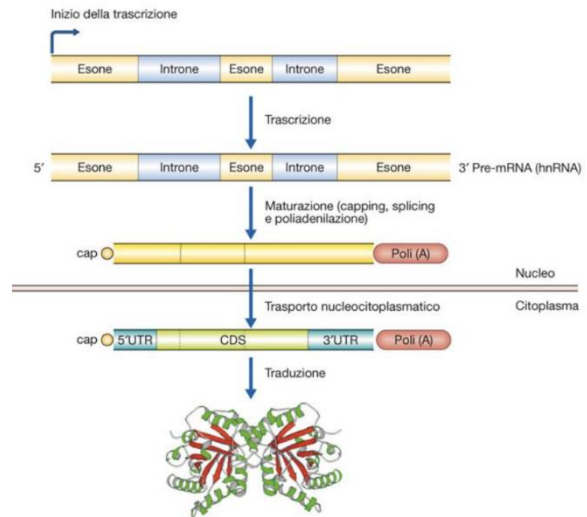
La molecola di RNA messaggero una volta trascritta prende il nome di **trascritto primario** o **trascritto precursore** perché in realtà non è un RNA funzionale ma un suo precursore che potrà esercitare la funzione, quindi si trasformerà in RNA funzionale solo dopo aver subito dei processi di maturazione (che includono dei tagli, delle modificazioni chimiche, capping, splicing, poliadenilazione e editing). Questi processi avvengono nel nucleo e poi l'RNA maturo verrà trasportato dal nucleo al citoplasma attraverso un sistema di trasporto attivo.

Abbiamo altri due tipi di RNA: **RNA ribosomiale** e **RNA transfer**. Anche nei batteri, come negli eucarioti, questi trascritti vengono sottoposti a una serie di processi.

I ribosomi sono la sede di sintesi proteica. Denominati secondo la loro velocità di sedimentazione: 70S batterici; 80S eucariotici. I ribosomi si dividono in subunità ribosomiale più grande e più piccola.

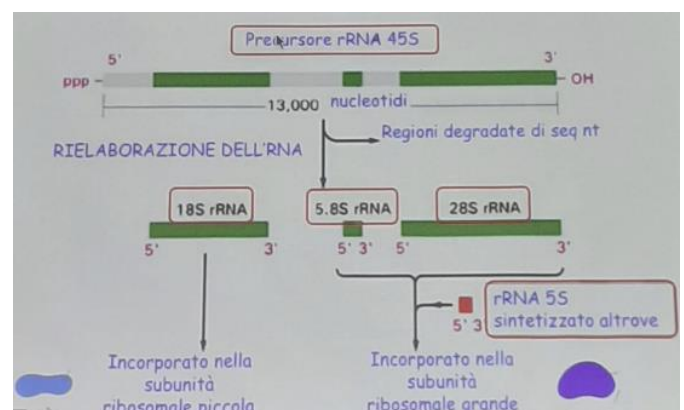
Negli eucarioti la subunità ribosomiale più grande è costituita da RNA ribosomiale 28S, 5.8S, 5S associati a delle proteine; invece quella più piccola è costituita da RNA ribosomiale 18S anch'esso associato a delle proteine.

Il **nucleolo** è il sito di trascrizione e di processamento dell'rRNA e di assemblaggio dei ribosomi, che all'interno della cellula sono necessari in grande quantità. Il nucleolo è una struttura priva di membrane, costituito da proteine e acidi nucleici. I cromosomi si dispongono in maniera tale da fornire nella regione del nucleolo le anse di DNA che producono rRNA. Il nucleolo è organizzato intorno alle regioni cromosomiche che contengono i geni degli rRNA 5.8S, 18S, 28S. Per soddisfare le necessità di trascrivere grandi quantità di molecole di rRNA, ci sono copie multiple di questi geni (uomo: 200 copie).



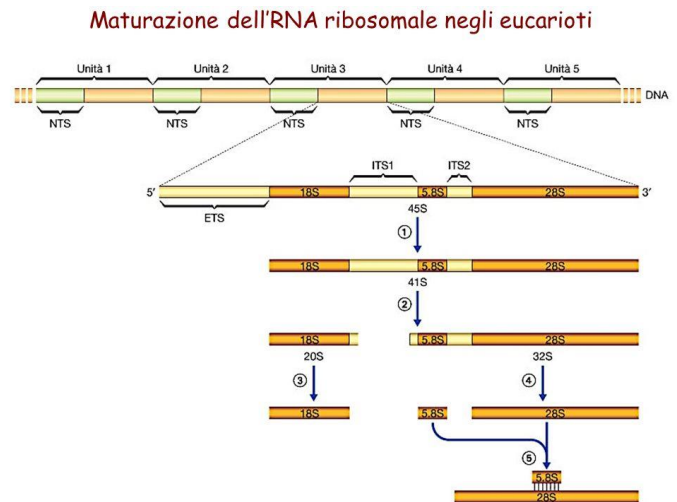
### Trascrizione degli RNA ribosomiali:

Gli RNA ribosomiali 5.8S, 18S, e 28S sono trascritti come una singola unità dentro il nucleolo dalla RNA Pol I, producendo un RNA precursore 45S che poi viene processato per dare i tre RNA ribosomiali. Questo processo è detto processamento. Abbiamo la formazione di 18S che poi verrà incorporato nella subunità ribosomiale piccola; invece 5.8S e 28S verranno incorporati nella subunità ribosomiale grande, cui si aggiungerà RNA ribosomiale 5S sintetizzato altrove.



## Processamento degli RNA ribosomiali (rRNA):

I pre-RNA eucariotici sono processati in parecchi passaggi. Il taglio iniziale del pre-RNA produce precursori separati che poi vengono tagliati ulteriormente per dare prodotti finali. Quindi il gene trascritto è costituito da porzioni codificanti e da porzioni NTS cioè non trascritte interposte fra le regioni codificanti. Quindi abbiamo un precursore che deve essere tagliato ad opera di enzimi nucleasi, in particolare endonucleasi. Si ha inizialmente un precursore 45S, e con la rimozione dell'estremità 5' ETS si ha la formazione dell'RNA 41S. Successivamente quest'ultimo viene tagliato e si formeranno l'RNA 20S e l'RNA 32S. Infine da questi due precursori si avrà la formazione di 18S, 5.8S e 28S. Infine la subunità 5.8 si legherà alla subunità 28S.



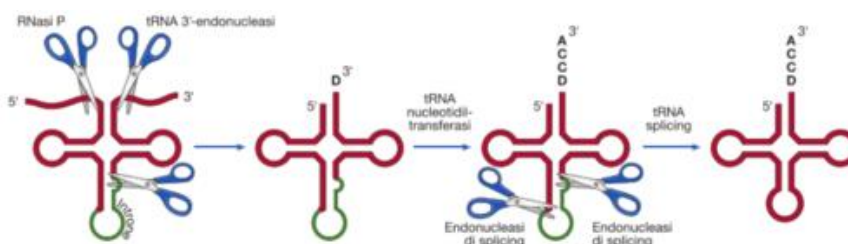
## Processamento degli RNA transfer:

- Anche questi sono organizzati in cluster.
- In ciascuno di essi ogni gene è separato dai geni vicini da spaziatori intergenici.
- Il pre-RNA va incontro ai seguenti eventi maturativi:

Nella prima fase abbiamo un taglio endonucleasico all'estremità 5' e all'estremità 3'; poi abbiamo l'enzima tRNA nucleotidiltransferasi che aggiunge un trinucleotide all'estremità 3'. Se il tRNA contiene anche degli introni questi ultimi vengono rimossi dalle endonucleasi.

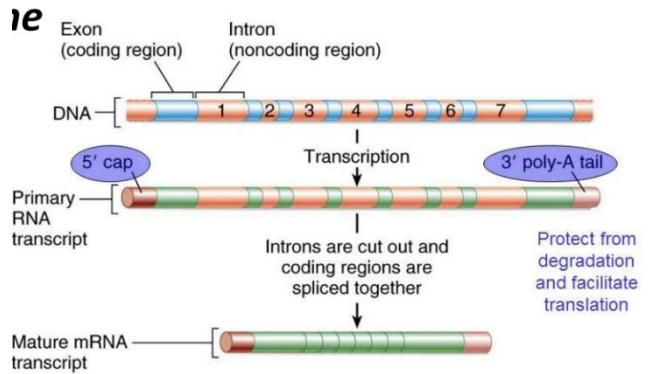
Poi abbiamo modifiche delle basi, perché nella struttura RNA transfer troviamo basi modificate: il ribosio di alcuni nucleotidi viene metilato nella posizione 2.

Inoltre alcune uridine vengono modificate in pseudouridine in cui il ribosio è legato alla posizione 5 dell'uracile anziché alla posizione 1.



## Maturazione dell'RNA messaggero:

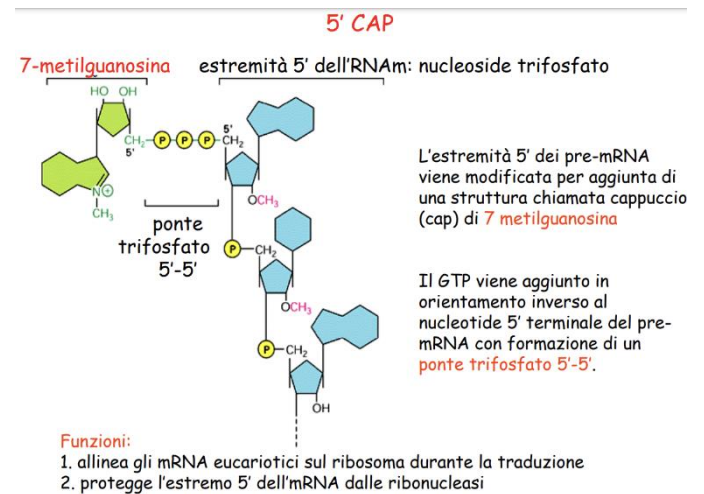
1. Capping
2. Poliadenilazione
3. Splicing
4. Editing



### 1. CAPPING

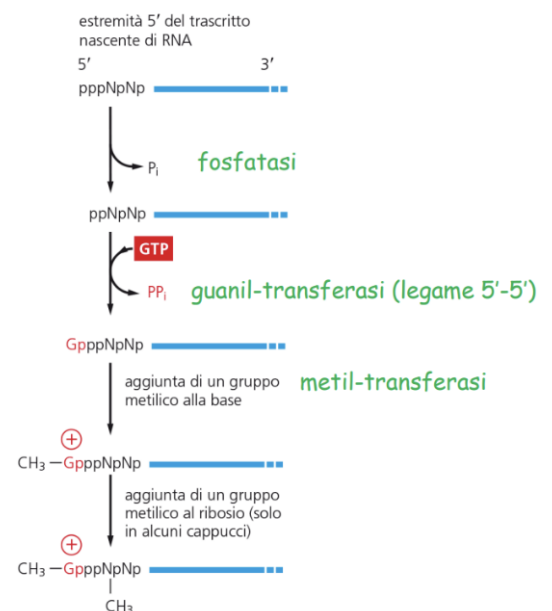
mRNA Capping consiste nell'aggiunta di uno specifico nucleotide modificato, chiamato cappuccio (cap), all'estremità 5' del pre-mRNA. La 7-metilguanosina viene legata al nucleotide con legame 5'-5' trifosfato. Il cap svolge 4 principali funzioni:

1. Protegge l'mRNA dalla degradazione delle nucleasi
2. Aumenta l'efficienza della traduzione
3. Facilita il trasporto dell'mRNA dal nucleo al citoplasma
4. Contribuisce ad aumentare l'efficienza del processo di splicing

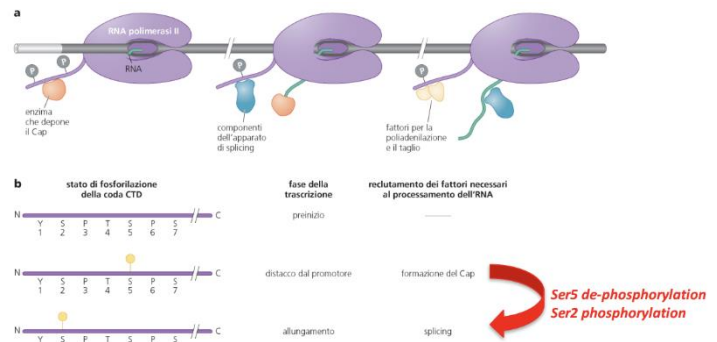


### Formazione del capping:

1. L'enzima RNA fosfatasi rimuove il fosfato dall'estremità 5' dell'mRNA;
2. Poi abbiamo l'enzima guanil-transferasi che aggiunge il GPM, usando come substrato il GTP e liberando pirofosfato, per formare il legame trifosfato 5'-5';
3. Poi vi l'enzima metil-transferasi che aggiunge un gruppo metilico sulla guanina in posizione 7, utilizzando come substrato una molecola di SAM;
4. Infine potrebbero esserci delle ulteriori metilazioni possono dare luogo a forme varianti del cap.

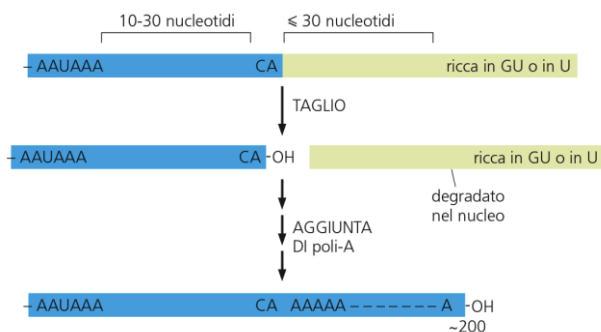
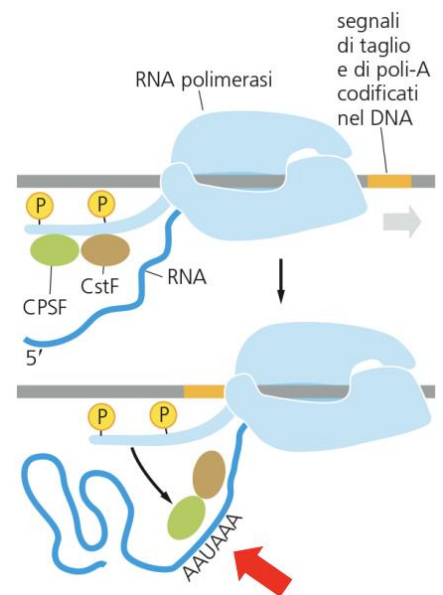


La metilazione avviene nelle prime fasi della trascrizione; quindi possiamo dire che la fase di allungamento del trascritto è strettamente accoppiata alla maturazione dell'RNA. Il capping viene effettuato nelle prime fasi della trascrizione. La CTD della polimerasi II, nel momento in cui è fosforilata recluta gli enzimi per il capping, per lo splicing, per la poliadenilazione e per il taglio.



## 2. POLIADENILAZIONE

Essa è una modificazione dell'estremità 3' dell'mRNA, che consiste nell'aggiunta di una coda di poli(A) all'estremità 3'. Anche in questo caso è il CTD della polimerasi II che recluta gli enzimi necessari affinché avvenga la poliadenilazione. Gli enzimi sono CPSF e CstF. Quando l'RNA polimerasi raggiunge la fine di un gene e trascrive una sequenza specifica (**AAUAAA**) detta segnale di poliadenilazione o poli-A signal, si innescano meccanismi che portano alla terminazione del processo di trascrizione, al taglio del pre-mRNA e all'aggiunta di una coda di poli(A) all'estremità 3'.



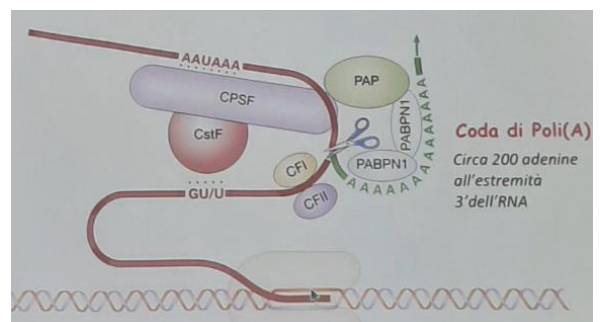
A 20-30 nt a valle del sito di Poli-(A) signal, è presente una **sequenza ricca di GU** che aumenta sensibilmente l'efficienza della poliadenilazione.

La CTD fosforilata recluta gli enzimi per il capping, per lo splicing, per la poliadenilazione e il taglio. Il capping viene effettuato subito dopo la sua sintesi.

**CPSF**: fattore di specificità del taglio e della poliadenilazione; **CstF**: fattore di stimolazione del taglio F

A questo punto intervengono i fattori CRI e CFII che operano il taglio endonucleolitico. Infine, la poli(A) polimerasi (PAP) aggiunge la coda di poli(A) cui si lega una proteina specifica (PABPN1).

La funzione della coda di poli(A) è simile a quella del cappuccio, protegge l'RNA messaggero dalla degradazione delle endonucleasi, aumenta l'efficienza della traduzione, facilita il trasporto del RNA messaggero dal nucleo al citoplasma, contribuisce ad aumentare l'efficienza nel processo di splicing.



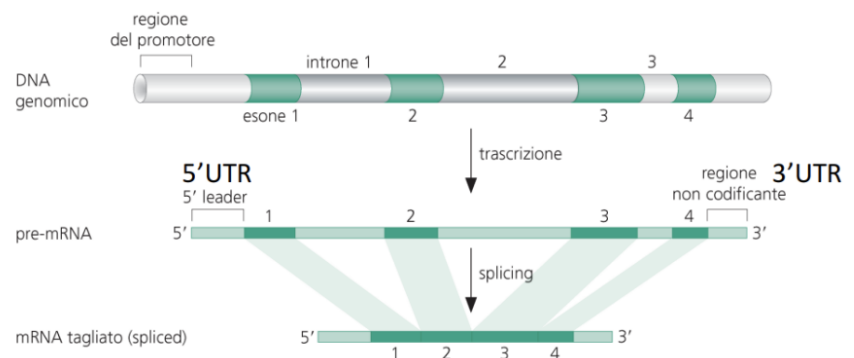
### 3. SPLICING

Il processo di splicing significa 'unire' (quindi congiungere, attaccare).

I geni eucarioti contengono porzioni codificanti (**esoni**) che sono quelle raffigurate in verde e porzioni non codificanti (**introni**) che sono raffigurate in grigio. Quindi la sequenza di un gene che contiene tratti di DNA di sequenza che non compaiono nel trascritto sono chiamati introni, invece tratti (sequenze) che poi verranno unite a formare il trascritto maturo si chiamano esoni.

Sharp e Roberts sono stati i primi a dimostrare che i **geni eucariotici sono discontinui per la presenza degli introni**, scoperta per la quale hanno ricevuto il premio Nobel per la Medicina nel 1993.

- Geni possono avere da 0 a fino a oltre 300 introni;
- In genere gli esoni sono più corti, gli introni molto più lunghi (~800 kb);
- Non sono presenti solo negli mRNA, talvolta anche nei rRNA e nei tRNA;
- Il numero degli introni cresce con la complessità dell'organismo.



In generale quindi lo **splicing** è il **processo attraverso il quale gli introni vengono rimossi in modo preciso del trascritto primario per creare l'mRNA maturo**.

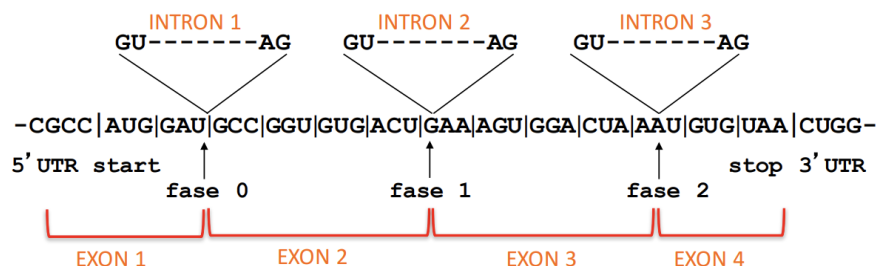
1. Gli esoni e gli introni della regione codificante vengono trascritti;
2. Gli introni sono rimossi;
3. Gli esoni congiunti dallo splicing sono pronti per essere tradotti dopo la maturazione.

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**, circa il 50% dei casi), o situarsi all'interno di un codone, separando il primo nucleotide dagli altri due (**fase 1**, circa il 30%) o i primi due dal terzo (**fase 2**, circa 20%). 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.

Questo processo di taglio e di rimozione deve essere molto preciso perché lo spostamento di un sito di taglio, anche di un solo nucleotide, comporterebbe lo scivolamento della fase di lettura con la conseguente sintesi di una proteina totalmente differente.





Adesso bisogna capire:

1. Come vengono distinti gli esoni dagli introni?
2. Come vengono uniti gli esoni in modo preciso?
3. In che ordine vengono uniti gli esoni?

Il corretto riconoscimento dei siti di splicing nel precursore mRNA è determinato da brevi segnali di riconoscimento.

Quali sono questi siti di riconoscimento?

Quasi tutti gli introni trascritti da RNA polimerasi di tipo 2 iniziano tutti con il dinucleotide GU e terminano con il dinucleotide AG. Questi vengono chiamati anche sito di splicing 5' (o sito donatore al 5') e sito di splicing 3' (o sito accettore al 3').

Al centro dell'introne è presente un'adenina e questo sito viene chiamato punto di ramificazione e si trova in prossimità del Py tract (che è un tratto di pirimidine).

Questi segnali permettono il riconoscimento degli introni e quindi la successiva rimozione.

Quindi all'interno dell'introne abbiamo:

- Sito di splicing 5' o Sito donatore al 5'
- Sito di splicing 3' o Sito accettore al 3'
- Punto di ramificazione (branch point site)

Alla fine avremo l'RNA maturo che avrà la sequenza AGG (quindi abbiamo visto come avviene il riconoscimento).

Adesso si vedrà nel dettaglio come avviene il taglio:

Il processo di splicing nucleare consiste in due reazioni di transesterificazioni (due reazioni nucleofile).

Nella prima reazione abbiamo un attacco nucleofilo: l'ossidrilico al 2' (2'OH) di una specifica adenosina dell'introne agisce come nucleofilo, attaccando l'estremità 5' dell'esone per formare un'ansa.

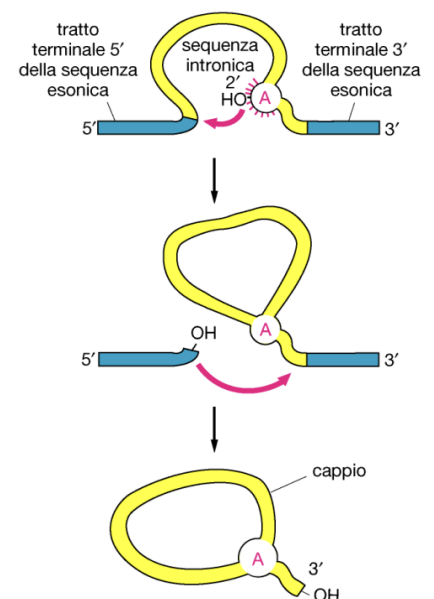
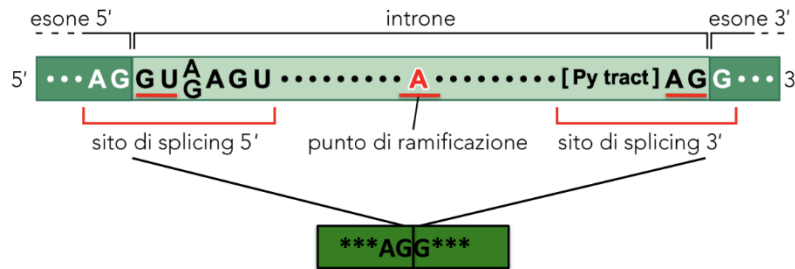
Dopodiché abbiamo una seconda reazione, quindi un secondo attacco nucleofilo da parte dell'OH verso il sito di splicing 3'. Quindi si ha la legatura degli introni a formare una struttura che viene chiamata a forma di cappio. L'introne di libera in questa struttura a forma di cappio (che poi successivamente viene degradata all'interno del nucleo) e si legano i due frammenti di esoni

L'adenina quindi è implicata in tre legami fosfodiesterici e viene chiamata sito o punto di ramificazione proprio perché avviene una ramificazione a tre.

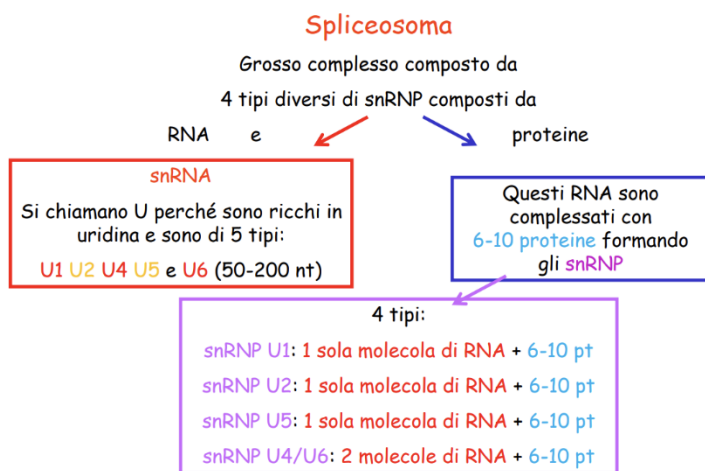
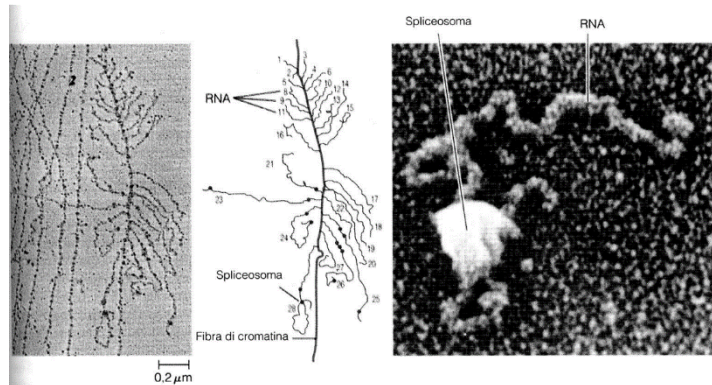
Dicendolo in un'altra forma:

In blu abbiamo gli esoni e in giallo abbiamo gli introni.

1. Attacco nucleofilo da parte del 2'OH dell'A presente nel sito di ramificazione con l'estremità 5'. Il pre-mRNA è tagliato al sito di splicing 5'. L'introne forma un'ansa.
2. Attacco nucleofilo da parte dell'OH al sito di splicing in posizione 3'. Taglio al sito di splicing 3'. Si ha la legatura dei due esoni. L'introne è liberato sotto forma di una struttura di cappio, che viene poi linearizzata dal nucleo delle cellule.



Tutto il meccanismo di splicing avviene ad opera di un macchinario molecolare che prende il nome di **SPLICEOSOMA**. Il processo di splicing in realtà richiede l'intervento di una vera e propria macchina molecolare, un grande complesso molecolare costituito da oltre **200 proteine** e **5 RNA**. Lo spliceosoma è la macchina molecolare più complessa nelle cellule eucariotiche.



Gli RNA non sono RNA normali ma sono snRNA, ovvero small nuclear RNA (piccoli RNA nucleari) di circa 200 nucleotidi ricchi di uridina (ecco perché si chiamano U) e sono di 5 tipi: U1, U2, U4, U5 e U6 (in base all'ordine di scoperta).

U3 era stato identificato ma si è capito che non era implicato in questo processo nucleare ma era implicato in quello mitocondriale.

Gli snRNA sono associati alle proteine e formano gli snRNP (si legge "snurp") (ribonucleoproteine).

Ricapitolando: lo spliceosoma è una macchina molecolare costituito da RNA e proteine. Gli RNA

sono gli snRNA (U1, U2, U4, U5, U6) che, complessati con le proteine, formano gli snRNP. snRNP U1, U2, U5 sono formati da 1 sola molecola di RNA + 6-10 pt, invece snRNP U4 e U6 da 2 molecole di RNA + 6-10 pt.

## Meccanismo di azione dello spliceosoma

Abbiamo il meccanismo di taglio e legazione ma adesso bisogna vedere come avviene il riconoscimento.

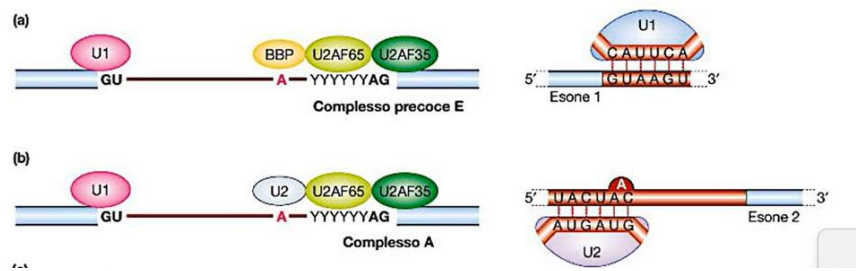
**a)** Abbiamo **U1** (che sta per snRNP U1) e ricordiamo che la parte in azzurro rappresentano gli esoni e la riga nera gli introni. Negli introni abbiamo il sito GU, il sito AG e al centro il sito di ramificazione.

La snRNP U1 si va a legare e riconosce il sito di splicing 5' perché il riconoscimento si basa su una complementarità di basi poichè l'RNA che compone la snRNP U1 ha una sequenza complementare al sito di splicing 5'.

L'RNA contenuto nella snRNP U1 va a legarsi a questo sito. Il **BBP** (proteina che si lega al punto di ramificazione) va a legarsi alla A (al punto di ramificazione), invece i fattori ausiliari di U2 (**U2AF**) si vanno a legare al sito di splicing al 3'. Quindi si assembla questo complesso e si forma il **Complesso Early** (o precoce). Questa è la fase di 'assemblaggio'.

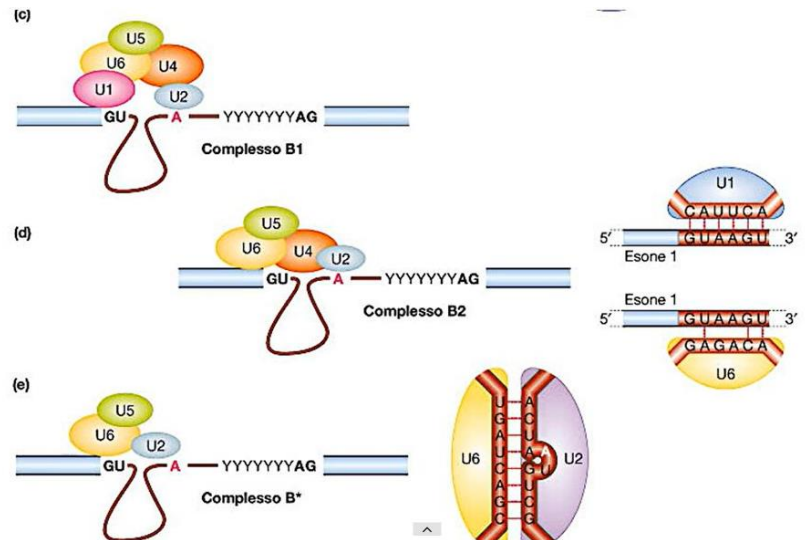
**b)** A questo punto entra in gioco la **snRNP U2** che elimina la BBP sfruttando l'interazione complementare con il sito di ramificazione.

Questo appaiamento di basi però, non coinvolge l'Adenina che rimane libera. Quindi BBP è complementare al sito di ramificazione ma lascia fuori l'Adenina proprio perché essa deve rimanere libera per l'attacco nucleofilo (prima reazione di transesterificazione). Questo si chiama **pre-spliceosoma (o Complesso A)**.



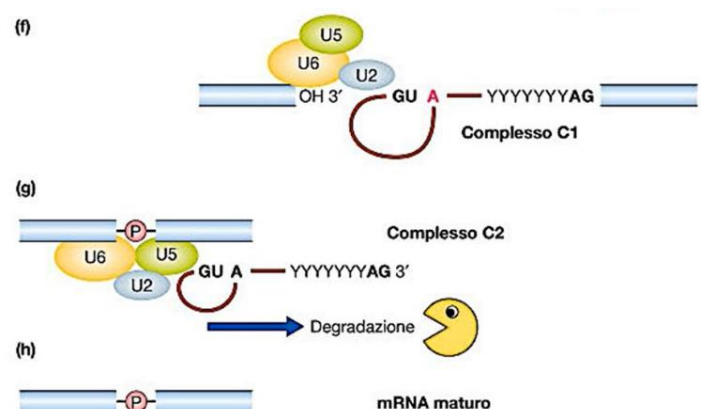
c) Nella successiva fase escono dal complesso i fattori U2AF ed entra un complesso terziario costituito da snRNP U4, U5 e U6 che si legano per mezzo di varie interazioni proteine-proteine e si forma un ponte tra la snRNP U1 e la U2 che si avvicinano ai siti di splicing 5' e 3' e si forma un'ansa con la formazione del **Complesso B1 (o spliceosoma inattivo)**.

d) La snRNP U1 se ne va e viene rimpiazzata dalla U6 (sempre per complementarità di basi) e si forma il **Complesso B2**.



e) A questo punto se ne va anche la snRNP U4 e si ha l'interazione tra U6 e U2 (che adesso possono avvicinarsi ancora di più) e si forma lo **Spliceosoma attivo (o complesso B\*)** (viene chiamato attivo perché avviene la catalisi quindi la prima reazione di transesterificazione [cioè il primo esone viene staccato, avviene un taglio al 5' e si forma una specie di ansa] che porta alla formazione del **Complesso C1**).

f) A questo punto si ha la seconda reazione di transesterificazione che porta all'unione dei due esoni e al rilascio dell'introne sotto forma di struttura a cappio (con la A che si univa a 3). Quindi l'OH si va a legare al sito 3 che va a tagliare il sito di splicing al 3'. Si forma il legame fosfodiesterico che di conseguenza stacca l'introne.



g) Quest'ultima viene successivamente linearizzata e degradata con la formazione del **Complesso C2**.

h) A questo punto l'**RNA messaggero maturo** viene rilasciato dallo spliceosoma e le snRNP vengono riciclate per lo splicing di un altro introne e il ciclo ricomincia.



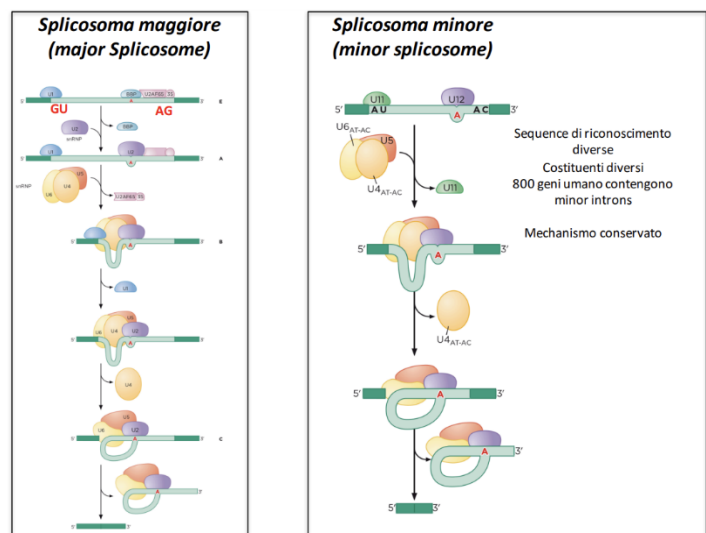
Gli spliceosomi, quindi, sono tra i macchinari più complessi di qualsiasi cellula eucariotica. Inoltre gli spliceosomi sono a **turnover singolo** cioè ogni macchinario può rimuovere solo un introne da un singolo trascritto (Si pensi a quanti introni ci sono in una molecola di mRNA).

Di conseguenza ogni volta che viene rimosso un introne da un trascritto abbiamo un ciclo continuo che include un assemblaggio, un'attivazione, la catalisi, la liberazione del prodotto, il riciclo delle snRNP e di nuovo ricomincia il ciclo per tutti gli introni dei geni (ecco perché è una macchina complessa).

Terminato lo splicing, lo spliceosoma indirizza una serie di proteine, chiamate **complesso di giunzione degli esoni (EJC)**, a legarsi all'mRNA vicino alla posizione occupata dall'introne. Queste proteine sono implicate nel controllo qualità dell'mRNA cioè sono in grado di riconoscere e indirizzare l'mRNA alla degradazione se ad esempio non è funzionale, se è stato sbagliato o ancora è avvenuto uno splicing incompleto non corretto. Svolgono un ruolo nell'accuratezza dello splicing, facilitano il trasporto dal nucleo al citoplasma, e aumentano l'efficienza della traduzione.

Quello che abbiamo appena visto è lo **spliceosoma maggiore** ovvero lo spliceosoma nucleare che è deputato alla maggior parte dei geni nucleari.

Circa l'1% degli introni viene modificato secondo un altro tipo di **spliceosoma** che viene detto **minore**. Questo elimina meno introni, abbiamo diversi tipi di snRNP ed è in grado di riconoscere non solo i siti che noi chiamiamo "canonici" ma anche altri siti.



### AUTOSPLICING: introni di tipo I e di tipo II

Si è scoperto inoltre che esistono degli enzimi capaci del cosiddetto **autosplicing**. Essi sono introni capaci di svolgere l'attività catalitica (quindi il taglio) senza l'intervento di proteine e vengono chiamati 'ribozimi'.

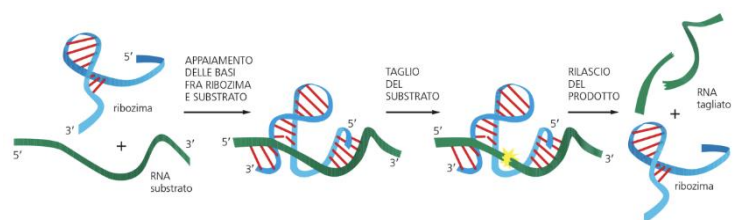
Essi vengono distinti in introni di tipo I e introni di tipo II e catalizzano la reazione di splicing.

Gli introni di tipo II hanno un meccanismo simile a quello visto precedentemente cioè la reazione di transesterificazione con l'Adenina al centro. Questi introni sono rari e in genere sono presenti negli introni mitocondriali, nei batteri, in altri organelli.

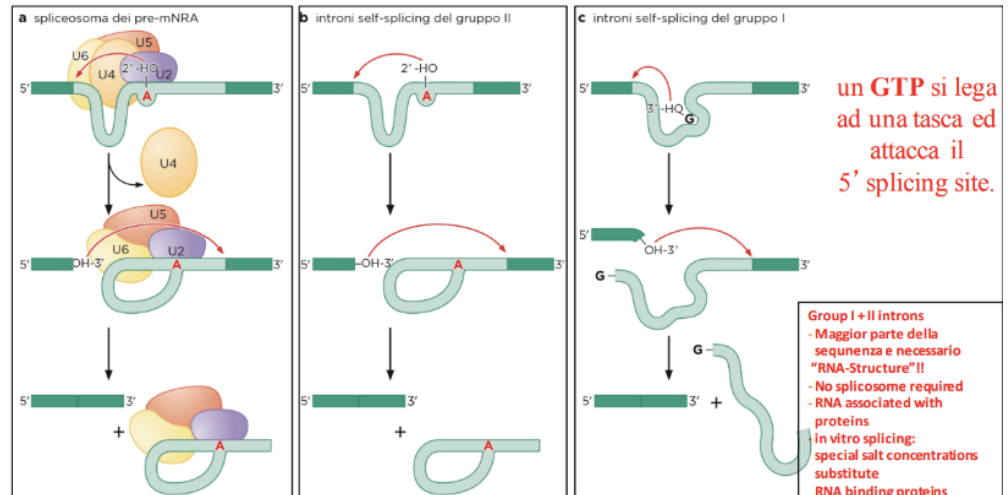
Gli introni di tipo I invece di avere un'Adenina hanno una Guanosina esterna e abbiamo sempre questo meccanismo di autosplicing.

Ricapitolando:

- Per gli introni nucleari (splicing nucleare) abbiamo lo spliceosoma e il meccanismo è quello di due transesterificazioni all'adenina (questo meccanismo è comune nei geni nucleari);



- I geni di organelli (mitocondri, cloroplasti, ecc...) hanno introni che effettuano autosplicing e ne esistono di due tipi;
- Poi ci sono altri introni di tipo 4 che sono peculiari di alcuni tRNA per esempio quelli dei lieviti.



## PRINCIPALI VARIANTI DI SPLICING

- La prima è quella già vista che può essere chiamata '**splicing in cis**' perché gli introni vengono eliminati da un gene e vengono attaccati gli esoni a partire da una stessa molecola.
- Sono possibili anche delle reazioni di '**trans splicing**' che avvengono in genere nei nematodi (*C. elegans*). Questo consiste nel trasferimento di un RNA chiamato RNA splicing leader o donatore che proviene da un RNA donatore che viene inserito nel gene di un altro trascritto di RNA messaggero. Quindi in questo caso l'esone viene preso da un'altra molecola di mRNA.
- Poi abbiamo lo '**splicing alternativo**'.

