

3. SPLICING ALTERNATIVO

Il numero dei nostri geni va da 20-25 mila però le proteine che vengono sintetizzate sono più di 100 mila.

Questo paradosso viene spiegato con lo splicing alternativo.

Lo splicing alternativo è il meccanismo attraverso il quale uno stesso pre-mRNA può subire eventi di splicing differenti (diversi meccanismi) che portano alla creazione di diversi mRNA alternativi, che a loro volta possono codificare differenti proteine.

Attraverso il processo di splicing alternativo uno stesso gene, quindi un pre-mRNA può generare diversi mRNA che danno origine a differenti proteine.

È stato visto che oltre il 90% dei geni umani è interessato da splicing alternativo.

Come si può arrivare quindi a differenti proteine?

Attraverso l'utilizzo di siti alternativi come ad esempio: promotori alternativi (siti alternativi di inizio della trascrizione), siti di terminazione della trascrizione, oppure possiamo avere il salto di un esone, un esone che viene escluso, si possono combinare gli esoni in maniera diversa. Quindi si possono formare tantissimi mRNA e di conseguenza tantissime proteine.

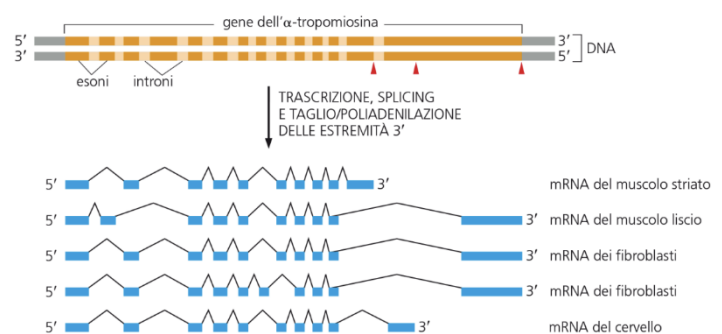
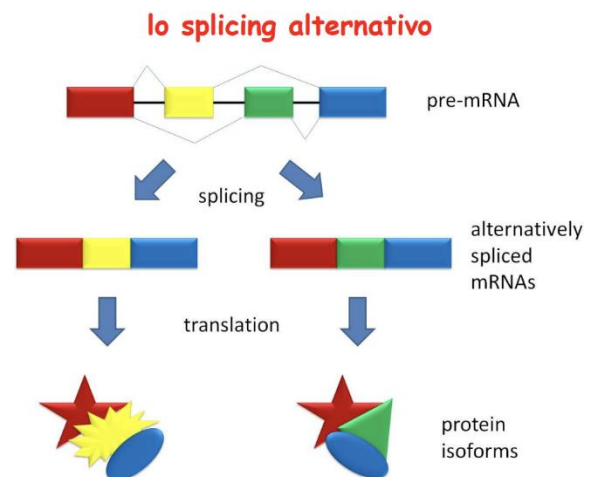
Lo splicing alternativo è un meccanismo importante anche per la regolazione tessuto-specifica dell'espressione genica che consente l'espressione di varianti di proteine che hanno delle funzioni correlate e specializzate in diversi tipi cellulari.

In questa immagine a destra abbiamo un mRNA che viene differenziato e quindi viene tradotto (e si forma) nel muscolo striato, nel muscolo liscio, nei fibroblasti, ecc... . Quindi sono proteine specifiche per il tessuto e che quindi hanno delle funzioni diverse.

La possibilità di unire più esoni in varie combinazioni costituisce quindi un ulteriore modo per regolare l'espressione genica.

Possiamo dire allora che da uno stesso pre-mRNA si formano diversi mRNA e quindi diverse proteine.

QUINDI: la maggior parte dei pre-mRNA contiene introni multipli, per cui dallo stesso gene si possono produrre diversi mRNA mediante combinazioni diverse di siti di splicing 5' e 3'. La possibilità di unire esoni in varie combinazioni fornisce un mezzo nuovo per controllare l'espressione dei geni generando mRNA multipli.



I MEMBRI DELLA FAMIGLIA p53

Un esempio di fattore di trascrizione è **p53** (ricordiamo che la proteina è p53 e il gene è TP53) che nelle cellule normali viene espresso e ha una funzione di **oncosoppressore** (quindi soppressore tumorale).

Quando si verifica uno stress ossidativo o cellulare oppure l'esposizione a sostanze cancerogene viene bloccato il ciclo cellulare e la cellula attiva l'espressione della proteina p53. Questa a sua volta va a regolare una serie di geni, quindi attiva la trascrizione di tanti geni (ad esempio P21). Questi cercano di riparare il danno e vengono attivati sistemi di riparazione. Se il danno è troppo elevato e la cellula non riesce a

“guarire”, p53 induce la cellula alla morte (apoptosi cellulare). In questo modo p53 garantisce l'integrità del genoma (infatti viene chiamato '**guardiano del genoma**'), evita quindi che cellule potenzialmente mutate (o che comunque presentano un danno) possano proliferare. A questo punto è molto importante specificare che la maggior parte dei tumori hanno p53 mutato.

p53 appartiene a una famiglia,

infatti verso la fine degli anni 90 vennero scoperti due membri della famiglia di p53 che sono chiamati **p63** e **p73**. Questi sono dei fattori di trascrizione e sono i più antichi, addirittura p63 è il più “anziano” membro.

Questi fattori di trascrizione si legano al DNA, interagiscono con altri fattori di trascrizione e controllano l'espressione di migliaia di geni coinvolti nella cellula.

p53, p63 e p73 mostrano una comune struttura altamente conservata costituita da un dominio di transattivazione (**TA**) (che attiva ulteriori fattori di trascrizione) posto all'estremità N-terminale seguito da un dominio ricco in proline (**PR**), da un dominio di legame al DNA (**DBD**: dove si vanno a legare i fattori di trascrizione e di solito le mutazioni avvengono proprio in questo dominio) posizionato nella regione centrale e un dominio di oligodimerizzazione (**OD**) situato all'estremità C-terminale.

In aggiunta p63 e p73 possiedono un altro dominio **PR** e un dominio denominato **SAM** (sterile alpha motif) all'estremità carbossi-terminale.

Quali sono le funzioni di p53? È molto importante **nell'arresto del ciclo cellulare** e quindi nell'induzione dell'**apoptosi**.

Sia TAp63 che TAp73 (come p53) nell'immagine in alto (B) sono caratterizzati da dei ++ che stanno ad indicare che hanno funzioni simili e hanno la capacità di attivare gli stessi geni che attiva p53 e di conseguenza anche TAp63 e TAp73 svolgono un ruolo nell'arresto del ciclo cellulare e nell'apoptosi.

Quindi TAp63 e TAp73 sono degli oncosoppressori.

L'ultima funzione (sempre guardando l'immagine in alto) è quella dello sviluppo, caratteristica di p63 e p73 poiché sono coinvolti nei processi di sviluppo e di differenziamento. Infatti in genere p63 è coinvolto nello sviluppo dell'epidermide.

Sono stati fatti degli esperimenti su topi knock-out, nei quali quindi veniva rimosso p63, e si è visto che questi topi nascevano senza pelle, senza epidermide.

p63 abbiamo detto che è il più anziano membro della famiglia p53 e, come tutti gli altri membri, ha 15 esoni.

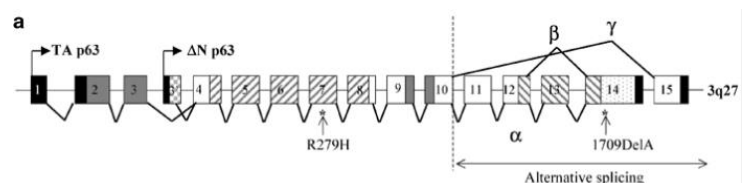
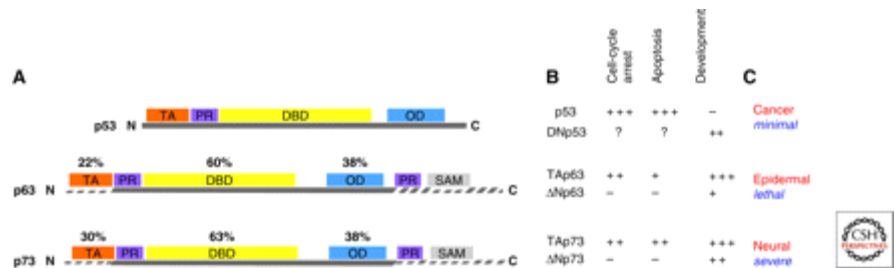
Quindi il gene TP63 è costituito da 15 esoni e questo gene può codificare per due proteine perché ha due promotori alternativi P1 e P2.

Se la trascrizione parte da **P1** si genera **TAp63**, se invece parte da **P2** si genera **ΔNp63**. Quindi il gene può essere espresso usando due diversi promotori (la trascrizione dal primo genera TAp63 e la trascrizione dal secondo genera ΔNp63, quindi si parte da un pre-mRNA e vengono trascritti due mRNA diversi).

Il primo viene chiamato TA perché contiene il dominio di transattivazione, omologo a quello presente in p53 e quindi ha le funzioni di arresto del ciclo cellulare e apoptosi. TAp63, in particolar modo, collega queste funzioni a quelle di p53. A livelli fisiologici TAp63 si è visto essere espresso molto negli ovociti e quindi viene chiamato il “guardiano della linea germinale femminile” perché quando gli ovociti subiscono stress o mutazioni è proprio questo gene che induce arresto del ciclo cellulare e apoptosi.

È stato visto che p63 è molto espresso in alcuni tumori ma quando il tumore inizia a essere metastatico la funzione di p63 viene persa. Quindi in base al tessuto, la funzione può essere oncogenica o oncosoppressiva.

Ad esempio in alcuni tumori alla prostata si è visto che la funzione di ΔNp63 nei tumori metastatici viene



persa perché in questi tipo di tumore (metastatico) abbiamo p53 mutato (che ha una funzione negativa) che favorisce ancora di più la progressione tumorale e il processo di metastasi e va a bloccare la funzione di p63 che in realtà dovrebbe proteggere da tutto questo (perché ha una funzione anti metastatica e quindi blocca il tumore).

In questi casi il mutante di p53 va a bloccare p63 e quindi inibisce la funzione di p63 (ecco perché non c'è p63). Se infatti andiamo ad inserire p63 in questi tumori della prostata, le metastasi regrediscono.

Molte terapie, infatti, si basano sulla riattivazione di p53 o anche andando ad agire su p63.

Quindi:

TAp63: ha delle attività simili a p53 ed è il guardiano della linea germinale femminile.

Δ Np63: manca del dominio di transattivazione ed è espressa per lo sviluppo dell'epidermide.

Inoltre entrambe le due isoforme TAp63 e Δ Np63 subiscono uno splicing alternativo al C-terminale del trascritto primario che risulta nelle sintesi di tre ulteriori isoforme: α, β, γ .

La stessa identica cosa che abbiamo visto per p63 avviene per p73. Esso produce due geni: TAp73 e Δ Np73.

TAp73 in particolar modo è molto sviluppata nel Sistema Nervoso Centrale, infatti una mancanza di TAp73 predispone a delle malattie neurodegenerative (come l'Alzheimer).

REGOLAZIONE DELLO SPLICING

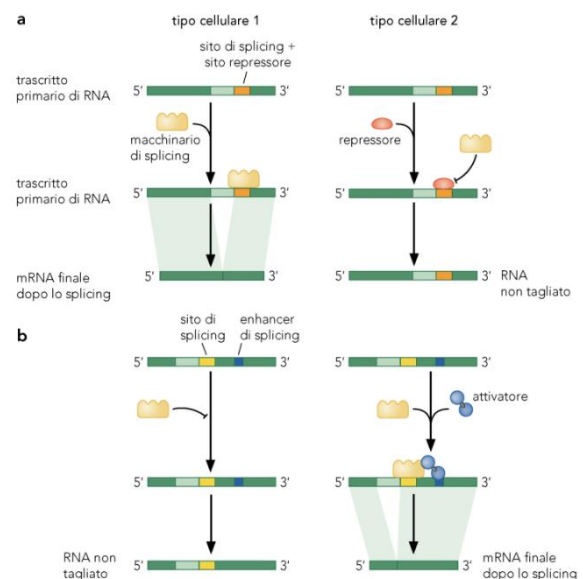
Anche lo splicing viene regolato: il reclutamento dei fattori di splicing è controllato da proteine attivatrici o inibitrici. Le proteine attivatrici a loro volta si legano a degli Enhancer e quelle inibitrici a dei Silencer.

In funzione della localizzazione e della attività vengono classificati in:

- **Enhancer o silencer esonici** (se sono localizzate sugli esoni): ESE (Exonic Splicing Enhancer) e ESS (Exonic Splicing Silencer);
- **Enhancer o silencer intronici** (se sono localizzate sugli introni): ISE (Intronic Splicing Enhancer) e ISS (Intronic Splicing Silencer);

Nell'immagine A abbiamo un tipo cellulare 1 dove abbiamo il trascritto e il sito dove si va a legare il repressore. Se abbiamo la macchina di splicing che si va a legare avremo l'mRNA dopo lo splicing. Nel tipo cellulare 2, se abbiamo il repressore che si lega l'RNA non è tagliato, cioè non avviene il processo di splicing perché lo ha inibito il repressore.

Nell'immagine B abbiamo l'Enhancer quindi se l'attivatore si va a legare abbiamo lo splicing, se non c'è l'attivatore l'RNA non viene tagliato.



- 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;
- Il processo di splicing ha il compito molto delicato e complesso di rimuovere in modo preciso gli introni;
- Malfunzionamenti di questo processo hanno conseguenze importanti che comportano l'insorgenza di diverse patologie incluso il cancro.

Errori nello splicing del pre-mRNA causano diverse malattie:

- **DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE**

La **DMD** è una patologia neuromuscolare a trasmissione recessiva legata al **cromosoma X** (colpisce prevalentemente i maschi), caratterizzata da una degenerazione progressiva dei muscoli scheletrici, lisci e cardiaci, che genera **debolezza muscolare diffusa**. È la più grave tra le distrofie muscolari. Si manifesta nella prima infanzia con problemi nella deambulazione che progrediscono fino alla perdita dell'autonomia. Conduce alla completa immobilità e l'aspettativa di vita, pur raddoppiata negli ultimi anni, non supera il terzo decennio.

La terapia su cui si basa viene chiamata **“exon skipping”**, ovvero salto dell'esone.

A causare la distrofia muscolare di Duchenne è la mutazione del gene codificante per la **distrofina**, una proteina fondamentale per il mantenimento dell'apparato muscolo-scheletrico.

La degradazione muscolare è causata **dall'assenza di distrofina** dovuta a mutazioni che portano alla cessazione prematura della traduzione dell'mRNA.

Avviene la mutazione di una Timina con una Adenina, quindi la sostituzione nell'esone 31 genera un codone prematuro di stop e la traduzione della proteina si ferma perché un codone viene trasformato in un codone di terminazione. La proteina, quindi, diventa tronca e non ha funzione. È stato approvato un farmaco contro la distrofia muscolare che è un oligonucleotide sintetico e la terapia si basa, come detto precedentemente, sull'exon skipping. Questa tecnica trasforma la sequenza Silencer (che andava a bloccare) in una sequenza Enhancer; quindi si va a saltare la traduzione ed è come se si continuasse la traduzione saltando l'esone (che è quello che causa il codone di stop). Grazie a questa tecnica è come se lo splicing alternativo fa sì che l'apparato di traduzione non legga la tripletta come codone di stop e si generi una proteina più completa, meno funzionale di quella normale ma che comunque dà dei sintomi della malattia ma meno gravi. È come se questa nuova proteina compensa la distrofina che manca. Quindi questa terapia 'salta' l'esone e cerca di far ritornare leggibile l'mRNA.

Ovviamente è meglio questa proteina meno attiva che l'assenza della distrofina.

- **ATROFIA MUSCOLARE SPINALE**

La SMA è una malattia neurodegenerativa progressiva e nella sua forma più grave è sempre fatale. È causata da un difetto nel gene SMN1, che codifica per una proteina essenziale per l'assemblaggio delle snRNP cellulari, comprese quelle che formano lo spliceosoma.

Gli esseri umani hanno due tipi di geni che si chiamano: SMN1 e SMN2.

In particolar modo SMN1 produce una proteina funzionante che è importante per formare lo spliceosoma; quindi se abbiamo SMN1 e SMN2 funzionanti non abbiamo la malattia.

Invece se il gene SMN2 non funziona esclude l'esone 7 e si ha la formazione di una proteina che non funziona. In una persona affetta da SMA le mutazioni impediscono l'espressione genica o portano alla sintesi di una proteina instabile o non funzionante.

Quindi i due geni sono uguali ma le funzioni di splicing producono due prodotti diversi.

L'esone 7 di SMN1 differisce da quello di SMN2 in un'unica posizione; questa posizione è un Enhancer esonico, quindi è una sostituzione di un Enhancer in cui si ha l'espressione di 7, in un Silencer.

Soluzione: modificare lo schema di splicing alternativo del gene SMN2, per far sì che l'esone 7 non venga scartato. Quindi si cerca di inserire l'Enhancer per avere una proteina funzionale.

Nusinersen: oligonucleotide sintetico, complementare alla sequenza silencer dell'esone 7 (prima terapia approvata per la SMA).

4. EDITING

Un processo post-trascrizionale che genera molecole di RNA che differiscono dal loro stampo di DNA in una o più posizioni, modificando così l'informazione genetica presente nel gene. L'editing comprende delle reazioni che aggiungono o eliminano delle basi nelle regioni che codificano il trascritto.

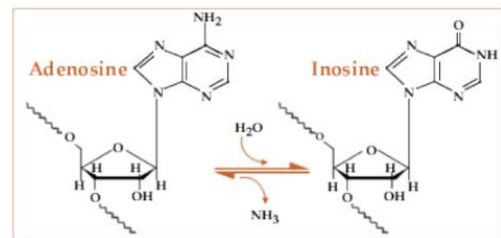
Utilizza due diversi meccanismi:

- La **conversione di una base in un'altra**
- L'**inserzione o delezione** di nucleotidi

La funzione dell'editig è quella di apportare le opportune correzioni per rendere i trascritti funzionali o per modulare l'espressione di prodotti alternativi in diverse condizioni o tessuti.

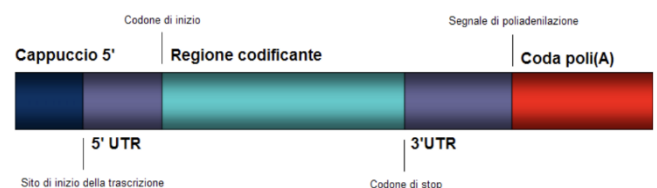
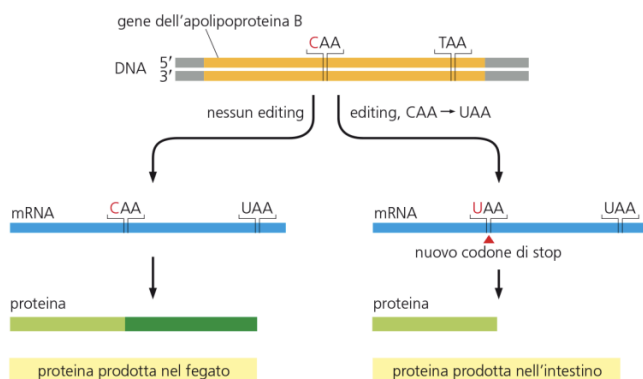
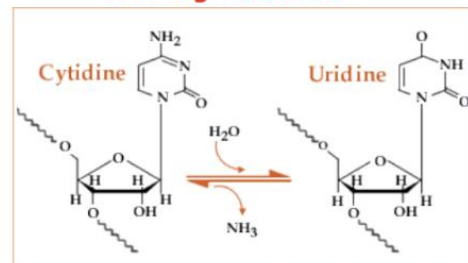
E' un processo ubiquitariamente diffuso negli eucarioti e riguarda sia trascritti di geni nucleari che degli organelli. Nei mammiferi abbiamo il cambiamento di una base, gli editing più famosi sono quelli **da A ad I**. Quest'ultimo svolge un ruolo importante soprattutto nel sistema nervoso dove si ha il cambiamento della base da una adenosina a una inosina. Un esempio si ha nella subunità B del recettore del glutammato, la sostituzione di una A con una P genera un'arginina al posto di una glutammina. Questa sostituzione altera le proprietà del recettore e la permeabilità al Ca^{2+} .

Nei mammiferi: Editing da A ad I



Poi abbiamo l'editing **da C a U**. Si ha il cambiamento di una citidina con una uridina. Il processo di editing, che genera un codone di stop prematuro, avviene in modo tessuto-specifico nell'intestino ma non nel fegato. In questo modo viene prodotta la proteina ApoB100 nel fegato e ApoB48 nell'intestino. Quindi abbiamo un unico gene che codifica per le proteine ApoB, l'mRNA non modificato verrà trascritto nel fegato e si verrà a formare l'ApoB100, invece l'mRNA una volta subito di il processo di editing da C a U andrà a codificare la proteina ApoB48 nell'intestino. Oltre il 99% dell'RNA trascritto si all'interno di introni e viene rimosso durante lo splicing. Le proteine legate all'RNA permettono a quest'ultimo di attraversare i pori nucleari e arrivano nel citosol dove avverrà la sintesi proteica.

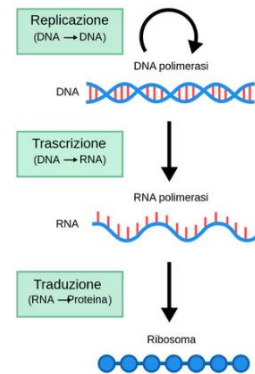
Nei mammiferi: Editing da C ad U



TRADUZIONE

Come fanno le informazioni contenute nella sequenza di 4 nucleotidi ad essere convertite in sequenze di 20 amminoacidi?

Se usassimo singolarmente 4 nucleotidi arriviamo a 4 amminoacidi, se li usiamo in coppia arriviamo a 16 amminoacidi, invece se li usiamo come triplette arriviamo a formare 64 amminoacidi. L'ipotesi confermata è la terza.



Circa 50 anni fa è stato decifrato il codice genetico:

- Esso fornisce le indicazioni fondamentali per convertire l'informazione genetica in polipeptidi mediante il processo di traduzione.
- Il codice genetico è un codice a **triplette**, ovvero un gruppo di tre nucleotidi (**codone**) dell'mRNA che codifica per un amminoacido della catena polipeptidica.
- Dei 64 codoni, **61 specificano per un amminoacido**, i rimanenti **3 sono codoni di stop** che determinano la fine della sintesi proteica.

		Seconda lettera				
		U	C	A	G	
Prima lettera	U	UUU Fenilalanina UUC	UCU Serina UCC UCA UCG	UAU Tirosina UAC UAA Codone di stop UAG Codone di stop	UGU Cisteina UGC UGA Codone di stop UGG Triptofano	U C A G
	C	CUU Leucina CUC CUA CUG	CCU Prolina CCC CCA CCG	CAU Istidina CAC CAA Glutammina CAG	CGU Arginina CGC CGA CGG	U C A G
	A	AUU Isoleucina AUC AUA AUG Metionina; codone d'inizio	ACU Treonina ACC ACA ACG	AAU Asparagina AAC AAA Lisina AAG	AGU Serina AGC AGA Arginina AGG	U C A G
	G	GUU Valina GUC GUA GUG	GCU Alanina GCC GCA GCG	GAU Acido aspartico GAC GAA Acido glutammico GAG	GGU Glicina GGC GGA GGG	U C A G

Ciascun riquadro contiene 4 triplette per un totale di 64 codoni.

Le caratteristiche del codice genetico:

- E' **degenerato** (ridondante), perché un dato amminoacido può essere codificato da più codoni; (un esempio ne è la leucina che può essere codificata da 6 codoni);
- Non è ambiguo, perché un singolo codone codifica un solo amminoacido;
- E' universale (tranne rare eccezioni), cioè è praticamente identico in tutti gli organismi.

Ipotesi del vacillamento: l'appaiamento tra il codone dell'mRNA e l'anticodone del tRNA segue sempre la regola classica dell'appaiamento tra basi complementari a livello delle prime due posizioni, mentre per la terza base si possono verificare degli appaiamenti vacillanti come tra G e U (quindi di conseguenza più codoni possono utilizzare lo stesso RNA transfer).

Noi sappiamo che gli amminoacidi non sono 20 ma sono 22, perché in alcuni RNA messaggero il codone di stop UGA codifica per un amminoacido particolare che è la selenocisteina, queste selenocisteine sono degli amminoacidi che entrano a far parte della composizione di proteine che vengono chiamate selenoproteine che hanno una funzione nei sistemi antiossidanti. Poi abbiamo un altro codone di stop UAG che codifica per la pirrolisina.

Per il processo di traduzione abbiamo bisogno di:

- RNA messaggero;
- Ribosomi (sono la sintesi di sintesi proteica);
- RNA transfer.

La TRADUZIONE è affidata ai RIBOSOMI: Nel 1953 il biologo rumeno George Emil PALADE evidenziò per la prima volta i ribosomi, utilizzando un microscopio elettronico. I ribosomi appaiono come delle particelle globulari, non rivestite da membrane, ed hanno un diametro di 15-20 nm.

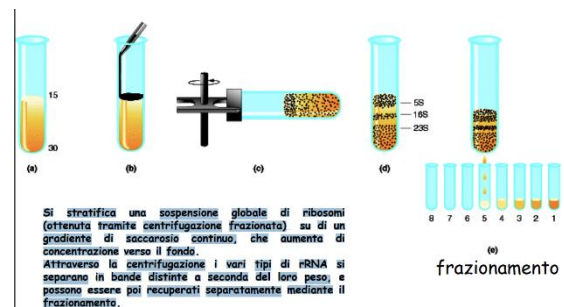
I ribosomi sono delle particelle di natura ribonucleoproteica: composti da **RNA ribosomiale** e **proteine basiche**. La cosa fondamentale è che l'RNA ribosomiale non ha solo una funzione strutturale ma soprattutto ha un **ruolo catalitico**, invece le proteine hanno un **ruolo** prevalentemente **strutturale**. Gli RNA ribosomiali contengono dei nucleotidi diversi oltre ai 4 canonici.

I ribosomi sono i siti della sintesi proteica. Sono costituiti da **due subunità: una maggiore e una minore**. I ribosomi sono denominati secondo la loro velocità di sedimentazione.

- Per i ribosomi procariotici 70S abbiamo la subunità maggiore 50S, la quale è costituita da RNA ribosomiale 23S e 5S, e 34 proteine; per quanto riguarda la subunità minore 30S abbiamo RNA ribosomiale 16S e 21 proteine.
- Per i ribosomi eucariotici 80S abbiamo la subunità maggiore 60S, la quale è costituita da RNA ribosomiale 28S, 5.8S, 5S e 47 proteine; per quanto riguarda la subunità minore 40S abbiamo RNA ribosomiale 18S e 33 proteine.

Frazionamento dei ribosomi

Si stratifica una sospensione globale di ribosomi su di un gradiente saccarosio. Attraverso la centrifugazione i vari tipi di RNA ribosomiale si separano in bande distinte in base alla massa e alla forma della particella, che possono essere poi recuperati separatamente mediante frazionamento.



I ribosomi sono localizzati nel citoplasma liberi o legati dal reticolo endoplasmatico rugoso.

- Nella cellula eucariotica sono presenti anche nella matrice dei mitocondri,
- Nella cellula vegetale sono presenti nei cloroplasti.

I ribosomi si formano all'interno del nucleolo e poi vengono esportati nel citoplasma attraverso questi pori nucleari. Nel citoplasma le due subunità rimangono separate finché non abbiamo l'inizio del processo di traduzione, dove si verrà a formare il ribosoma funzionale.

NUCLEOLO: 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 organizzato attorno alle regioni cromosomiche che contengono i geni del rRNA 5.8S, 18S e 28S. 10 cromosomi interfascici forniscono al nucleolo le anse di DNA che producono RNAr.

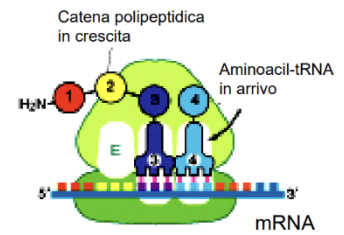
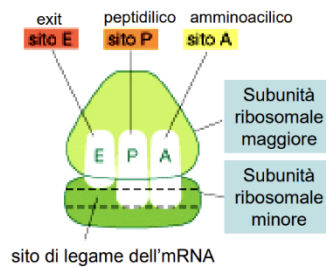
Funzione dei ribosomi:

1. Decodificare il codice genetico dell'mRNA;
2. Catalizzare la formazione dei legami peptidici tra gli amminoacidi che portano alla creazione di un polipeptide.

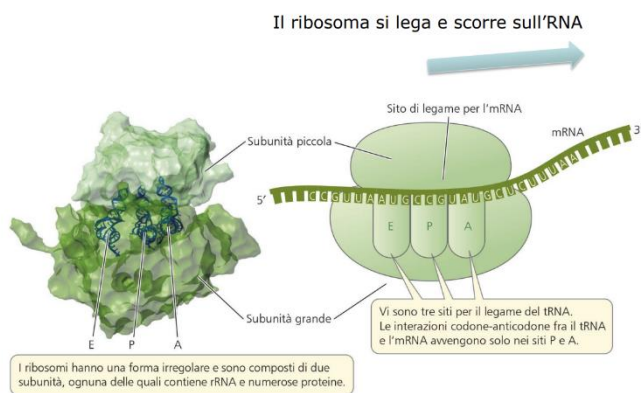
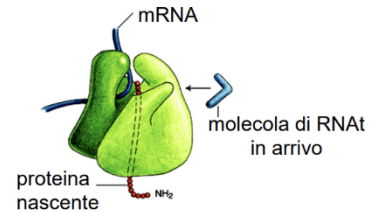
All'interno del ribosoma distinguiamo 4 siti di legame per l'rRNA; 3 siti per l'rRNA transfer ed un sito per RNA messaggero.

I siti che legano l'rRNA transfer sono:

- il **sito A** che prende il nome di sito amminoacido dove si andrà a posizionare l'amminoacil-tRNA;
- poi abbiamo il **sito P** peptidilico dove si legherà il peptide nascente;
- e poi vi il **sito E**.



Modello di ribosoma funzionante



La **subunità maggiore** ha un'attività peptidil-transferasica (forma legami peptidici tra AA portati dai tRNA).

La **subunità minore** funge da guida di assemblaggio per tutti i fattori necessari alla sintesi proteica e da sito di decodifica dell'mRNA. Le due subunità associandosi formano un tunnel nel quale scorre l'mRNA in traduzione (direzione 5'-3').