



Università degli studi di Ferrara

Corso di Laurea in Scienze Biomolecolari e Cellulari

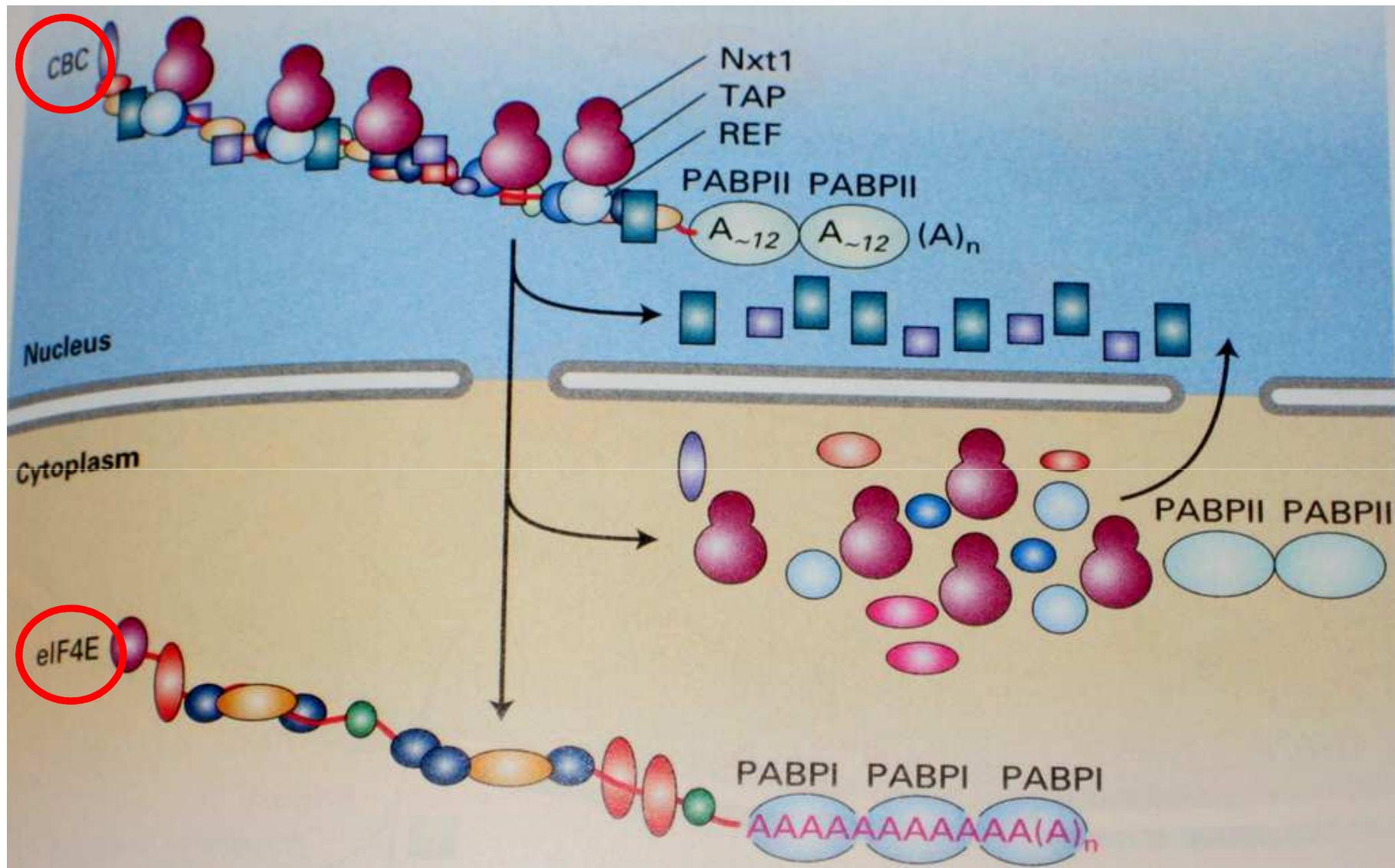
Basi Molecolari delle Malattie

DAL mRNA ALLA SINTESI PROTEICA

7 maggio 2010

Alessio Branchini

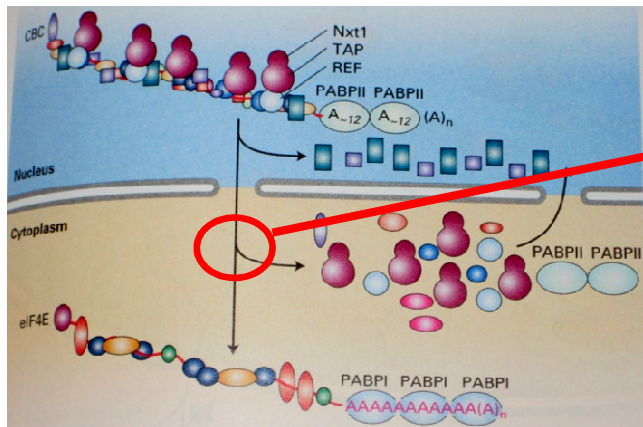
Trasporto del mRNA negli eucarioti



eIF4E sostituisce CBC all'estremità 5'-cap

La concentrazione di un mRNA dipende dal bilancio tra la quota di messaggero sintetizzata e la quota di messaggero degradata

Meccanismi di controllo di qualità per assicurare fedeltà all'intero percorso cui è sottoposto il messaggero



Quality Control → mRNA Surveillance

Nucleo

Poro Nucleare

Citoplasma

Esosoma



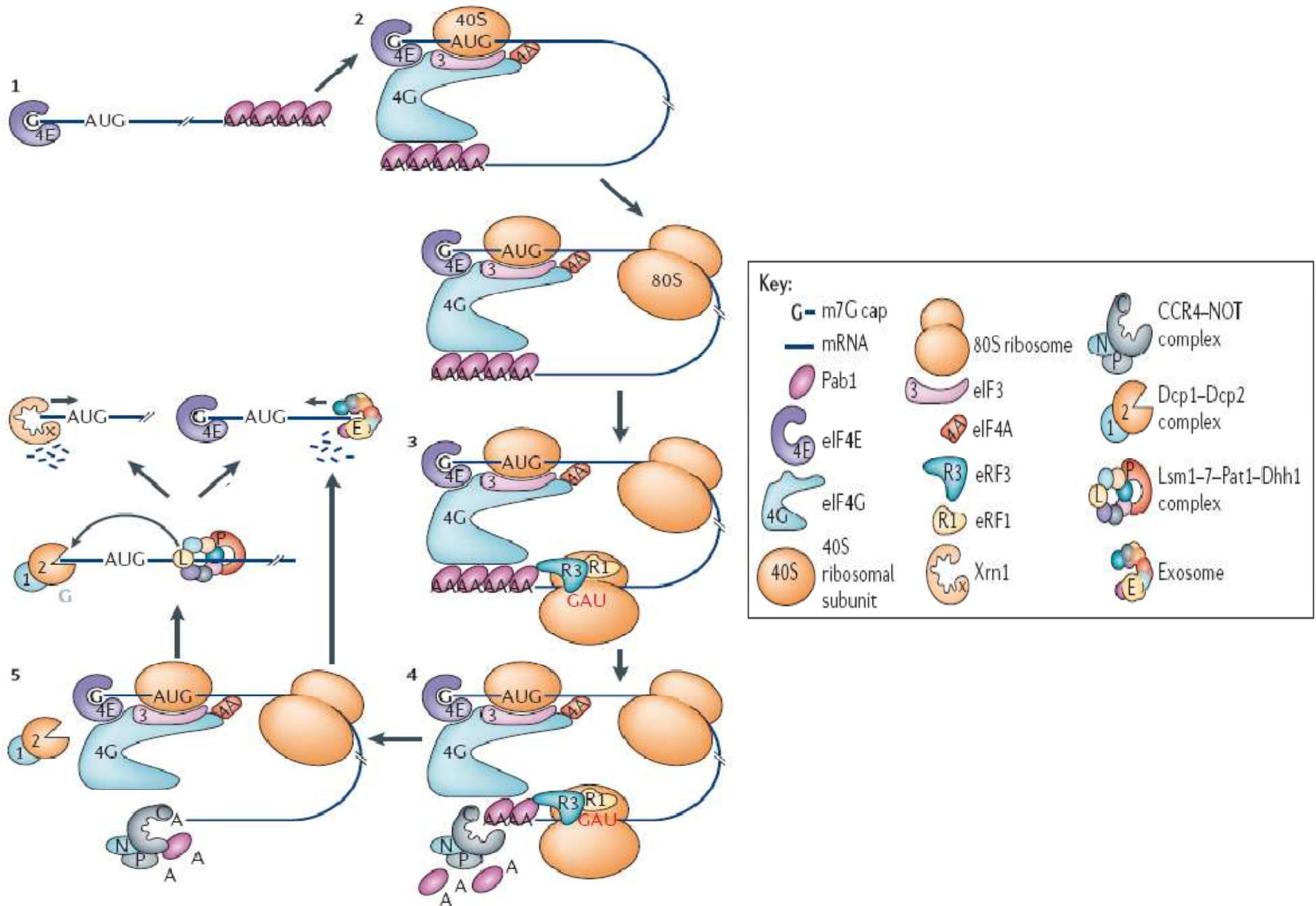
Difetti di splicing
o poliadenilazione

NO a pre-mRNA da
splicing incompleto e
associati allo
spliceosoma

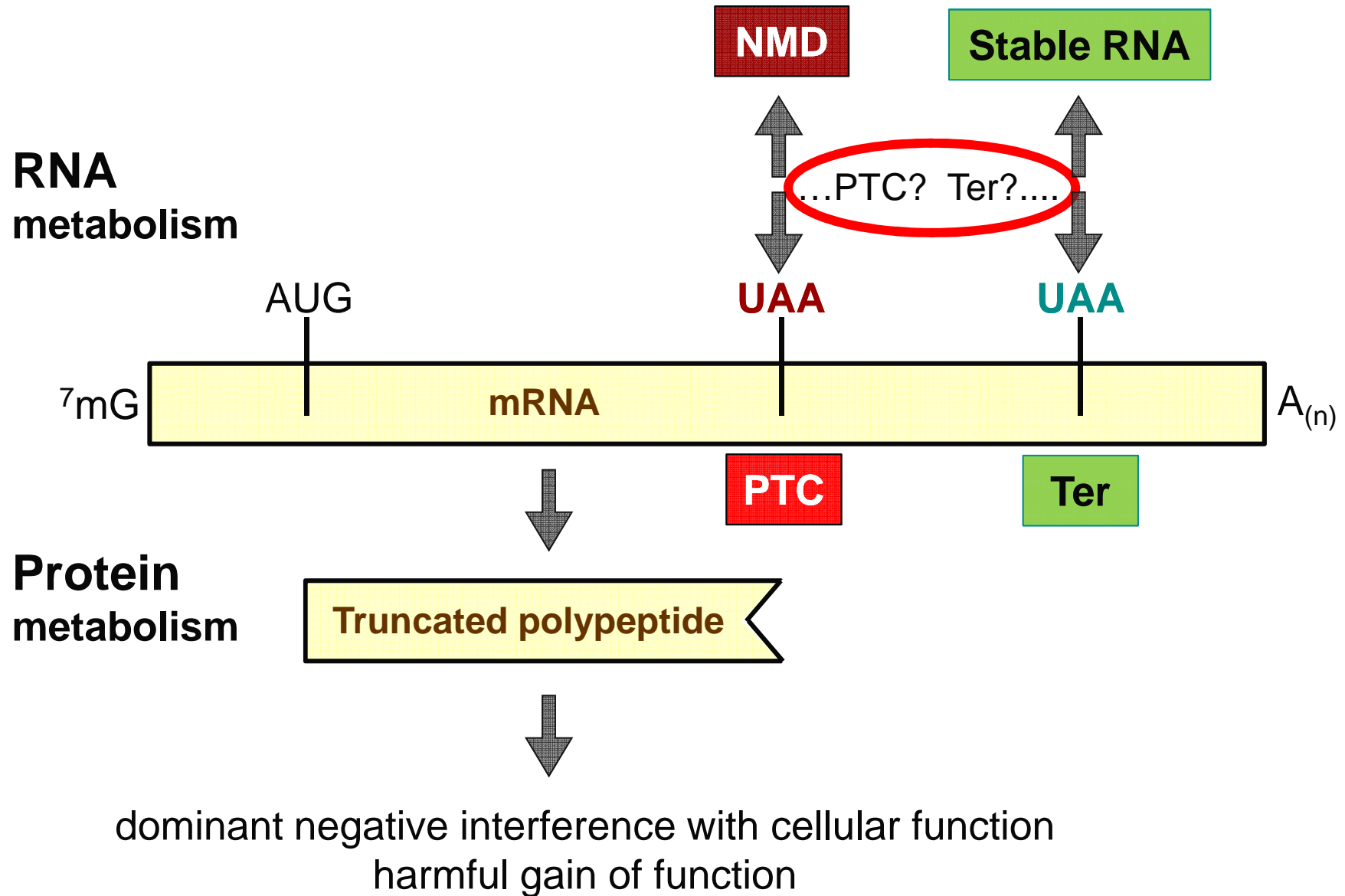
mRNA con codoni di
stop prematuri →
**Nonsense-mediated
decay (NMD)**

(Idrolisi 3' → 5'
introni excisi)

Il ciclo vitale del mRNA nel citoplasma



PREMATURE vs NORMAL TERMINATION



Nonsense-Mediated Decay (NMD)

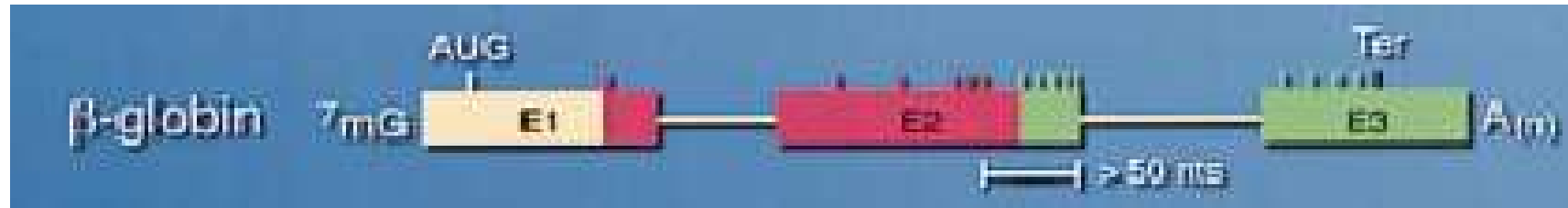
Processo responsabile dell'eliminazione di trascritti contenenti codoni di stop prematuri (PTCs, Premature Stop Codons) la cui presenza può essere dovuta a mutazioni a livello del DNA, errori nel processo di trascrizione, splicing alternativo con inclusione di PTC o errori del frame di lettura da parte del ribosoma

Basi Molecolari di Malattia

- Circa il 30% delle malattie ereditarie è causato da mutazioni nonsense o frameshift che generano codoni nonsense
- Il NMD PROTEGGE i portatori eterozigoti di un allele contenente un PTC → mantenimento forma recessiva (aplo-sufficienza) dovuta alla proteina Wt prodotta dall'allele normale

β -talassemia (gene β -globina)

3 esoni \rightarrow maggior parte delle mutazioni nei primi 2



mRNA



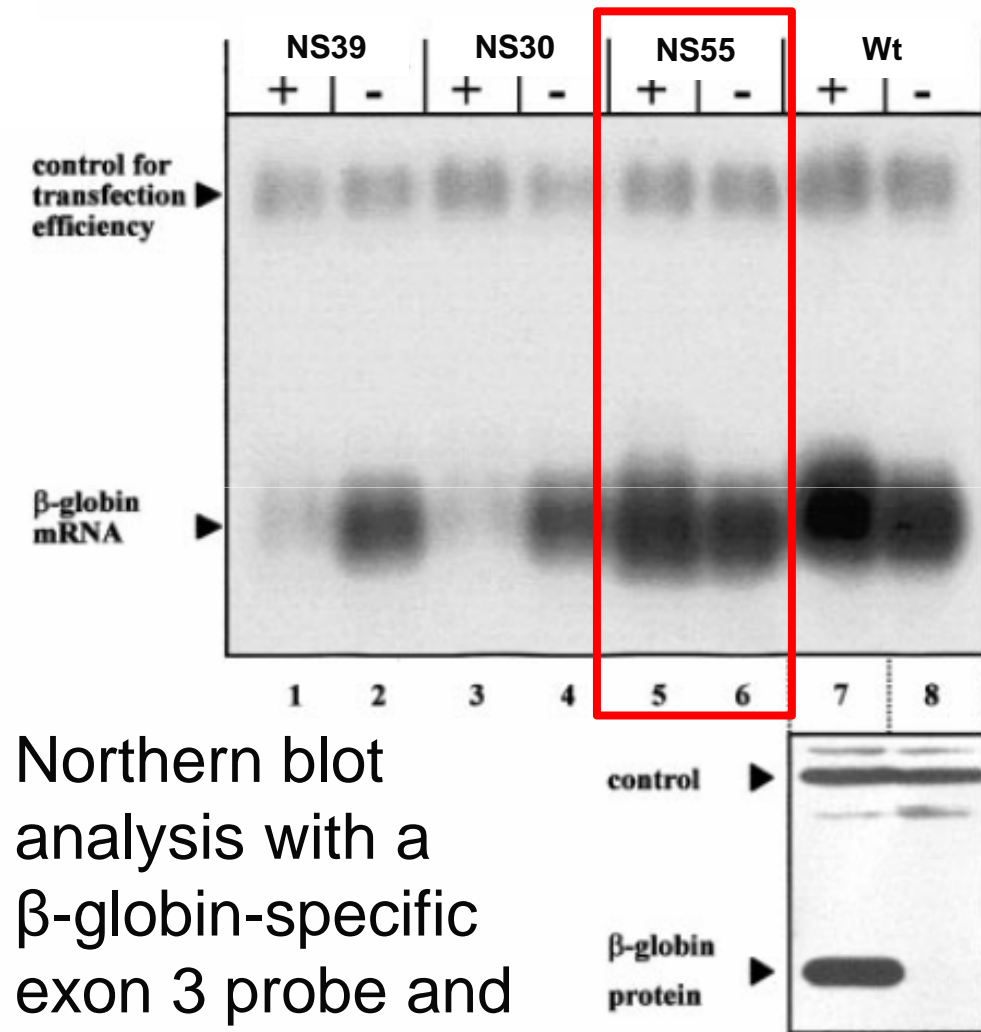
Frequent, heterozygotes,
asymptomatic, recessive inheritance

Rare, heterozygotes,
severely affected, dominant inheritance

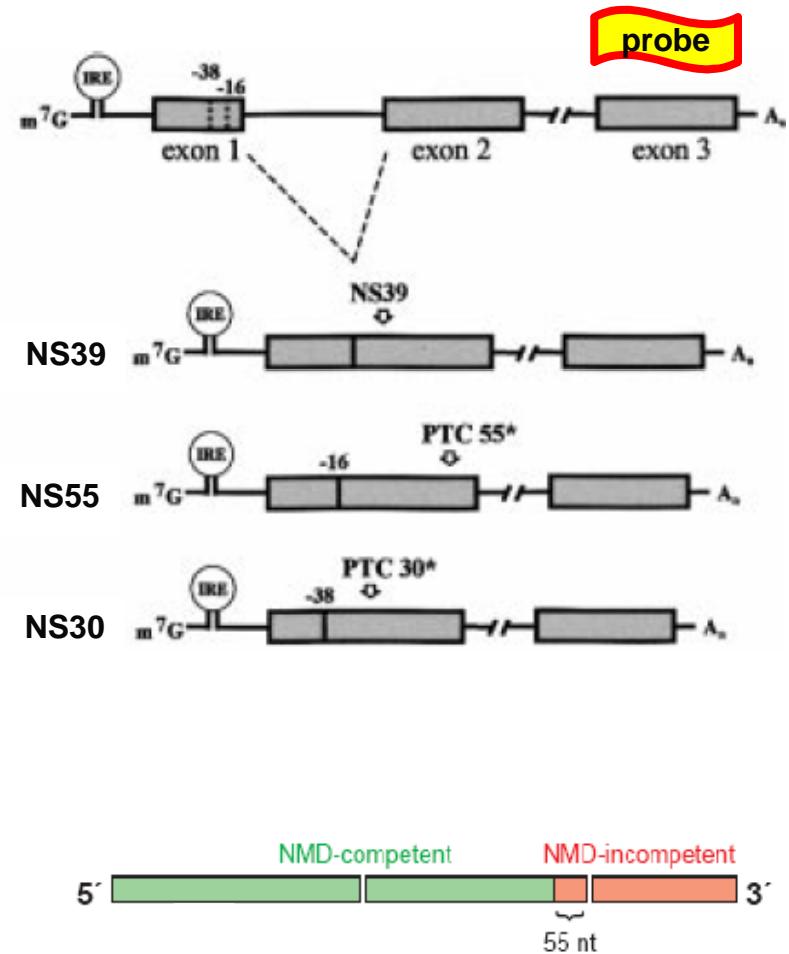
Mantenuti bassi i livelli
del trascritto mutato

Livelli circa normali del trascritto
 β -globina tronca \rightarrow catene insolubili
Precipitazione e fenotipo clinico

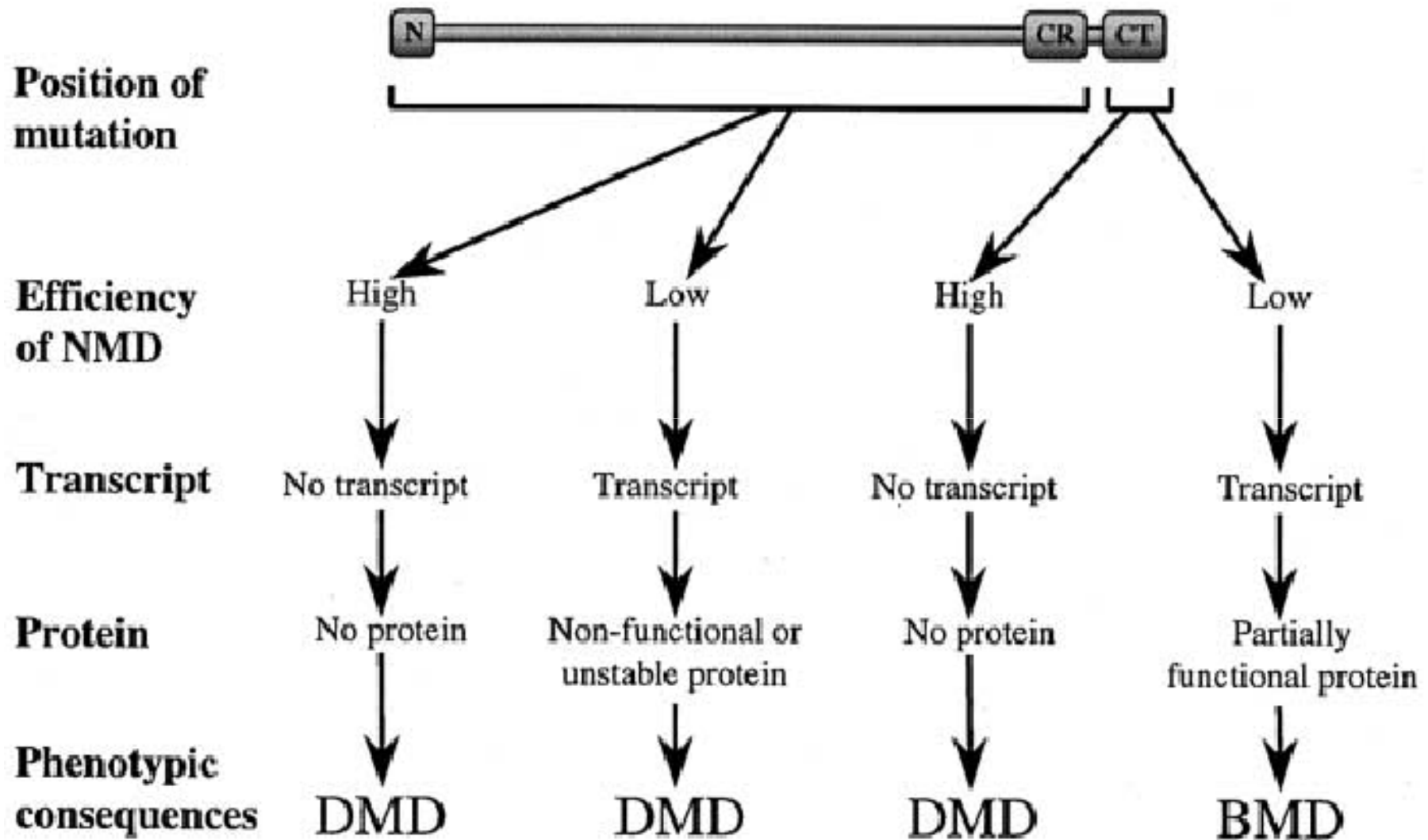
LA POSIZIONE DELLO STOP CODON INFLUENZA L'EFFICIENZA DEL NMD



Northern blot analysis with a β-globin-specific exon 3 probe and suppression⁽⁻⁾ of translation⁽⁺⁾



NMD EFFICIENCY IN MUSCULAR DISTROPHIES

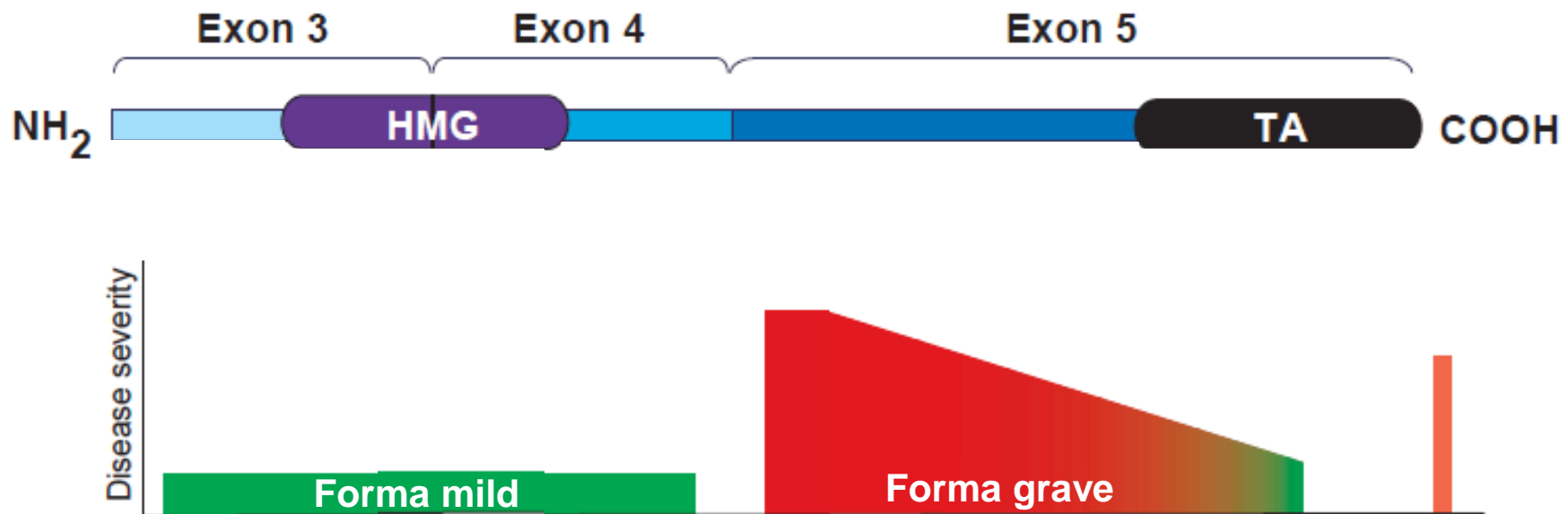


Kerr et al., Hum Genet (2001)

Triggering NMD versus escaping NMD may cause distinct neurological phenotypes

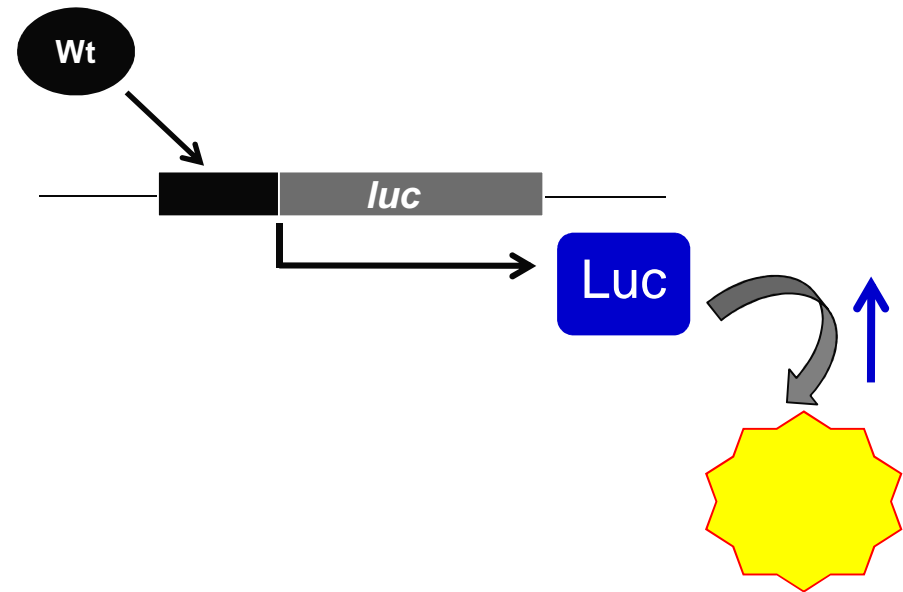
SOX10 is a transcription factor essential for the development of cells in the neural crest and also controls the proliferation and differentiation of Schwann cells (PNS) and oligodendrocytes (CNS)

SOX10 disease-associated mutations → PTCs → mild or severe neuropathies

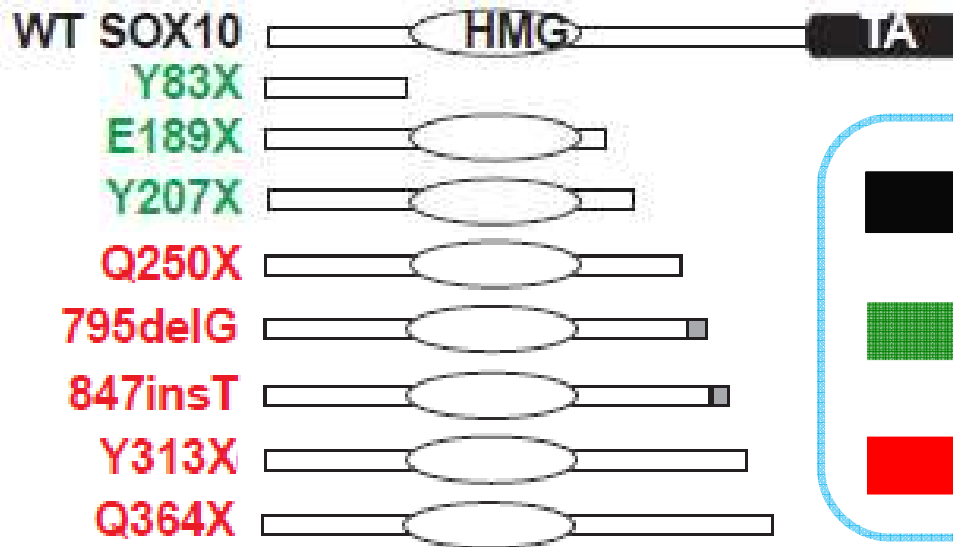


Competition assay:

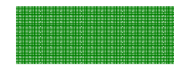
Vettori SOX mutati e Wt co-transfettati in cellule eucariotiche insieme a un vettore luciferasi avente un promotore SOX-inducibile



Mutanti SOX10 utilizzati nel competition assay:



Proteina Wt



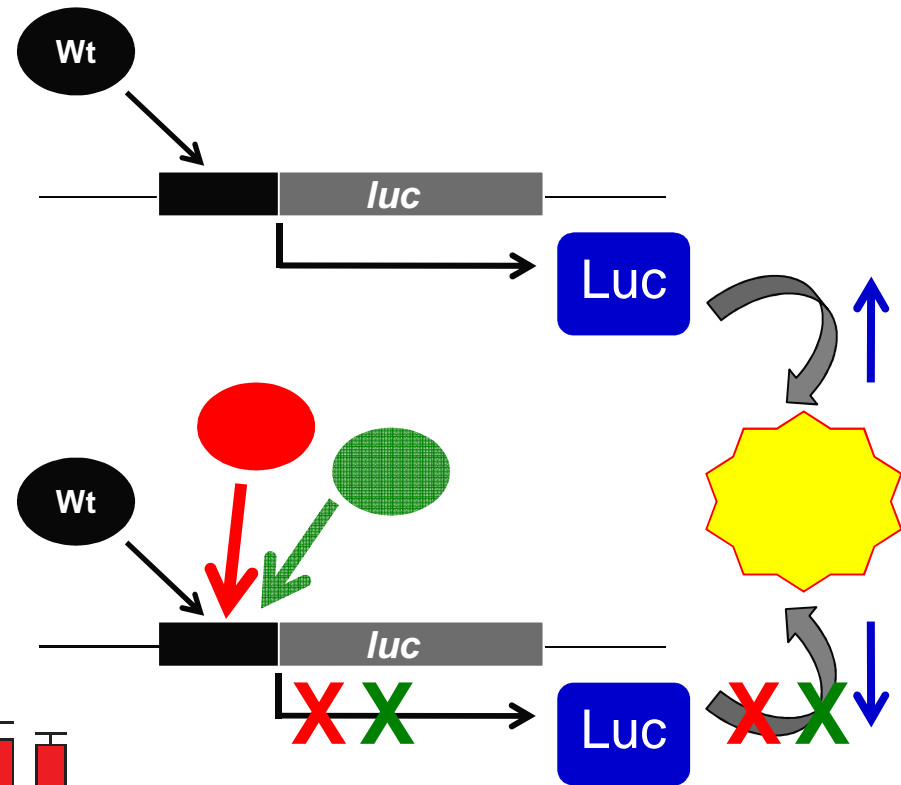
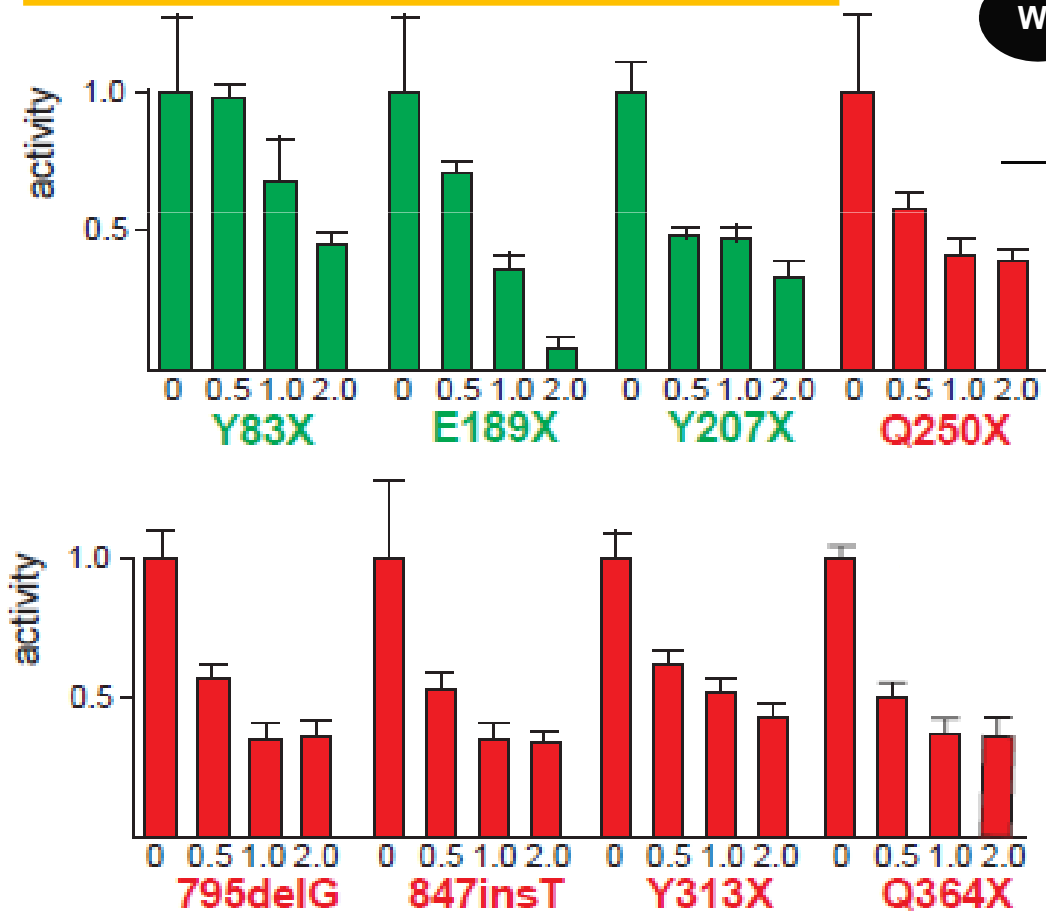
Proteina forma mild



Proteina forma grave

Competition assay:

Vettori SOX mutati e Wt co-transfettati in cellule eucariotiche insieme a un vettore luciferasi avente un promotore SOX-inducibile

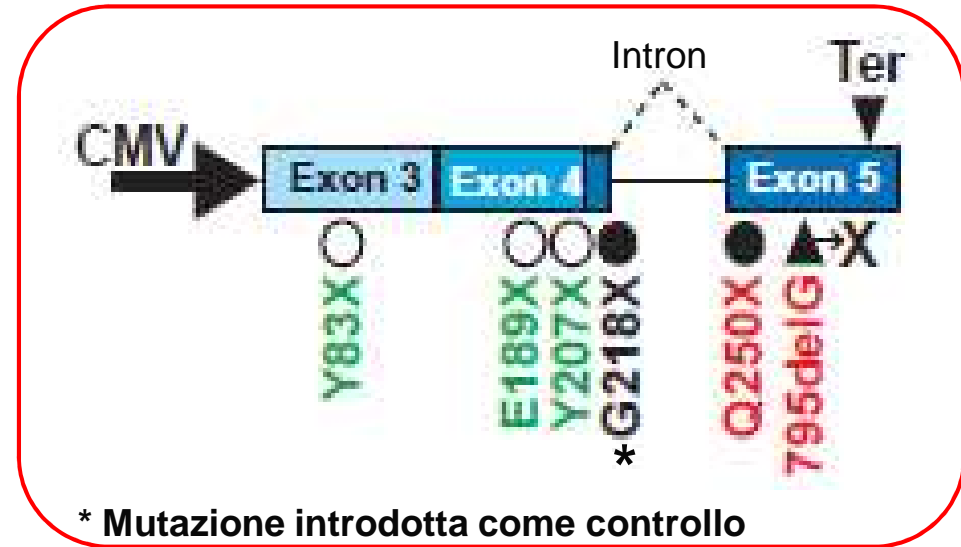
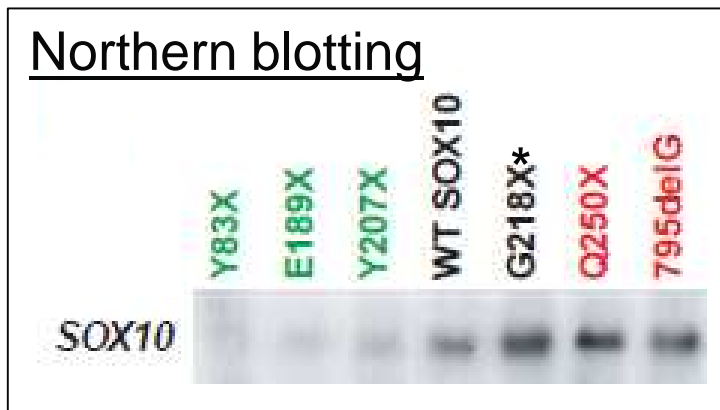


**DOMINANZA
NEGATIVA delle
proteine tronche
sulla proteina Wt**

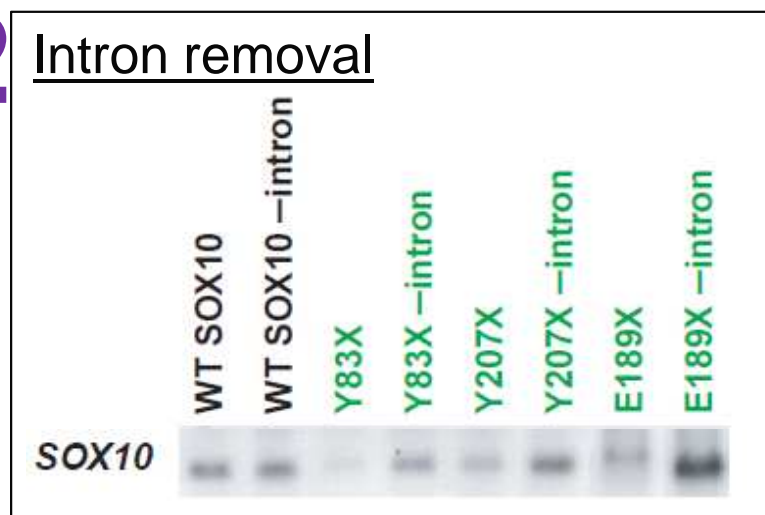
IL FENOTIPO MENO GRAVE È DOVUTO A DOWNREGULATION DA NMD

Minigene approach:

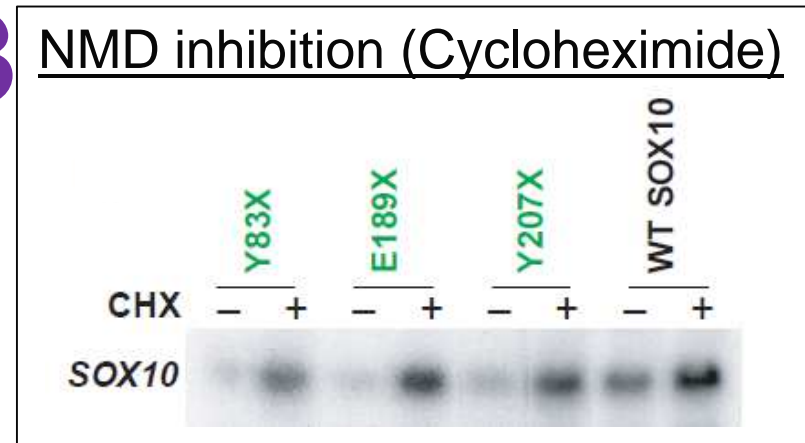
1 Northern blotting



2 Intron removal

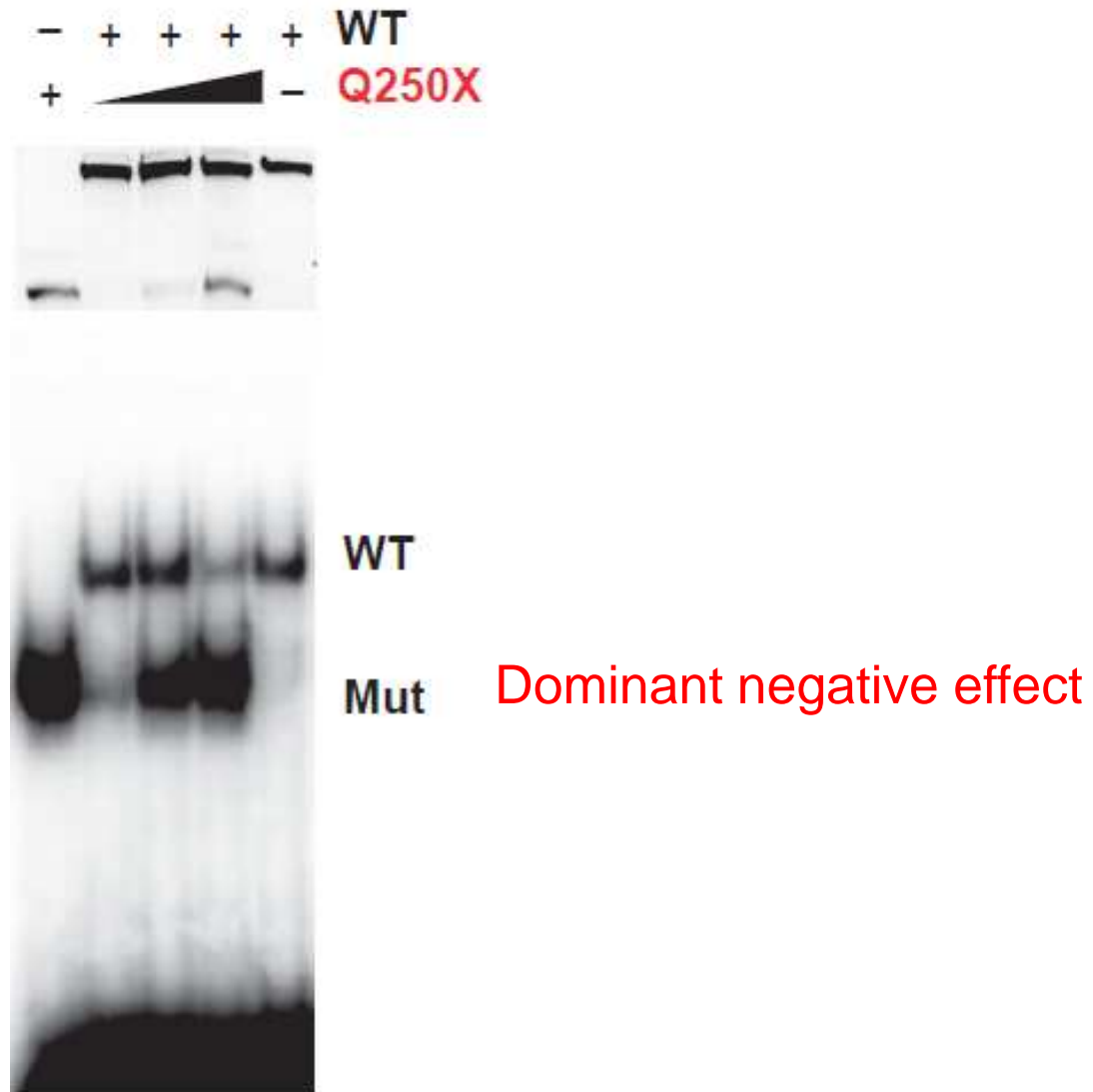


3 NMD inhibition (Cycloheximide)

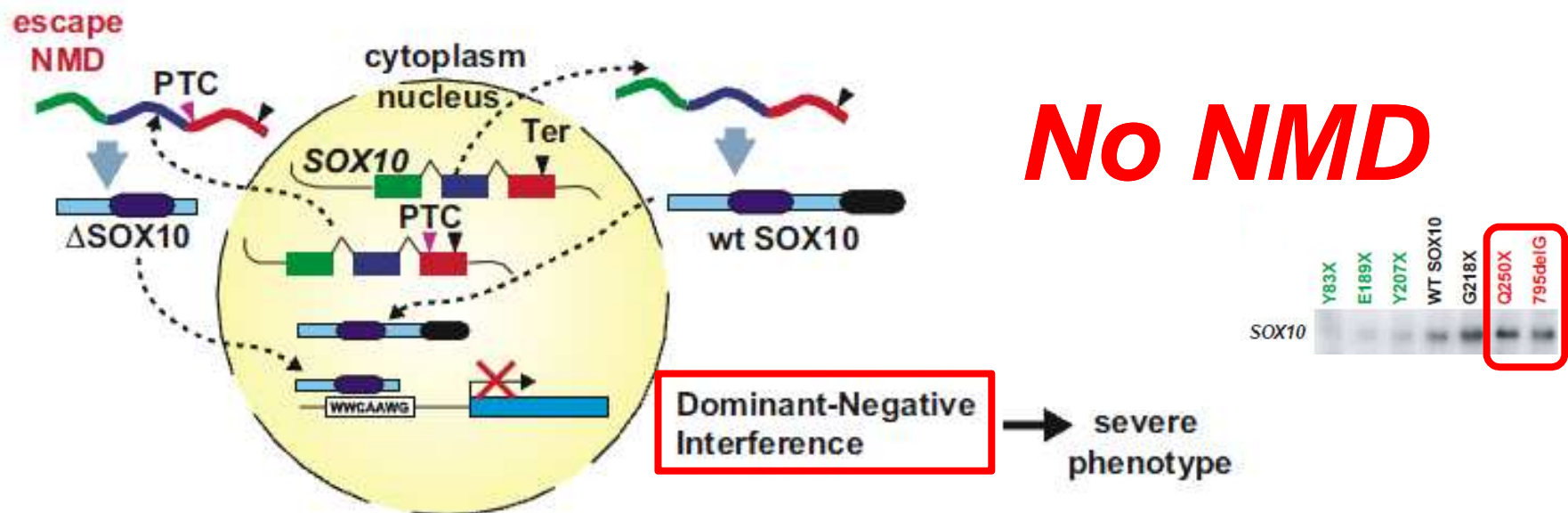
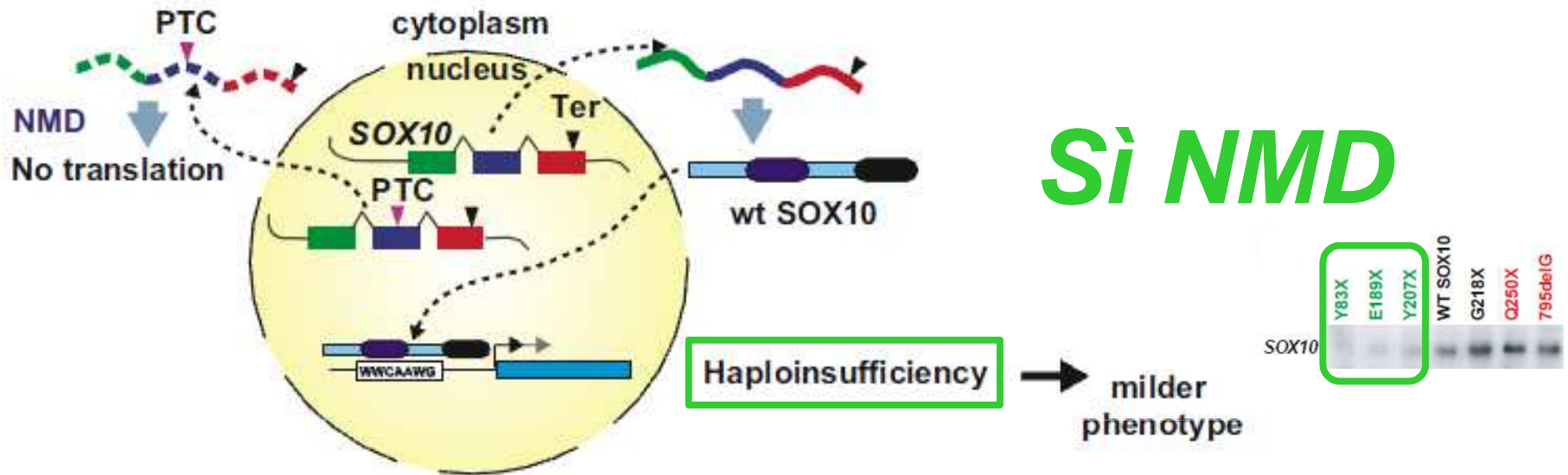


Inoue et al., Nature Genetics (2004)

Mutant SOX10 proteins interfere with the DNA binding of wild-type SOX10- EMSA



Triggering NMD versus escaping NMD may cause distinct neurological phenotypes



NMD E FENOTIPO CLINICO

Gene name	NMD efficiency	Effect of mutation/phenotype
<i>NMD beneficial</i>		
β-globin	High	Heterozygotes healthy; recessively inherited β-thalassemia major
	Low	Dominantly inherited β-thalassemia intermedia
SOX10	High	Haploinsufficiency leads to less severe neurocristopathy (WS4: Waardenburg and Hirschsprung diseases)
	Low	Dominantly inherited complex neurocristopathy (PCWH: peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome and Hirschsprung disease)
<i>NMD detrimental</i>		
Dystrophin	High	Severe form of muscular dystrophy (Duchenne muscular dystrophy)
	Low	Milder form of muscular dystrophy (Becker muscular dystrophy)
CFTR (cystic fibrosis)	High	Severe cystic fibrosis
	Low	Milder form of cystic fibrosis

CONCLUSIONI (1)

- È coinvolto nella regolazione dell'espressione genica mediante eliminazione di mRNA aventi codoni di stop prematuri
- Assicura l'eliminazione di messaggeri contenenti codoni di stop prematuri modulando il fenotipo clinico mantenendo lo stato recessivo
- Le proteine tronche prodotte per mancato decay manifestano un effetto di dominanza negativa nei confronti della proteina normale

LA STRADA PER LA DEGRADAZIONE

mRNA contenente codone di stop prematuro (PTC)

1. Riconoscimento codone di stop prematuro
2. “Marcatura” e interazione con effettori proteici
3. Isolamento mRNA “marcato”

Degradazione del trascritto aberrante

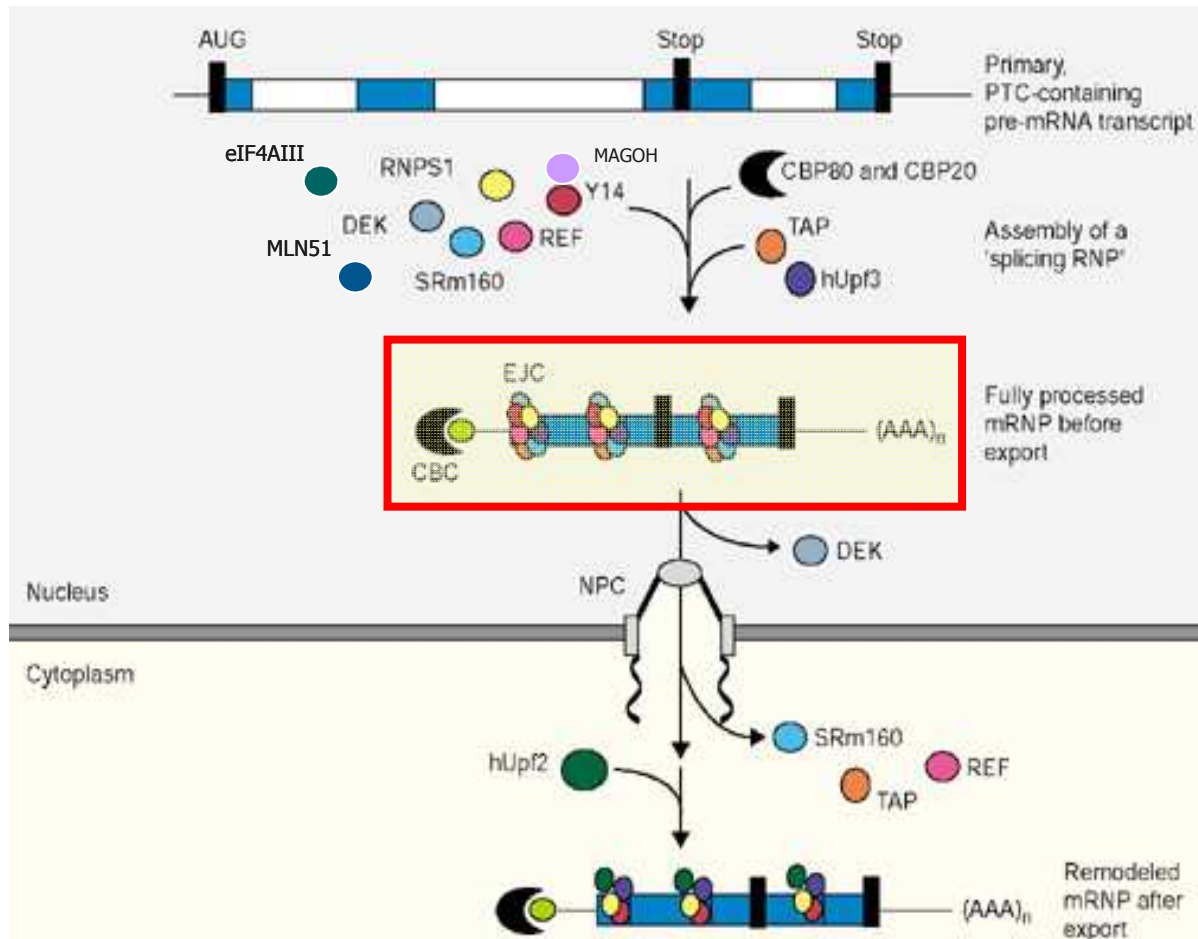
LA STRADA PER LA DEGRADAZIONE

mRNA contenente codone di stop prematuro (PTC)

1. Riconoscimento codone di stop prematuro
2. "Marcatura" e interazione con effettori proteici
3. Isolamento mRNA "marcato"

Degradazione del trascritto aberrante

IL COMPLESSO DI GIUNZIONE ESONICA



Necessario un segnale in *cis* per identificare il codone di stop come prematuro

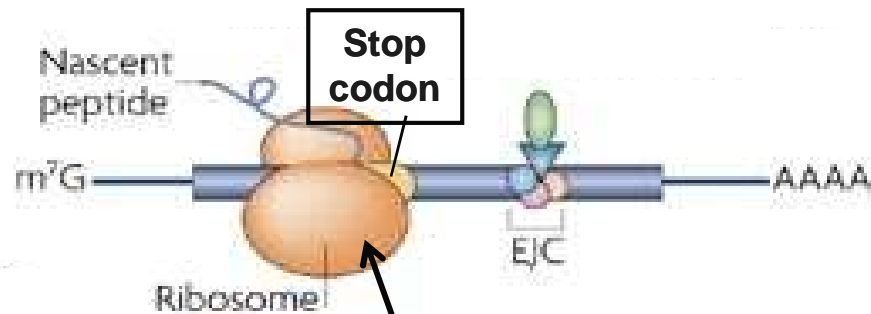


EJC
(Exon-junction complex)

Complesso multiproteico depositato durante lo splicing circa 20-24 nucleotidi a monte di ogni giunzione esone-esone

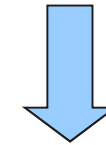
Dipendenza dallo splicing!!

II PIONEER ROUND della traduzione



Ribosoma in stallo a livello
del codone di stop

Passaggio del
ribosoma



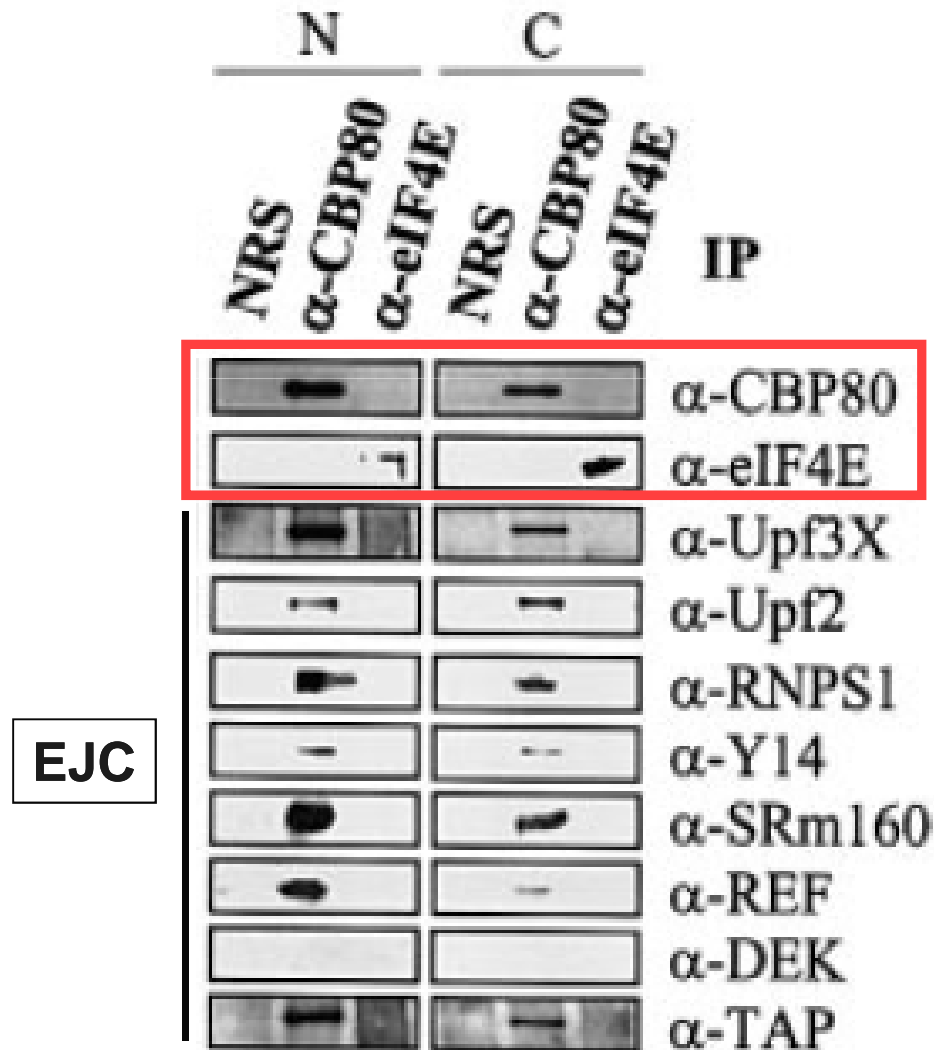
Codone di **stop**
→ stallo del
ribosoma

The “rule”:

Se la distanza tra stop codon e la giunzione esone-
esone successiva è > 55 nt → Stop codon = PTC

Dipendenza dalla traduzione!!

Il complesso di giunzione esonica si localizza sui mRNA citoplasmatici legati a CBP80 (Cap-Binding Protein 80) ma NON sui mRNA legati a eIF4E



Risultato sperimentale:

CBP80 co-immunoprecipita con le proteine componenti l'EJC

LA STRADA PER LA DEGRADAZIONE

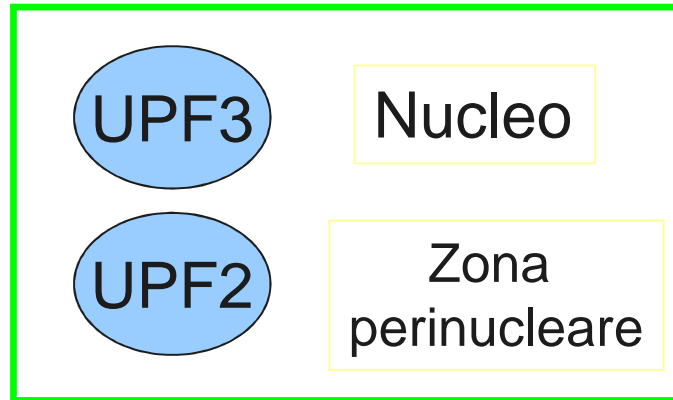
mRNA contenente codone di stop prematuro (PTC)

1. Riconoscimento codone di stop prematuro
2. “Marcatura” e interazione con effettori proteici
3. Isolamento mRNA “marcato”

Degradazione del trascritto aberrante

GLI EJC SONO PIATTAFORME DI LEGAME

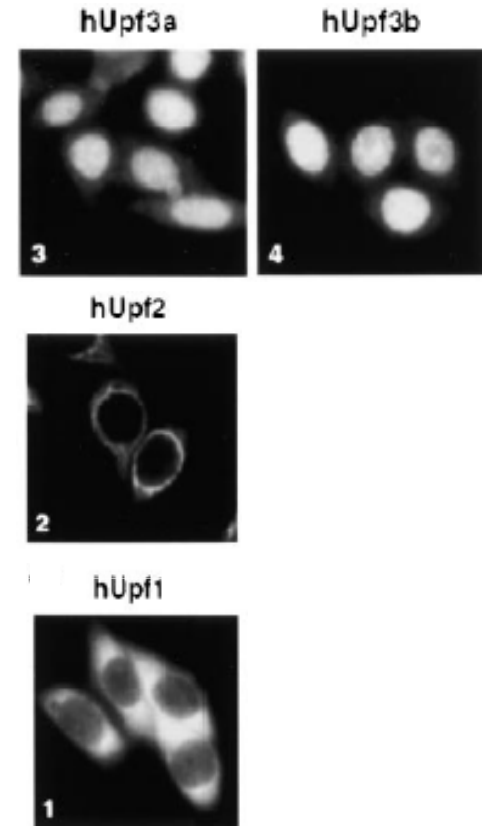
Sequenza di legame



Legati agli EJC in **TUTTI** i trascritti



Fattore **reclutato** indispensabile



Fattori addizionali



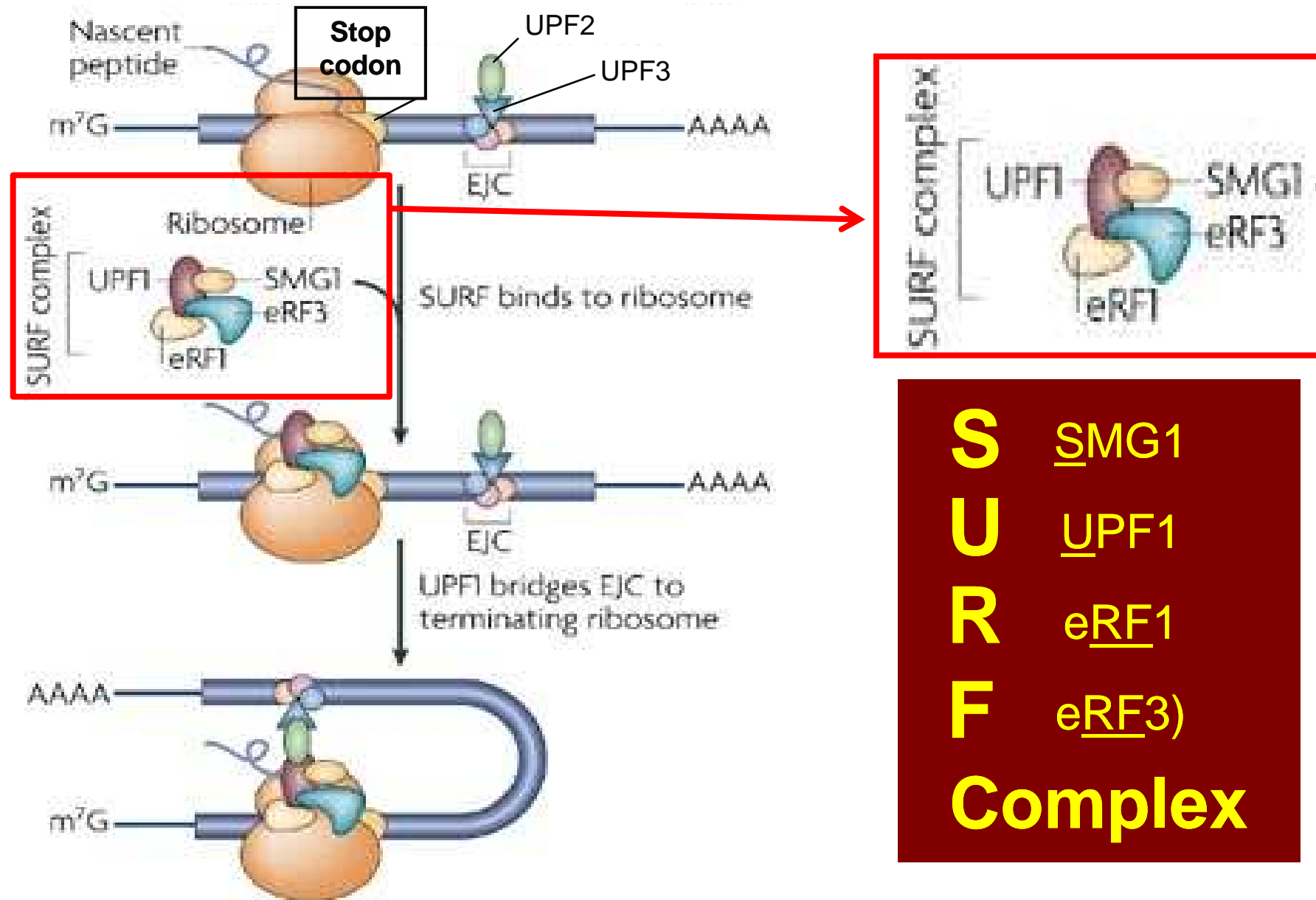
SMG7

SMG5

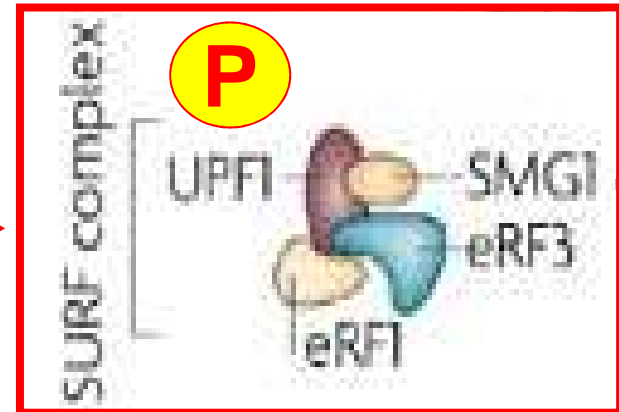
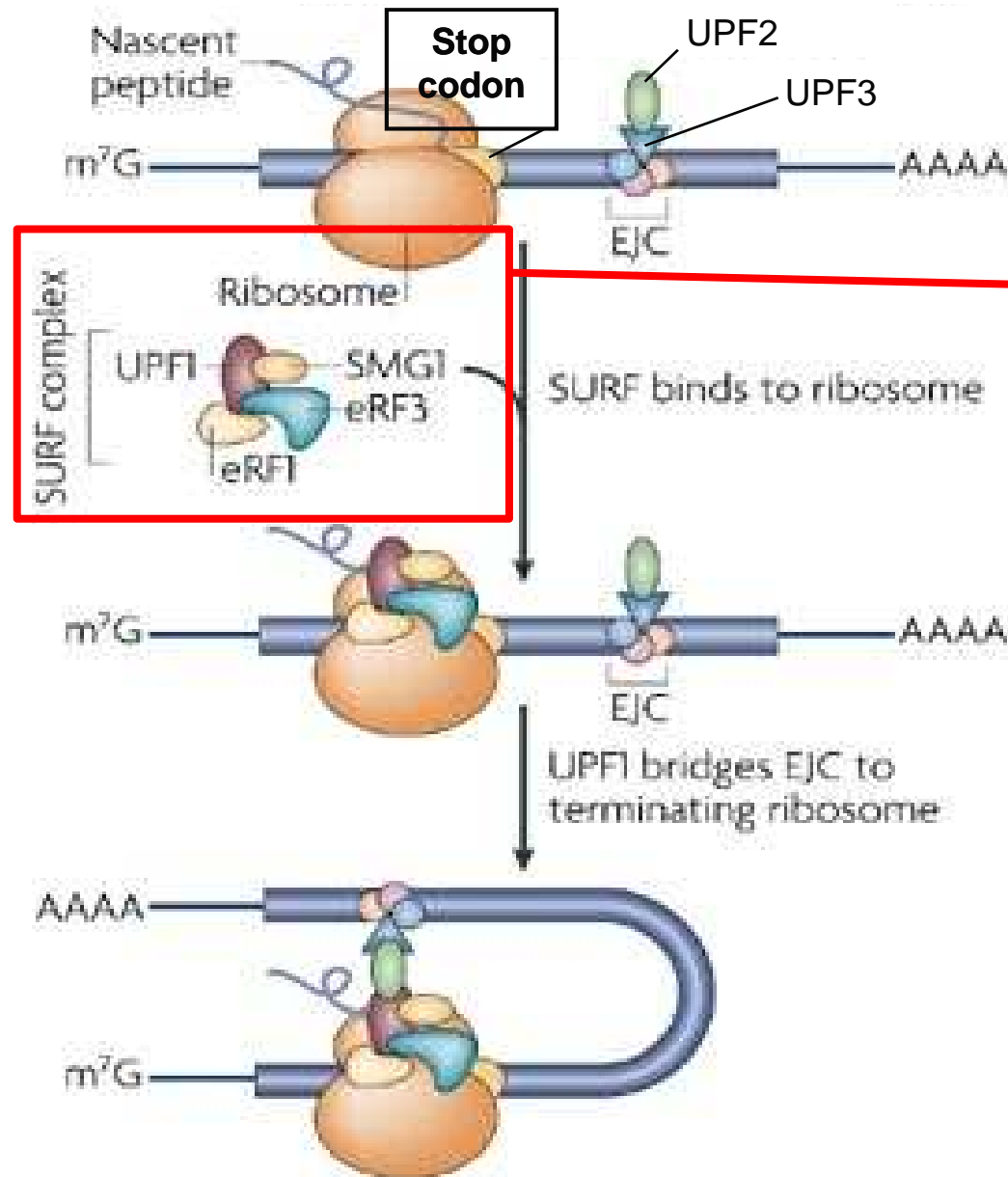
SMG6

Proteine con dominio 14-3-3-like per legare residui fosforilati

IL FATTORE UPF1 VIENE RECLUTATO

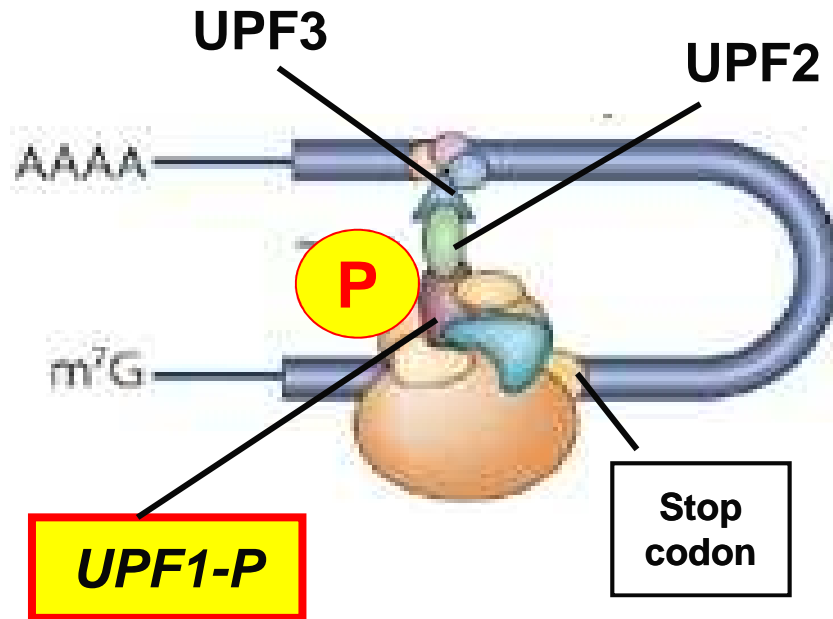


IL FATTORE UPF1 VIENE RECLUTATO



S SMG1
U UPF1
R eRF1
F eRF3
Complex

UPF1 È REGOLATO DA FOSFORILAZIONE E DEFOSFORILAZIONE



Il complesso UPF3:UPF2:UPF1 induce la fosforilazione di UPF1 da parte di SMG1

UPF1-P viene riconosciuto dalle proteine SMG 14-3-3-like

mRNA decay
(degradazione del messaggero)

+ Riciclo di UPF1 e dei fattori coinvolti

LA STRADA PER LA DEGRADAZIONE

mRNA contenente codone di stop prematuro (PTC)

1. Riconoscimento codone di stop prematuro
2. "Marcatura" e interazione con effettori proteici
3. Isolamento mRNA "marcato"

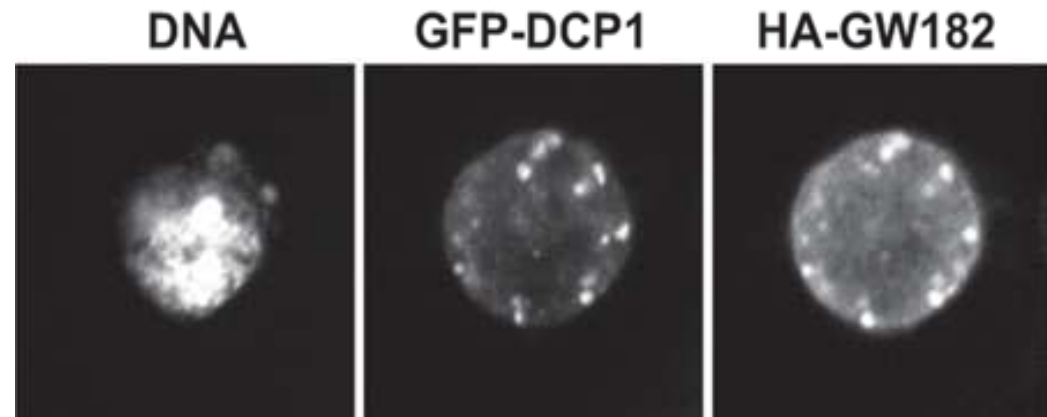
Degradazione del trascritto aberrante

P-bodies (mRNA-processing bodies)

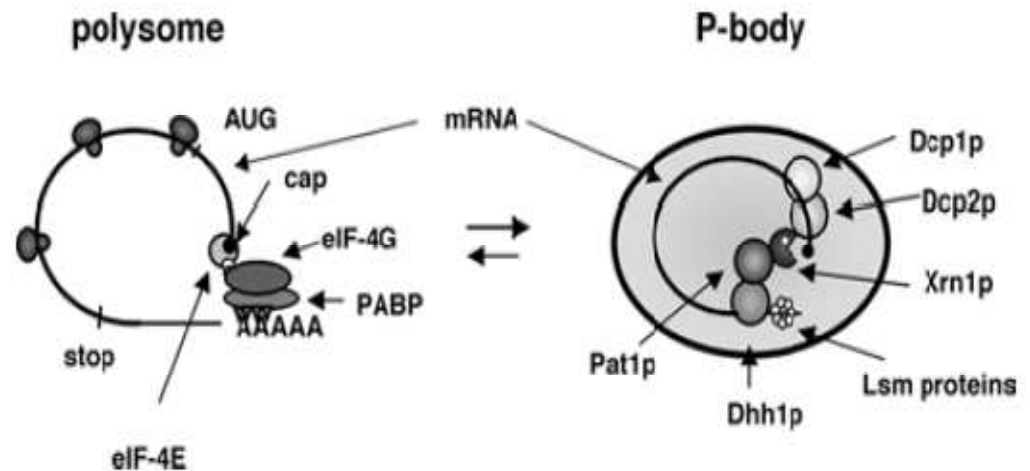
Detti anche “mRNA-decay foci”, “DCP bodies” o “GW bodies”

Regioni citoplasmatiche specializzate ricche in enzimi degradativi quali XRN1, DCP1, DCP2 e Lsm1-7

Funzione di stoccaggio, repressione o degradazione
→ gli mRNA possono rientrare nel pool citoplasmatico



The image shows the co-localisation of the mRNA decapping protein DCP1 with the GW182 antigen, a P-body marker in multicellular organisms.



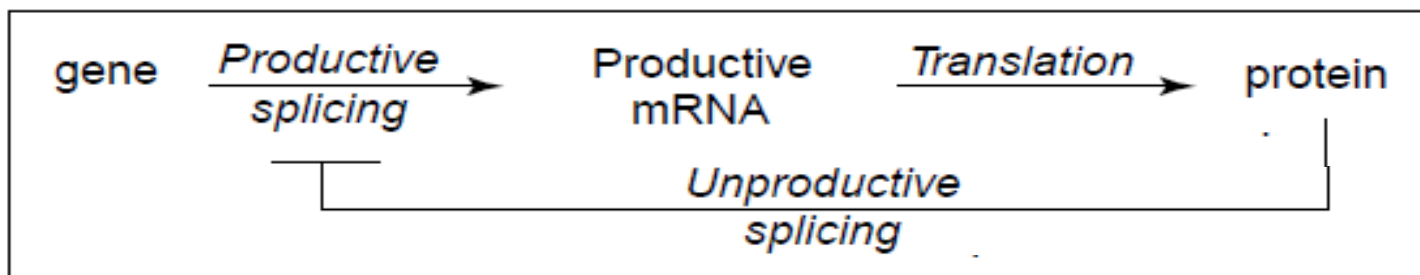
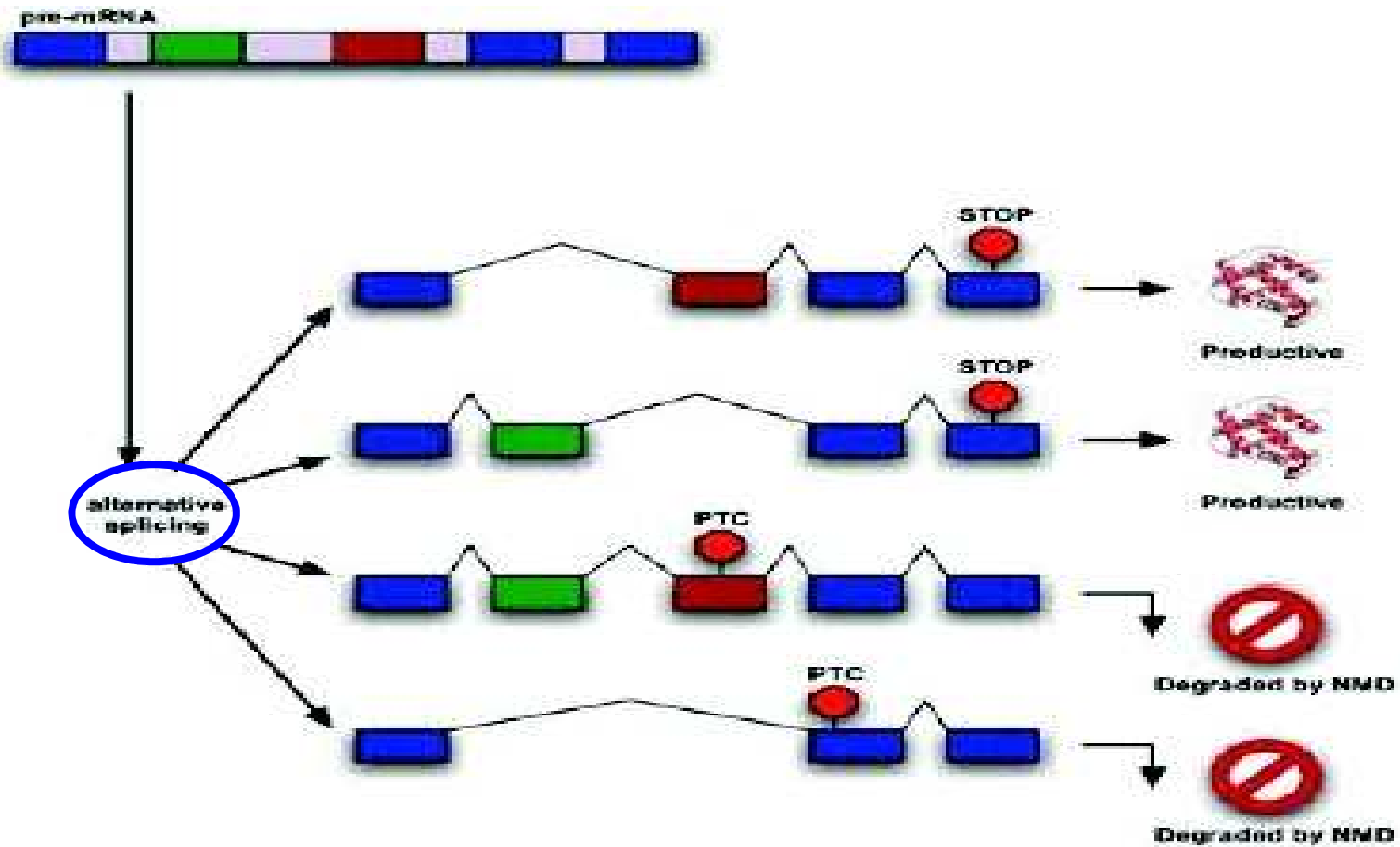
LA STRADA PER LA DEGRADAZIONE

mRNA contenente codone di stop prematuro (PTC)

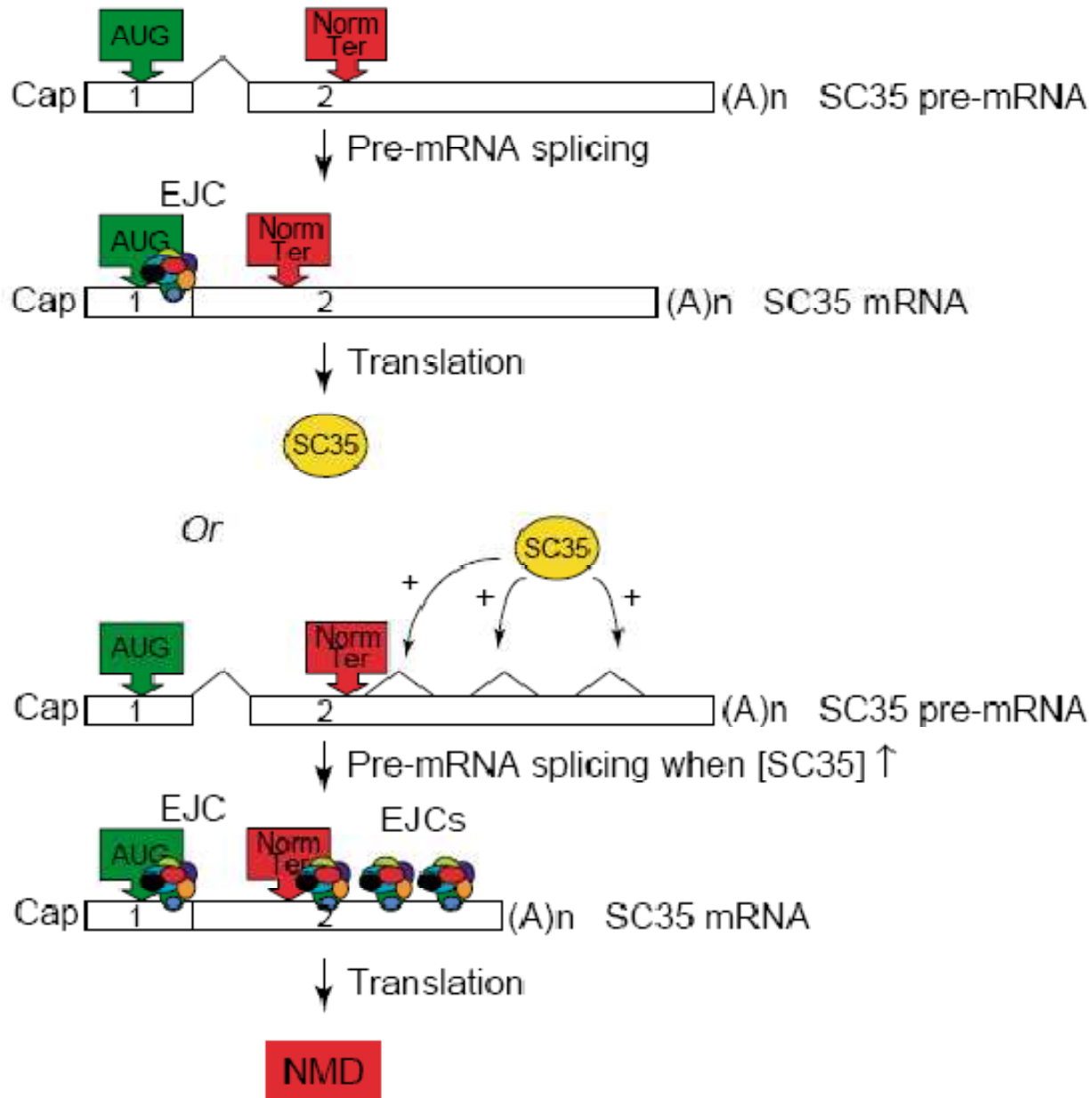
1. Riconoscimento codone di stop prematuro
RUOLO MEDIATO DA EJC
2. “Marcatura” e interazione con effettori proteici
PROTEINE UPF E SMG
3. Isolamento mRNA “marcato”
LOCALIZZAZIONE NEI P-BODIES

Degradazione del trascritto aberrante

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA



REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA



INTRON ACTIVATION

Autoregolazione da parte di SC35

Induzione splicing nel 3'-UTR e deposizione EJCs

Stop codon = PTC

NMD

CONCLUSIONI (2)

- Rappresenta un meccanismo di controllo splicing- e traduzione-dipendente che si trova all'interfaccia tra esportazione del messaggero e traduzione
- È coinvolto nella regolazione dell'espressione genica mediante eliminazione di mRNA aventi codoni di stop prematuri introdotti da eventi di splicing alternativo (es. exon skipping/inclusion)