Compattamento del DNA:
Cromosomi
Cromatina
Telomeri e centromero

Già visto nel primo CFU

Organizzazione dei genomi:

Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

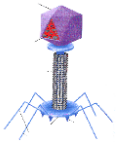
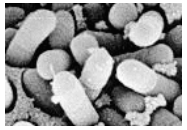
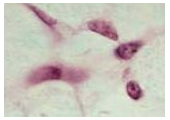
DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

Argomento di oggi

Dott.ssa Ilaria Bononi

ORGANIZZAZIONE SUPERELICOIDALE DEL DNA: I CROMOSOMI

Discrepanza tra la lunghezza del DNA di una cellula e lo spazio estremamente limitato in cui tale DNA deve essere accolto:

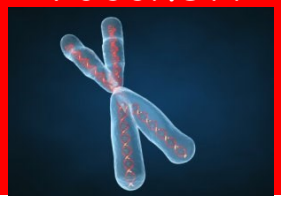
Cellula	Dimensioni del materiale genetico (mm)	Dimensioni della cellula (mm)	Riduzione
Batteriofago T4 	0,06	0,00008	ridotto di 750 volte
Escherichia coli 	1	0,004	250 volte più lungo della cellula che lo contiene
Nucleo di una cellula aploide umana 	3×10^9 nucleotidi (in forma completamente distesa: 1,7 metri = 1700 mm)	0,005	350.000 volte superiore al diametro del suo contenitore

ORGANIZZAZIONE SUPERELICOIDALE DEL DNA: I CROMOSOMI

La superspiralizzazione della doppia elica intorno al proprio asse è la soluzione universalmente adottata per concentrare il materiale genetico in un volume relativamente limitato

Le strutture tridimensionali, di diversa grandezza e complessità, generate dalla organizzazione superelicoidale della doppia elica e/o dalla associazione del DNA con proteine che fungono da "rocchetti" di avvolgimento della doppia elica, sono definite

CROMOSOMI

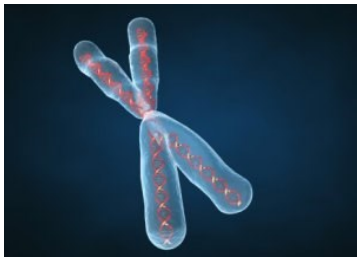


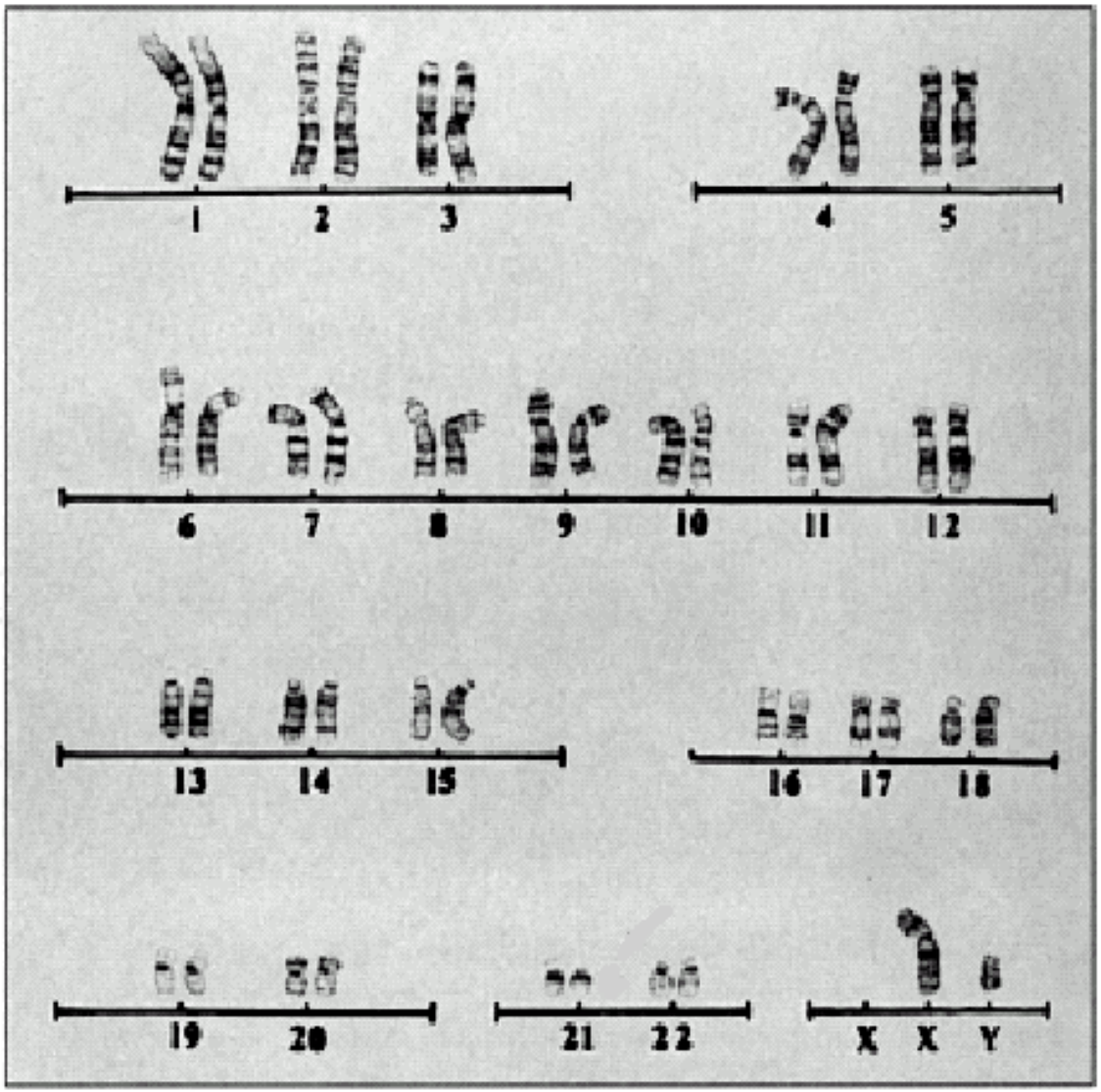
1. Cellule procariotiche e organelli citoplasmatici delle cellule eucariotiche (mitocondri, cloroplasti) hanno **un singolo cromosoma**

2. Le cellule procariote possono contenere, oltre al cromosoma principale, una o più copie di piccoli cromosomi accessori definiti **plasmidi** che sono implicati nei fenomeni di resistenza agli antibiotici e di sessualità

3. Il patrimonio genetico delle cellule eucariotiche è ripartito in un numero definito e costante di cromosomi uguali a due a due, detto **numero cromosomico diploide**

I cromosomi umani. Il cariogramma

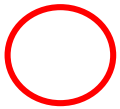


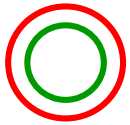


L'organizzazione superelicoidale del DNA: i cromosomi

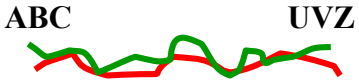
Il DNA dei cromosomi dei virus e dei plasmidi

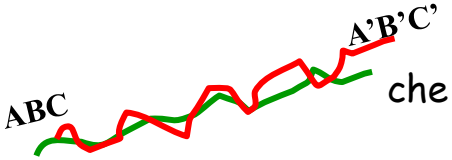
I cromosomi virali hanno una notevole eterogeneità per quanto riguarda forma e dimensioni del DNA. In rapporto alla forma del DNA i cromosomi possono essere distinti in alcune classi principali:

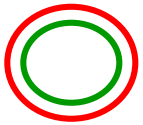
1. Cromosomi circolari a filamento unico  dove gli estremi 5' e 3' sono saldati covalentemente.

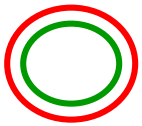
2. Cromosomi circolari a doppia elica  in cui le estremità 5' e 3' di ciascuno dei due filamenti sono saldate ad anello chiuso.

3. Cromosomi lineari a filamento unico

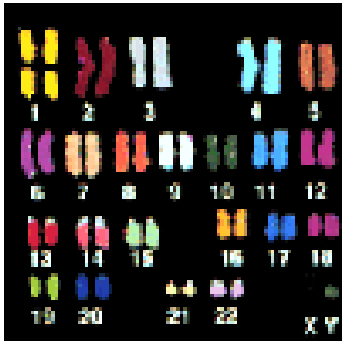
4. Cromosomi lineari a doppia elica ad estremità tronche 

5. Cromosomi lineari a doppia elica ad estremità coesive  che possono circolarizzare

Il DNA dei cromosomi batterici  circolari a doppia elica

Il DNA dei cromosomi mitocondriali e cloroplastici 
circolari a doppia elica

Il DNA dei cromosomi degli eucarioti
numero definito e costante di cromosomi uguali a due a due, detto **numero cromosomico diploide**



Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centomero

Organizzazione dei genomi:

Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

Cromatina

Il complesso tra DNA eucariotico e proteine si chiama cromatina.

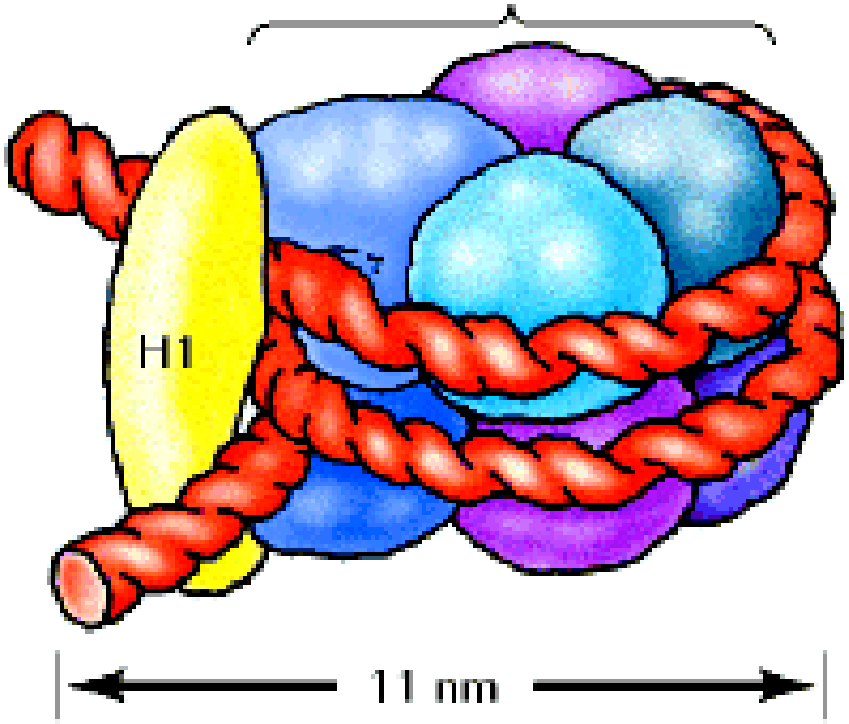
Le proteine principali della cromatina sono gli istoni.

1. H1
2. H2A
3. H2B
4. H3
5. H4

Alta % di aminoacidi basici, Lys e Arg: facilitano il legame alla molecola di DNA carica negativamente

Legami tra DNA e istoni: idrogeno, ionico, forze di Van der Waals.

Cromatina

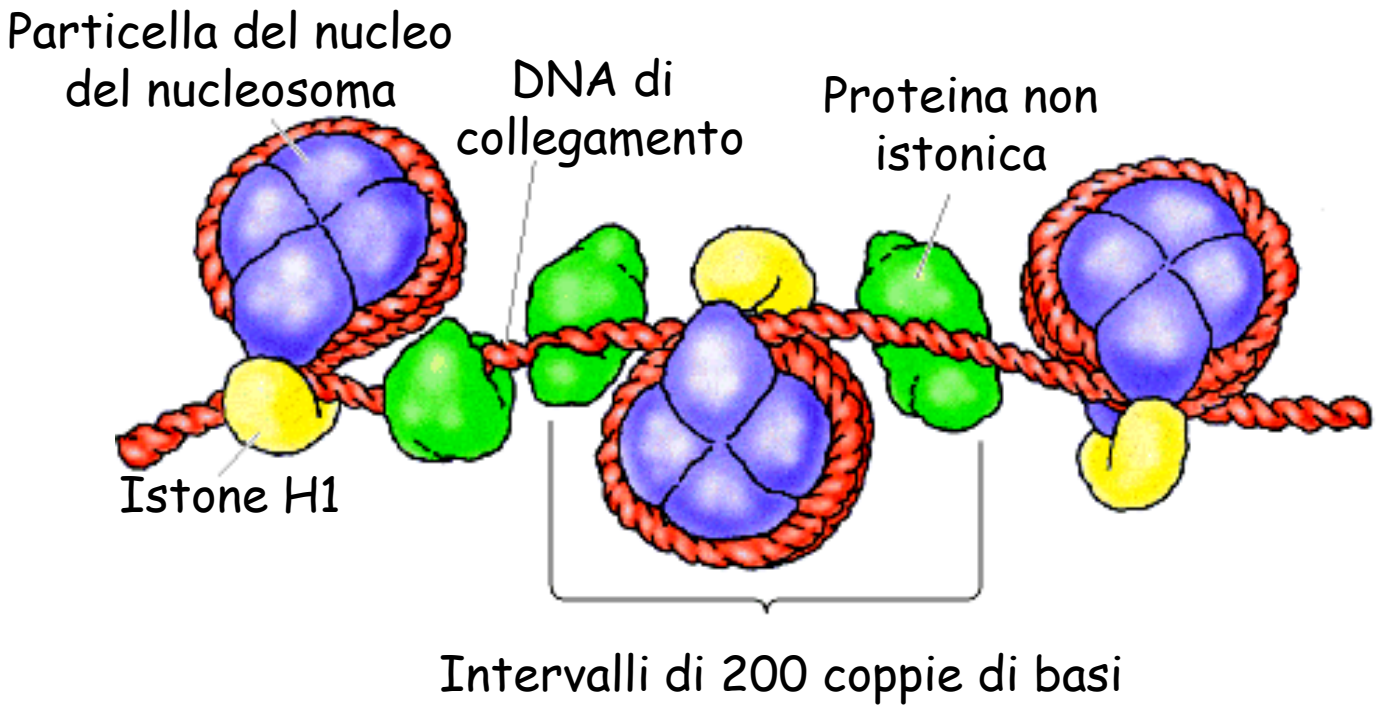


Nucleosoma: L'unità strutturale base della cromatina:
2 X H2A
2 X H2B
2 X H3
2 X H4
Su questo ottamero di proteine istoniche si avvolgono 146 pb di DNA (1,75 volte)

Cromatosoma: Nucleosoma + una molecola di istone H1 che tiene bloccati in posizione due giri completi di DNA (166 pb) sul nucleosoma

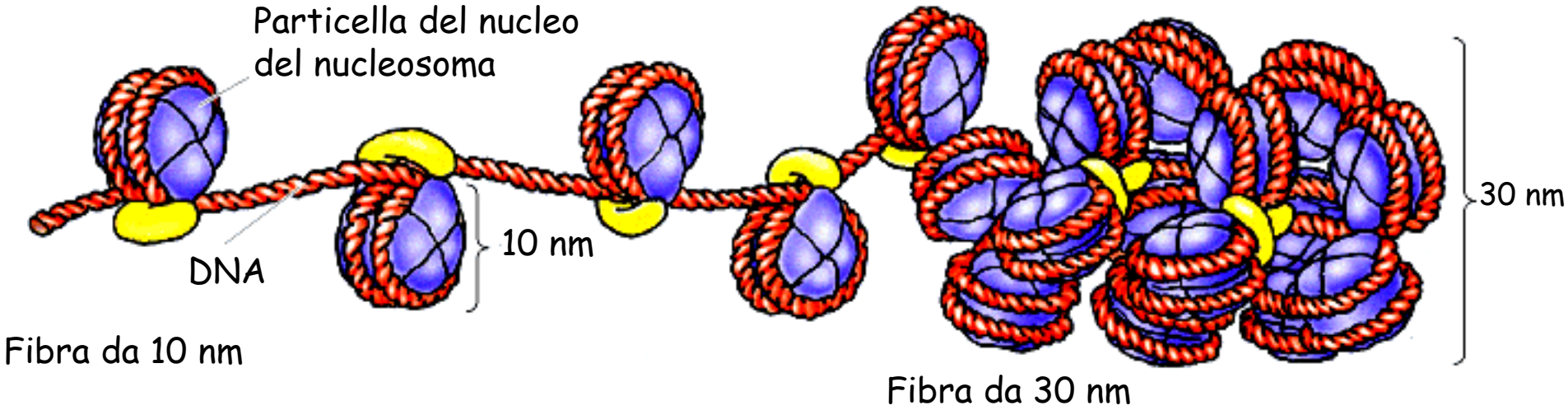
Cromatina

Il DNA è avvolto intorno agli istoni a formare i nucleosomi e sigillato dall'istone H1. **Proteine non istoniche** si legano al DNA di collegamento fra le particelle del nucleo dei nucleosomi. Infatti la cromatina contiene una massa approssimativamente uguale di una varietà di proteine cromosomiche non istoniche. Esistono più di mille tipi diversi di queste proteine, che sono coinvolte in un gamma di attività, comprese **replicazione** del DNA ed **espressione** del gene



Cromatina

La cromatina può poi essere ulteriormente condensata da un avvolgimento in fibre di 30 nm la cui struttura rimane ancora da determinare.



Le fibre di cromatina da 30 nm contengono circa 6 nucleosomi per giro.

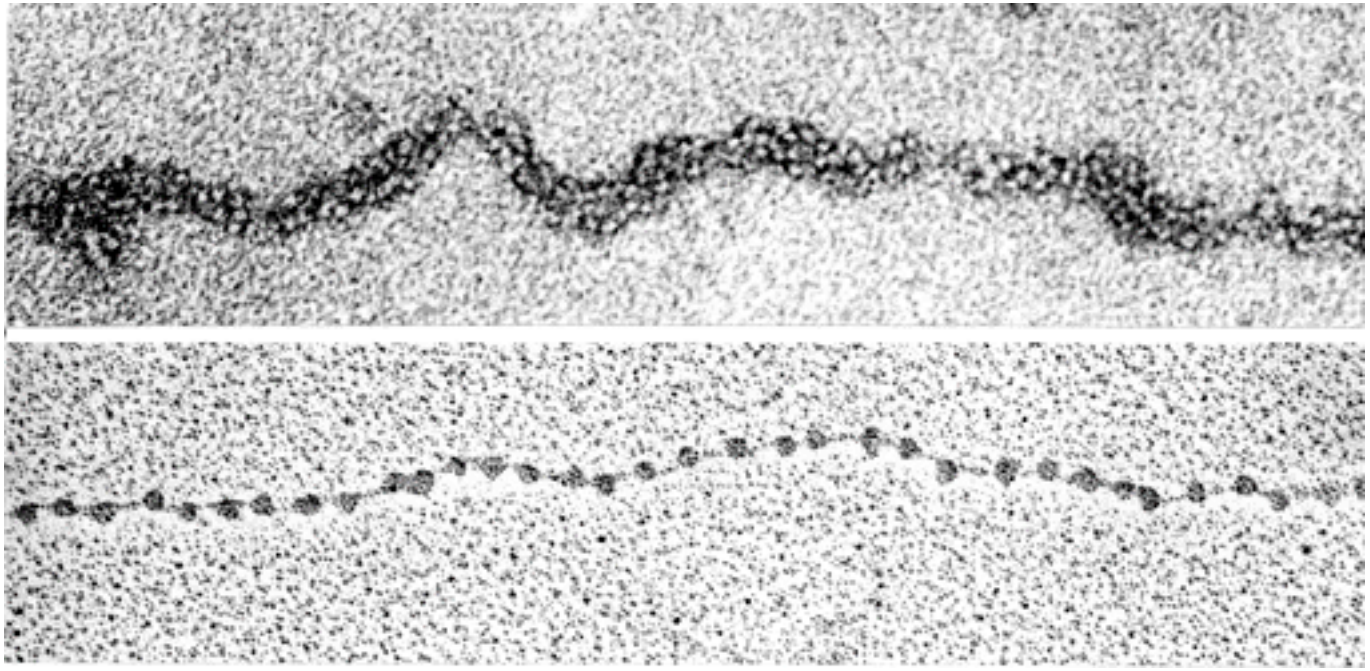
Cromatina

Fotografie al microscopio elettronico delle fibre di cromatina da 30 nm e da 10 nm.

M.E.

30 nm

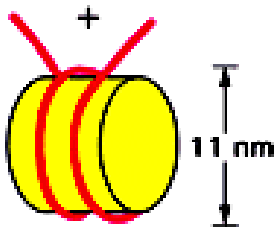
10 nm



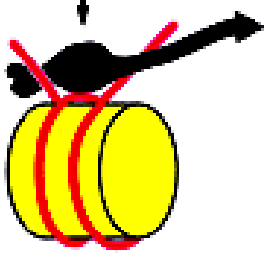
Cromatina

Istone H1

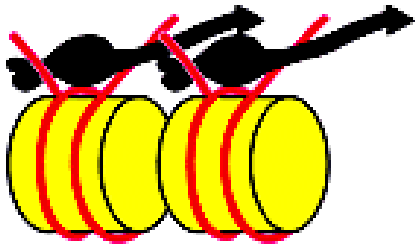
Le interazioni fra le molecole dell'istone H1 sembrano importanti per il compattamento della cromatina a fibra di 30 nm.

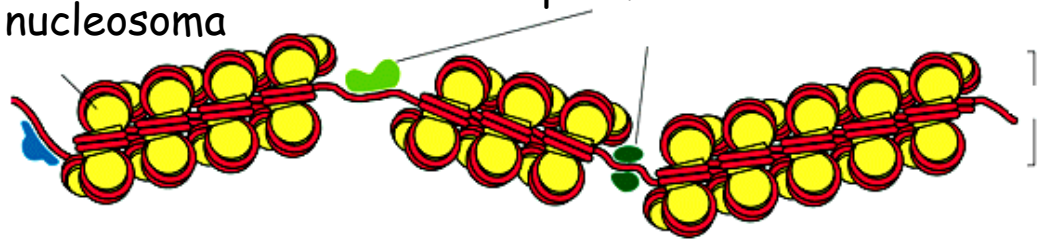


H1 si lega a regioni specifiche del nucleosoma



I nucleosomi sono compattati





Cromatina e cromosomi

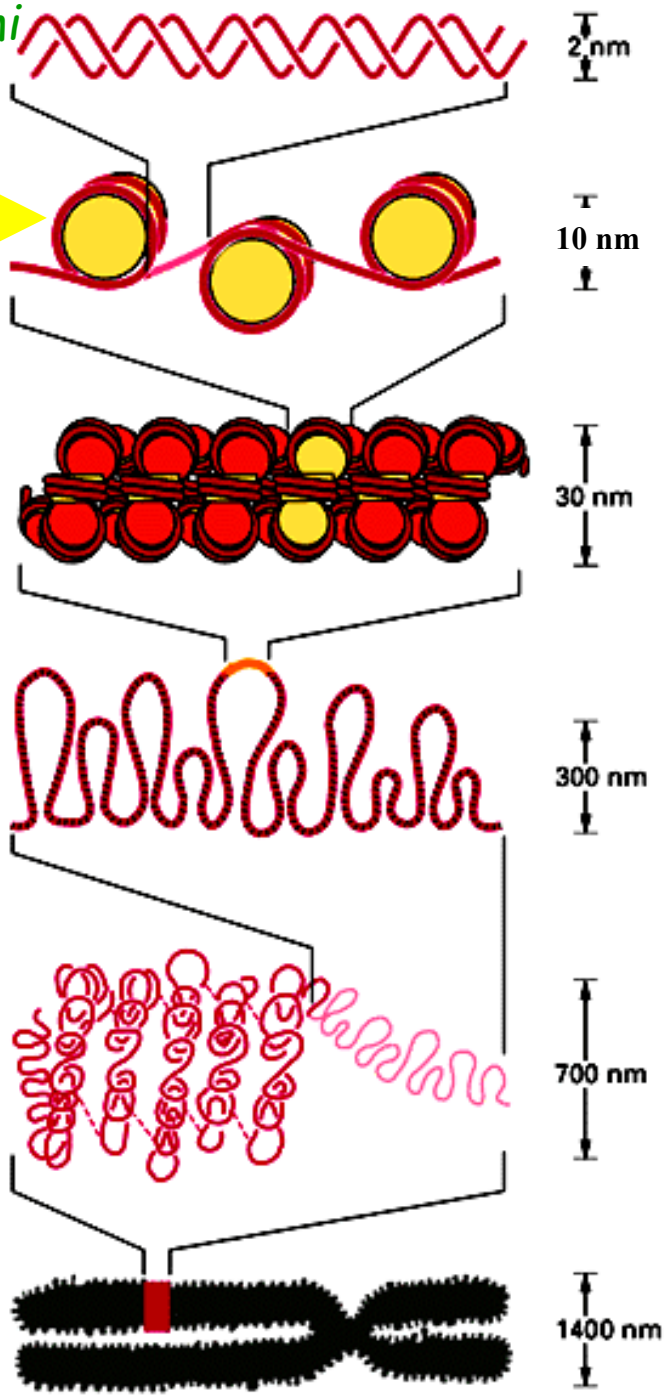
Il grado di condensazione della cromatina varia durante il ciclo vitale della cellula. In cellule in interfase:

Eucromatina

- la maggior parte della cromatina (ca. 90%)
- relativamente decondensata e distribuita in tutto il nucleo
- sotto forma di fibre da 30 nm organizzate in grandi anse (80%)
    - Circa il 10% della eucromatina, contenente i geni che sono trascritti attivamente, è in uno stato più decondensato che permette la trascrizione: struttura di 10 nm

Eterocromatina

- Circa il 10% della cromatina interfasica
- stato molto condensato che assomiglia alla cromatina delle cellule che attraversano la mitosi
- è inattiva dal punto di vista della trascrizione
- contiene sequenze di DNA altamente ripetuto, come quelle presenti in centromeri e telomeri.



Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centromero

Organizzazione dei genomi:

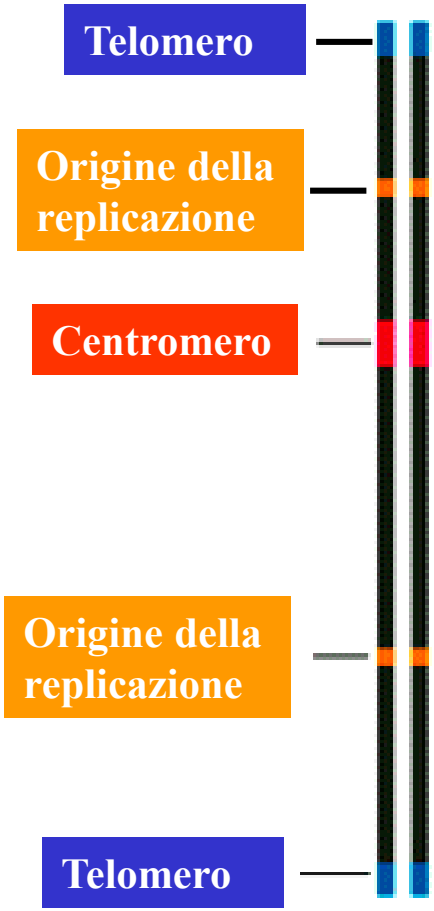
Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

I cromosomi umani: I telomeri

3 sono gli elementi che devono esserci nella sequenza del DNA perché il cromosoma eucariotico possa replicarsi e poi segregare alla mitosi:

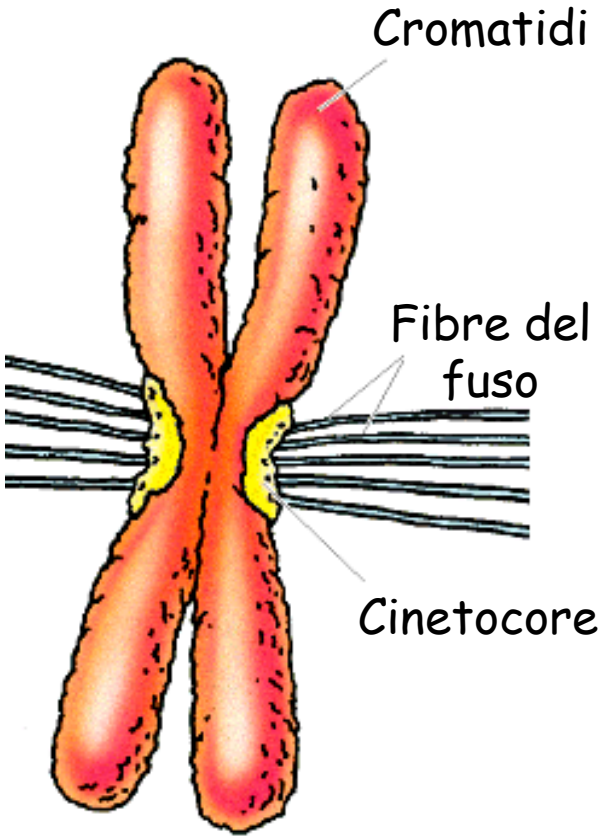


1. **Origini di replicazione multiple:** dalle quali, durante l'interfase, inizia la replicazione del DNA in entrambe le direzioni
2. **1 Centromero:** sito di attacco per i microtubuli del fuso
3. **2 Telomeri:** cappucci che chiudono il cromosoma alle sue estremità. Contengono sequenze ripetitive che servono a replicare le estremità cromosomiche e anche a proteggerle, evitando che siano scambiate per monconi di cromosomi rotti, che la cellula deve riparare.

- Necessari per la replicazione delle estremità delle molecole lineari di DNA
- Seq telomeriche di molti eucarioti sono simili fra loro
- Consistono di ripetizioni di DNA a semplice sequenza
- Nell'uomo la sequenza ripetuta è <u>AGGGTT</u>

I cromosomi umani. I centromeri

Il centromero è una regione specializzata del cromosoma che ha un ruolo cruciale nell'assicurare la distribuzione corretta dei cromosomi duplicati alle cellule figlie durante la mitosi



I centromeri:

1) sito di associazione dei cromatidi fratelli

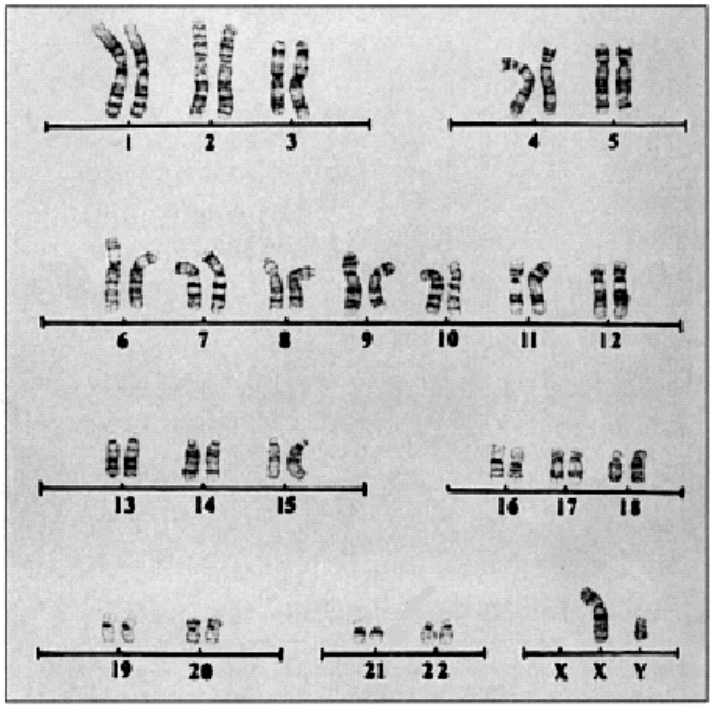
2) sito di attacco per i microtubuli del fuso mitotico

3) proteine specifiche si attaccano al DNA centromerico, formando il cinetocore, che è il sito di attacco delle fibre del fuso

I centromeri sono costituiti da estese regioni di eterocromatina che consistono di sequenze di DNA satellite altamente ripetitive

I cromosomi umani. Il cariogramma

I cromosomi metafasici sono così condensati che la loro morfologia può essere studiata usando il microscopio ottico.



Tecniche di colorazione:

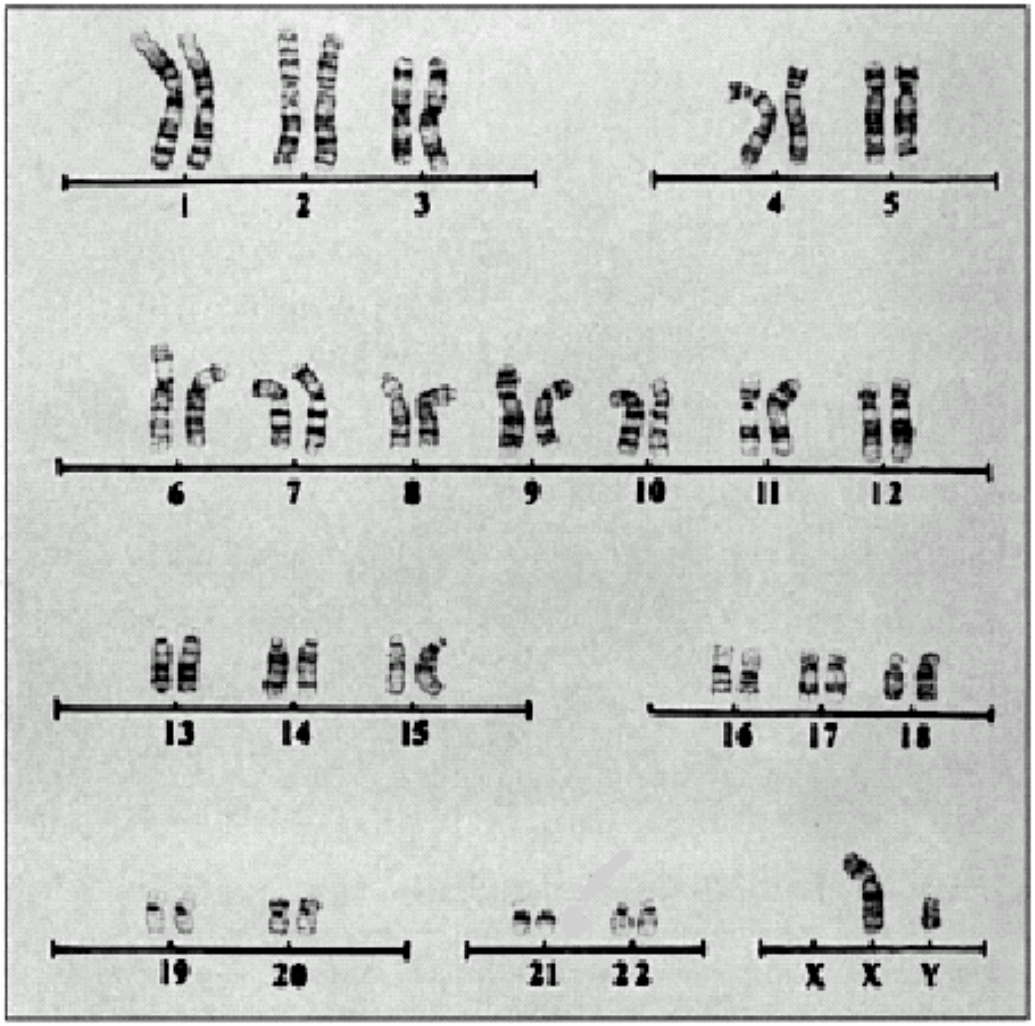
coloranti che distinguono tra il DNA ricco di coppie AT da quello ricco in copie CG

producono una figura di bandeggio evidente e affidabile su ciascun cromosoma

La disposizione delle bande caratterizza ogni cromosoma in modo univoco permettendo di identificarlo e numerarlo

I cromosomi umani. Il cariogramma

I cromosomi metafasici sono così condensati che la loro morfologia può essere studiata usando il microscopio ottico.



Cariotipo: L'immagine del corredo completo dei 46 cromosomi umani

Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centomero

Organizzazione dei genomi:

Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

L'organizzazione dei genomi cellulari

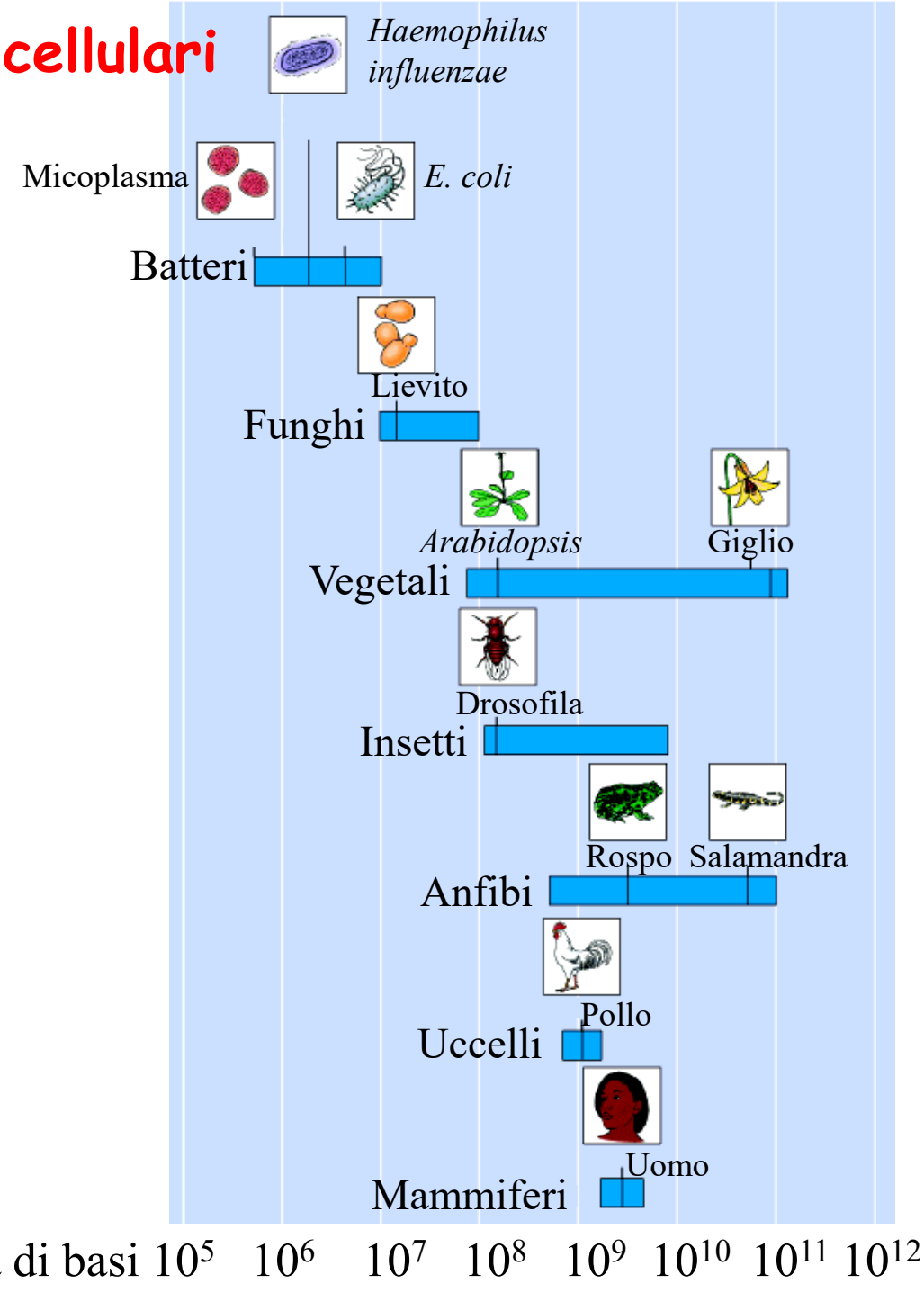
Eucarioti: genomi più grandi e più complessi

Dimensioni dei genomi eucariotici: non correlate alla complessità genetica (es. giglio e salamandra)

Grande quantità di DNA che non codifica per proteine:

1. Sequenze spaziatrici
2. Introni
3. Sequenze di DNA ripetitivo

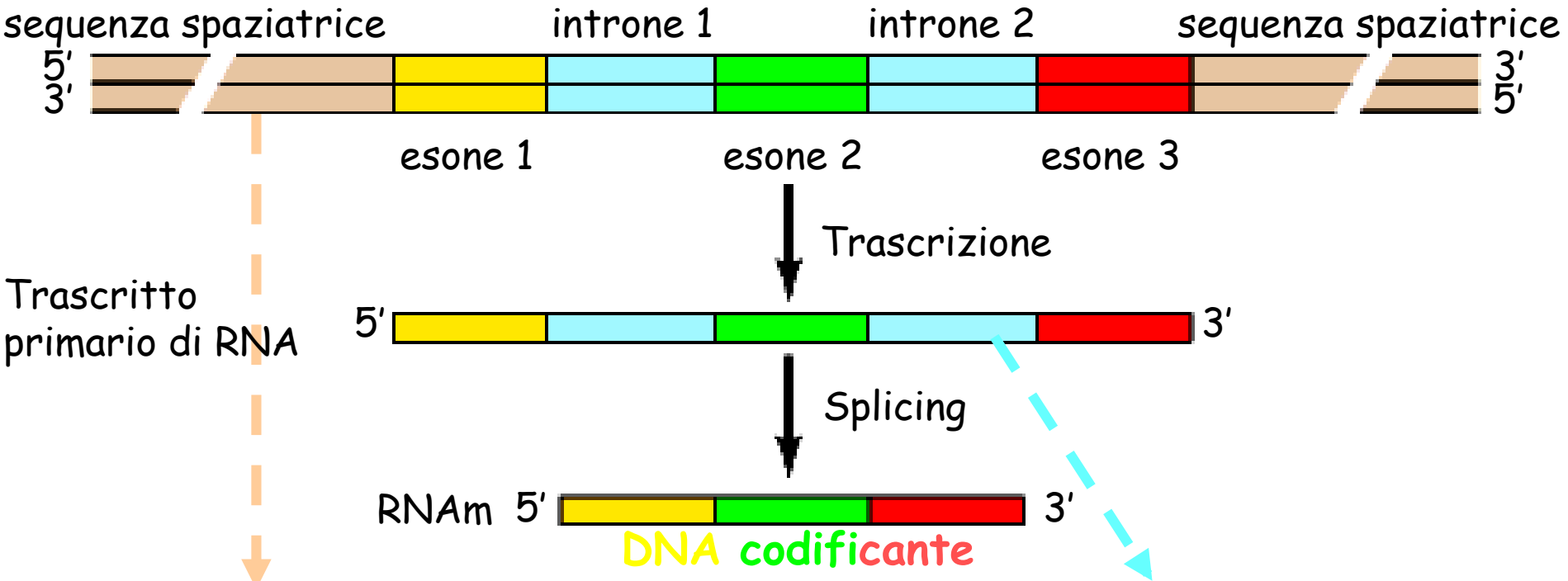
Famiglie geniche



Geni = sequenze uniche

Gene: segmento di DNA che è espresso per produrre un prodotto funzionante (RNA o polipeptide)

Introni ed esoni



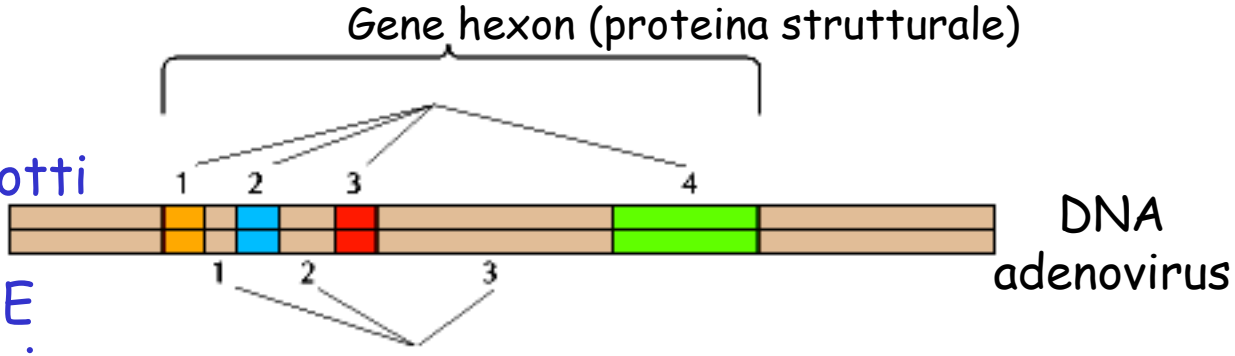
Sequenze spaziatrici: lunghe sequenze di DNA che si trovano fra i geni

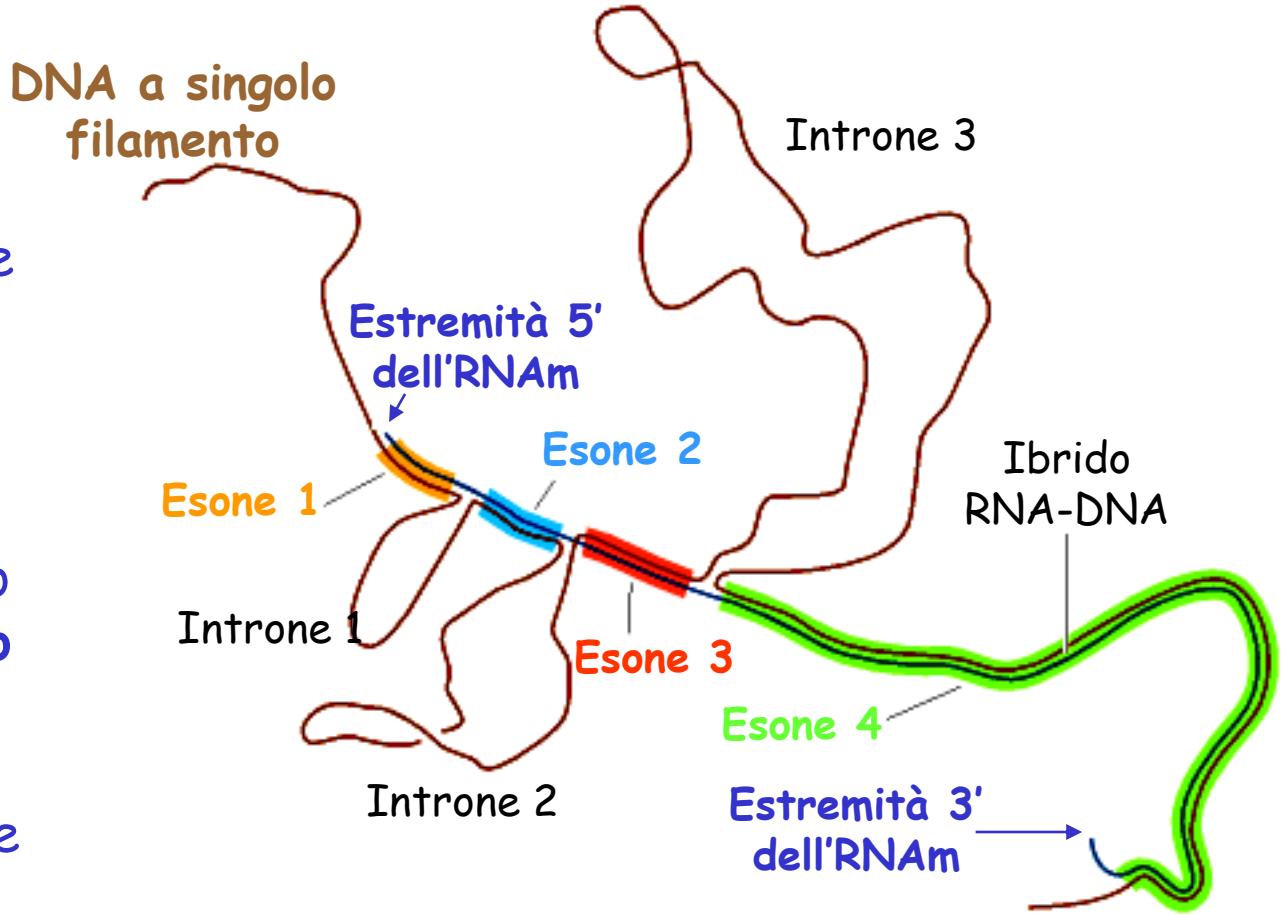
Introni: sequenze non codificanti che si trovano all'interno della maggior parte dei geni eucariotici

DNA non codificante

La scoperta degli introni, 1977

P. Sharp e R Roberts
Adenovirus: genoma piccolo ed RNAm prodotti in alta quantità
Ibridi **RNA-DNA** al ME
Det le posizioni dei geni virali esaminando ibridi DNA-RNA al ME.
Una singola molecola di RNA ibrida con numerose regioni separate del genoma virale. Quindi, l'mRNA non corrisponde ad un trascritto ininterrotto dello stampo di DNA, ma è **assemblato da parecchi blocchi distinti di sequenza** che originano da parti diverse del DNA virale



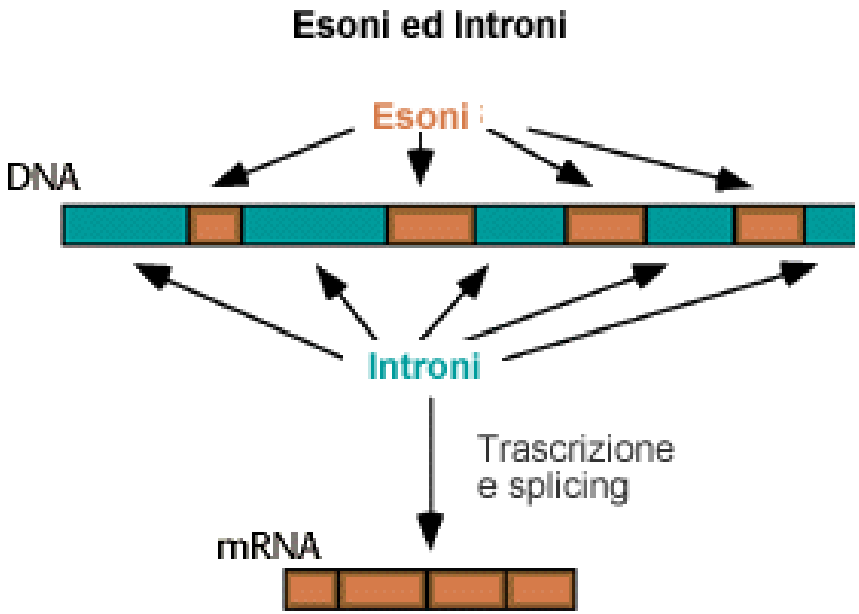


Il significato degli introni

- Struttura esone-introne di molti geni eucariotici è molto **complicata**

- La quantità di DNA nelle **seq introniche è spesso maggiore** di quella degli esoni

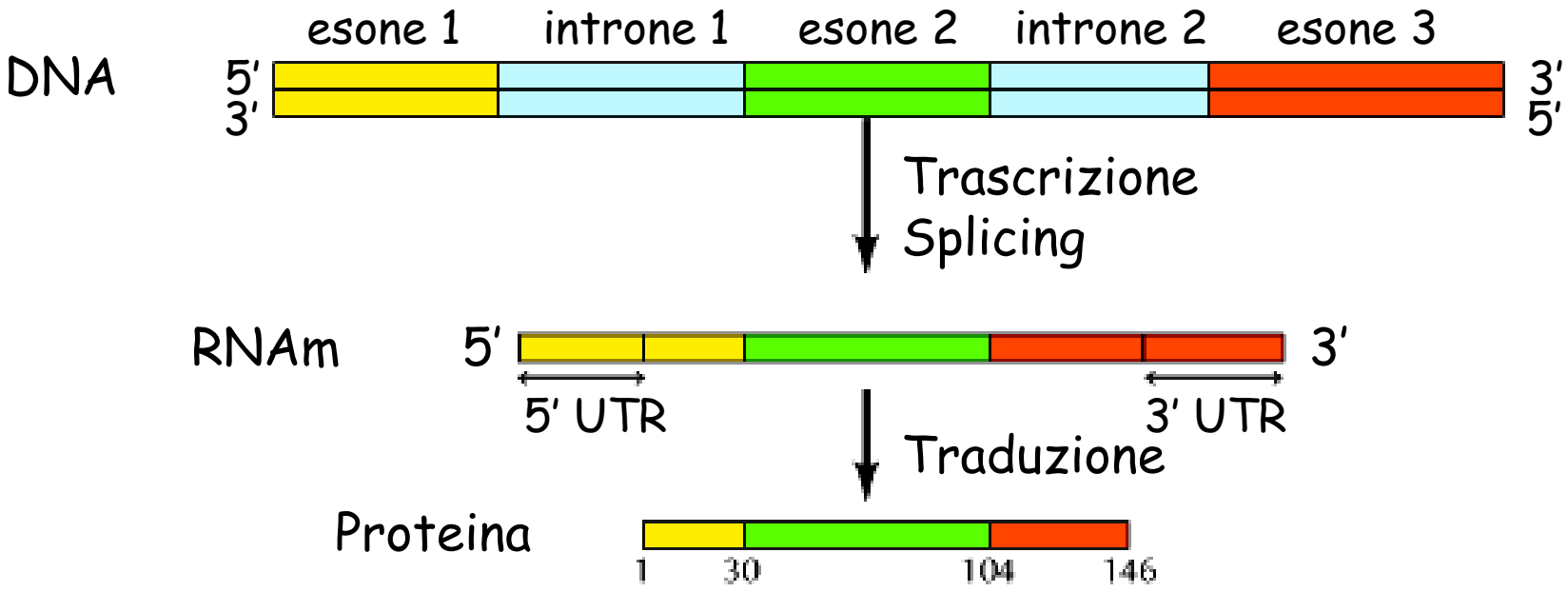
- Gli introni occupano circa **10 volte** più DNA degli esoni negli eucariot



Il significato degli introni

- Nella maggior parte degli **eucarioti complessi** (non in eucarioti semplici, es lieviti)

- **Non** sono necessari per la funzione dei geni nelle cellule eucariotiche



- Si pensa che siano ciò che rimane di sequenze che avevano avuto importanza nell'**evoluzione**
- Ipotesi: **Rimescolamento degli esoni**: potrebbero avere aiutato ad accelerare l'evoluzione facilitando la ricombinazione fra esoni di geni diversi
- E' infatti stato dimostrato che alcuni geni sono delle **chimere di esoni** derivati da parecchi altri geni

Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centromero

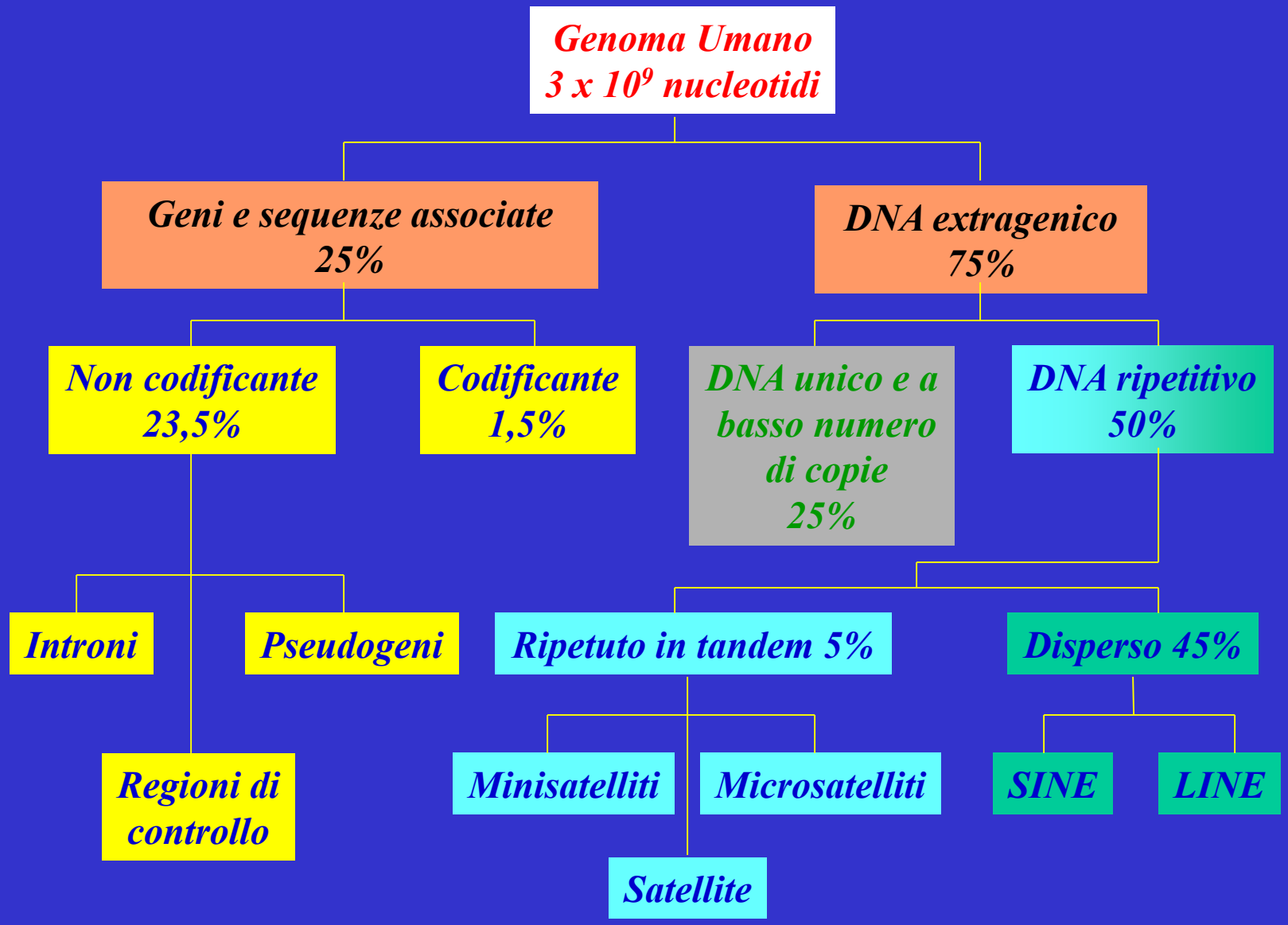
Organizzazione dei genomi:

Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

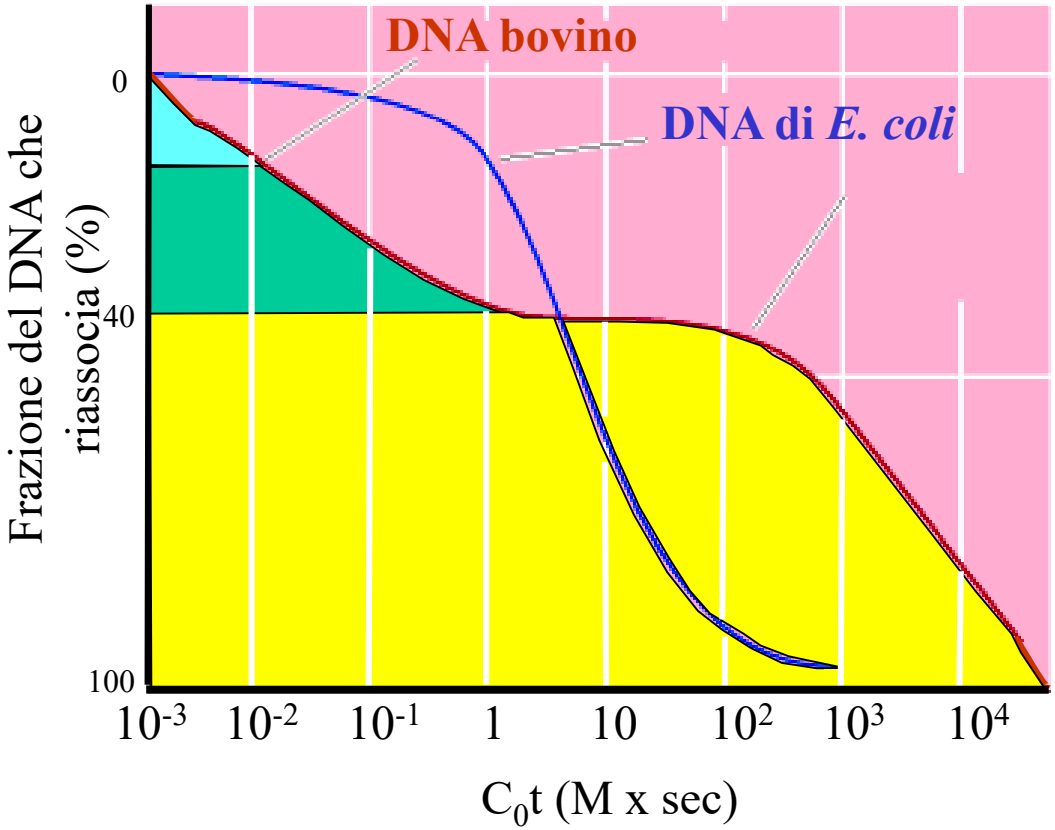
DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

Struttura dei genomi



Sequenze di DNA ripetitivo

Una porzione sostanziale dei genomi eucariotici consiste di <u>sequenze altamente ripetute non codificanti</u> (fino a centinaia di migliaia di copie per genoma)
Dimostrate mediante studi della velocità di riassociazione di frammenti denaturati di DNA cellulari.



Il DNA totale di vitello può essere suddiviso in 3 frazioni in base alla velocità di riassociazione:

1. Sequenze semplici
2. Seq Ripetute interperse
3. DNA a singola copia

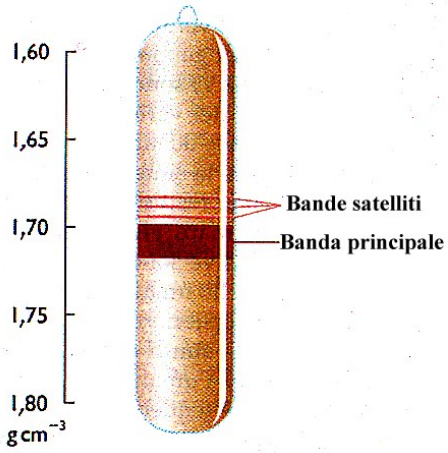
Sequenze di DNA ripetitivo:

1. Sequenze semplici o DNA satellite

Serie in tandem di migliaia di copie di brevi sequenze

Satellite

Unità da 5 a 200 bp
Segmenti lunghi fino a qualche centinaio di kb



Minisatelliti

Unità da 6 a 50 bp
Segmenti lunghi fino a 25 kb

Microsatelliti

Unità da 1 a 5 bp
Segmenti lunghi fino150 pb

5'-CACACACACACA-3'

Sequenze di DNA ripetitivo:

1. Sequenze semplici o DNA satellite

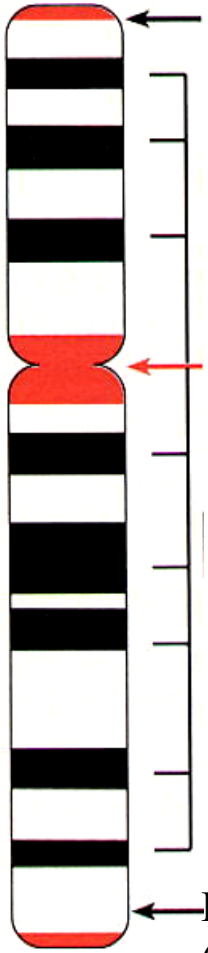
a) DNA satellite: seq lunghe (50-200)

b) DNA minisatellite: seq medie (6-50)

c) DNA microsatellite: seq corte (1-50)

<u>Nessun DNA satellite viene trascritto</u>

Queste sequenze in totale occupano il 10% del DNA ripetitivo.



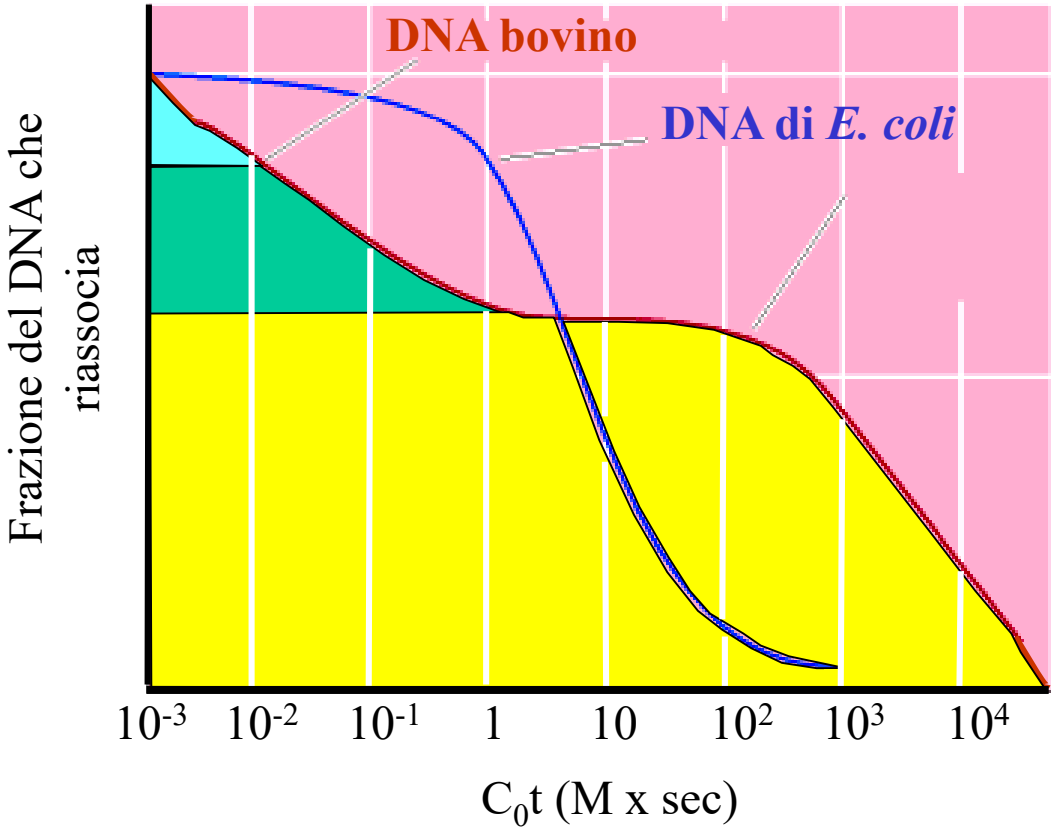
Telomero (unità ripetute in tandem del minisatellite AGGGTT). Lunghezza di diverse kb.

Centromero (vari componenti di DNA Satellite). Lunghezza di diverse Mb.

Microsatelliti ampiamente distribuiti nei vari cromosomi

DNA minisatellite ipervariabile (particolarmente nelle regioni vicine ai telomeri).

Sequenze di DNA ripetitivo



Il DNA totale di vitello può essere suddiviso in 3 frazioni in base alla velocità di riassociazione:

1. Sequenze semplici
2. Seq Ripetute interperse
3. DNA a singola copia

Sequenze di DNA ripetitivo:

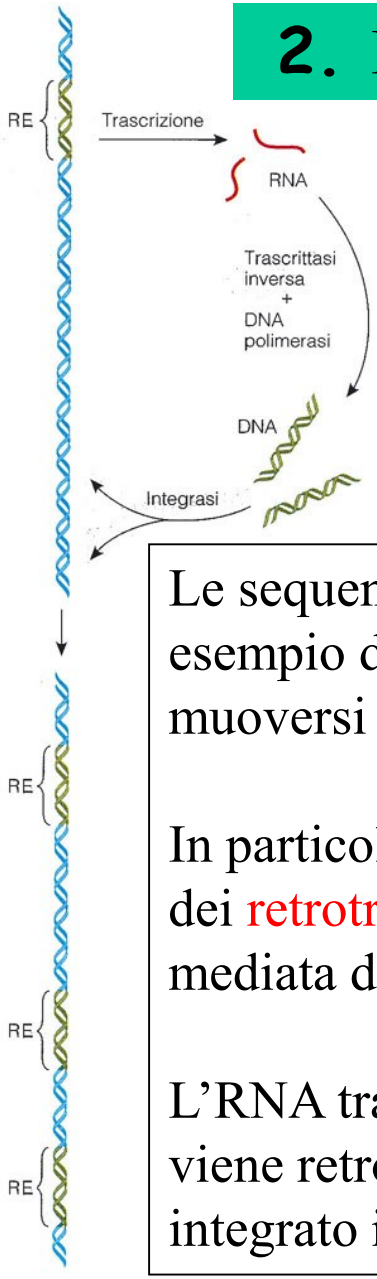
2. Seq Ripetute interperse

Altre sequenze di DNA ripetitivo sono sparse per tutto il genoma invece di essere raggruppate come ripetizioni in tandem.

Abbreviazione	**SINE** Sequenze Alu	**LINE**	**LTR** Elementi retrovirus-simili	**Trasposoni a DNA**
Sequenze	Short Interspersed Elements	Long Interspersed Elements	Long Terminal Repeat	
Lunghezza	circa 300 pb	circa 6000 pb	Dimensione media 1,3 kb	Dimensione media 0,25 kb
Ripetizione nel genoma	1 milione di volte (10% DNA totale)	circa 500.000 volte (20% DNA totale)	circa 250.000 volte (5% DNA totale)	circa 180.000 volte (2% DNA totale)

Sequenze di DNA ripetitivo:

2. Famiglie di sequenze altamente ripetute intersperse



SINE	LINE	LTR	Trasposoni a DNA
Sequenze Alu		Elementi retrovirus-simili	

Sequenze simili ai genomi dei retrovirus

Le sequenze SINES e LINES sono un tipico esempio di elementi trasponibili in grado di muoversi liberamente nel DNA genomico.

In particolare le sequenze SINES e LINES sono dei retrotrasposoni in quanto la loro mobilità è mediata dalla trascrittasi inversa.

L'RNA trascritto dalle sequenze SINES e LINES viene retrotrascritto in DNA che in seguito viene integrato in un nuovo sito del genoma

ELEMENTI GENETICI MOBILI O ELEMENTI TRASPONIBILI

↓

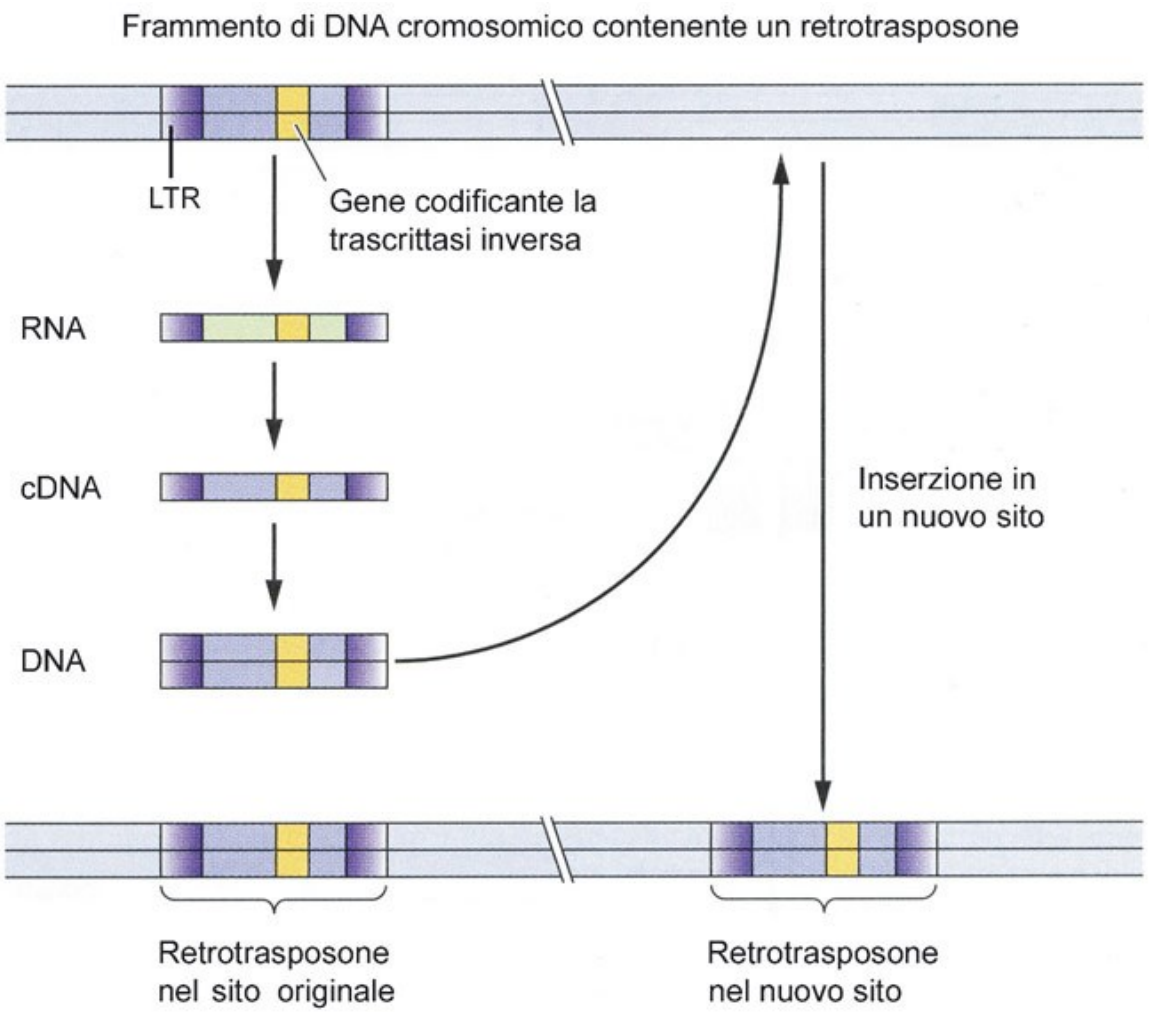
RETROTRASPOSONI

2. Famiglie di sequenze altamente ripetute intersperse

ELEMENTI GENETICI MOBILI O ELEMENTI TRASPONIBILI

↓

RETROTRASPOSONI

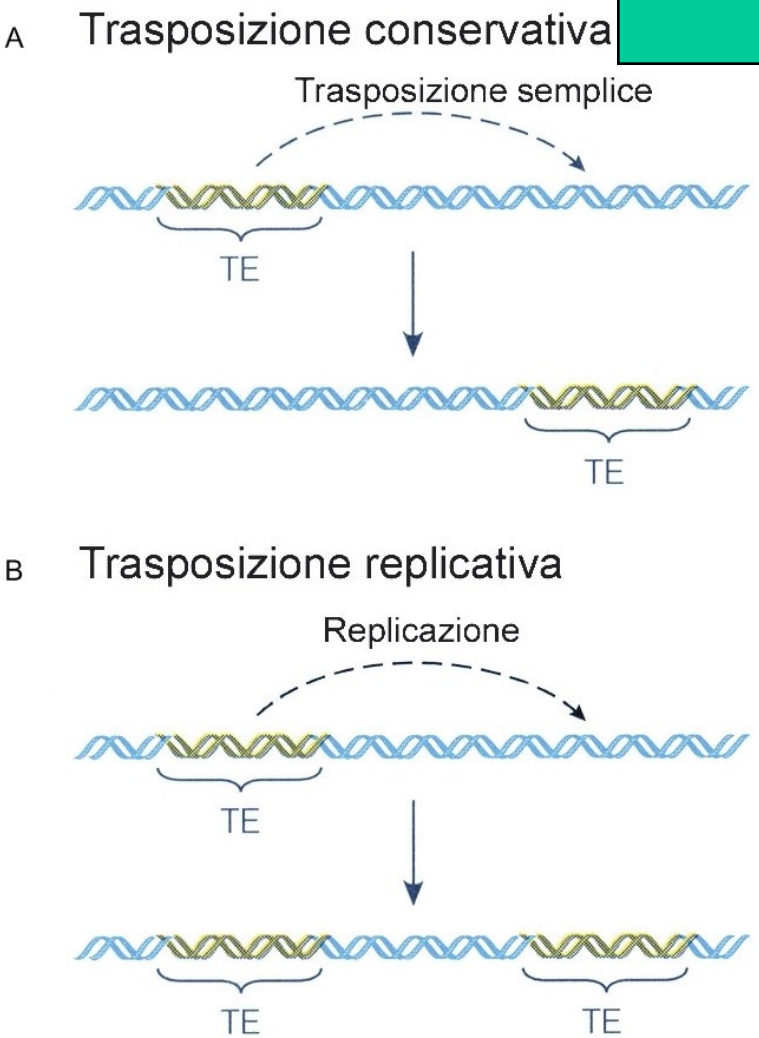


Struttura e trasposizione di un retrotrasposone: l'enzima trascrittasi inversa produce una copia di DNA usando come stampo un RNA intermedio

Sequenze di DNA ripetitivo:

2. Famiglie di sequenze altamente ripetute intersperse

SINE	LINE	LTR	Trasposoni a DNA
Sequenze Alu		Elementi retrovirus-simili	



Trasposoni: elementi ripetuti in grado di muoversi all'interno del genoma umano senza l'intervento della trascrittasi inversa

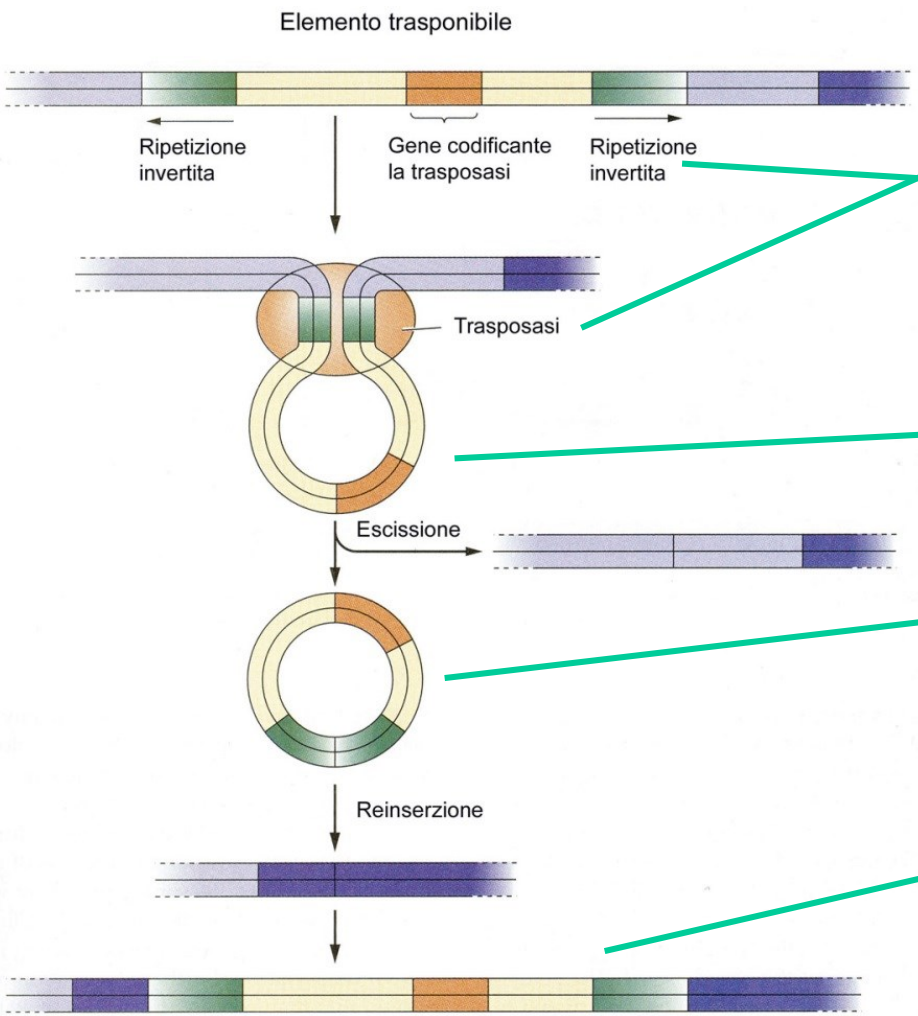
ELEMENTI GENETICI MOBILI O ELEMENTI TRASPONIBILI

↓

TRASPOSONI

TRASPOSONI

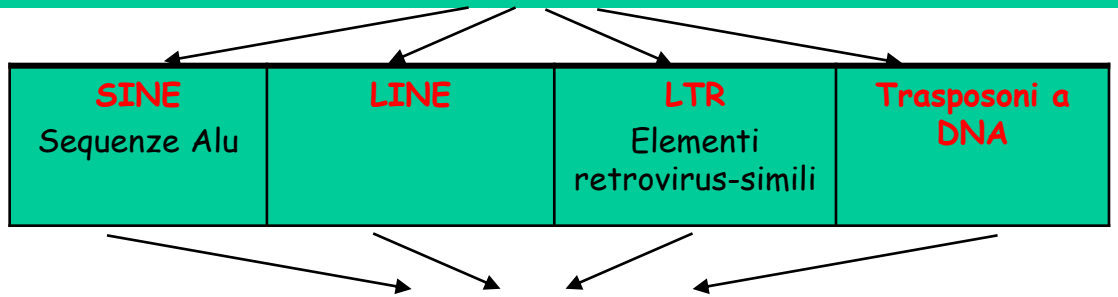
Struttura e trasposizione di un elemento trasponibile:



- L'enzima trasposasi riconosce le sequenze ripetute invertite che fiancheggiano l'elemento trasponibile
- forma una struttura ad anello
- induce l'escissione dell'elemento stesso
- L'elemento trasponibile in seguito può reinserirsi in un diverso sito genomico

Sequenze di DNA ripetitivo:

2. Famiglie di sequenze altamente ripetute intersperse



ELEMENTI GENETICI MOBILI O ELEMENTI TRASPONIBILI

Nel loro insieme gli elementi ripetuti dispersi rappresentano da soli circa la metà del genoma umano.

La presenza di elementi mobili nel nostro genoma ha fatto ipotizzare che essi abbiano svolto e probabilmente tuttora svolgano una importante funzione evolutiva, spingendo il nostro genoma a riarrangiarsi continuamente e quindi contribuendo sostanzialmente alla diversità genica

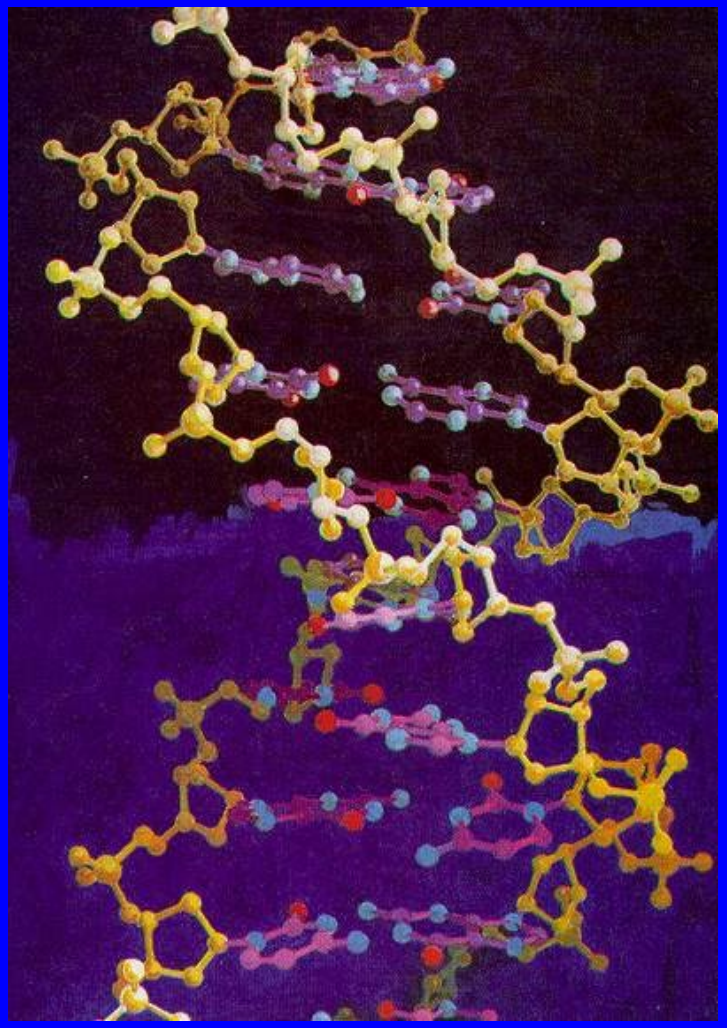
Il numero dei geni negli eucarioti

DNA di una cellula umana aploide	3×10^9 coppie di basi
Sequenze altamente ripetute	1/3 del genoma: 1×10^9 coppie di basi
Geni funzionanti + pseudogeni + sequenze spaziatrici non ripetitive	2×10^9 coppie di basi
Dimensioni di un gene medio, compresi gli introni	10.000-20.000 coppie di basi
Stima del numero di geni nel genoma umano	$(2 \times 10^9)/ 20.000 = 100.000$ geni
Sequenze che codificano proteine	3% circa del DNA umano
Stima del numero di geni nel genoma umano corretta in seguito al sequenziamento del genoma umano	circa 30.000 geni

DNA spazzatura….
Junk DNA….

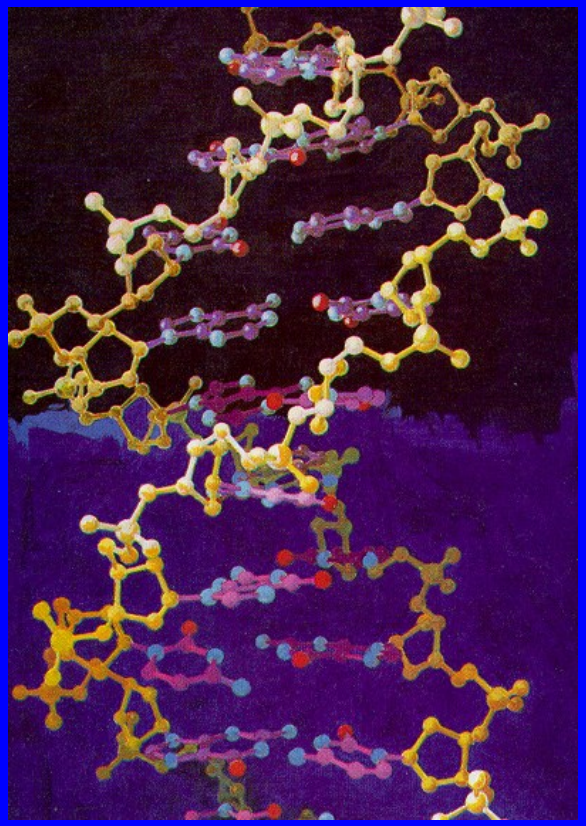
Esiste una relazione tra quantità di DNA e la complessità degli organismi?

Facciamo 2 ipotesi:
Ipotesi n 1
Ipotesi n 2



Ipotesi numero 1

La complessità degli organismi è legata al numero di geni presenti all'interno del DNA



Cellule di lievito 6 000 geni

Insetto

13 500 geni

Drosophila melanogaster 14 000 geni

Caenorhabditis elegans 19 000 geni

Riso

50 000 geni

Uomo 20 000-30 000 geni

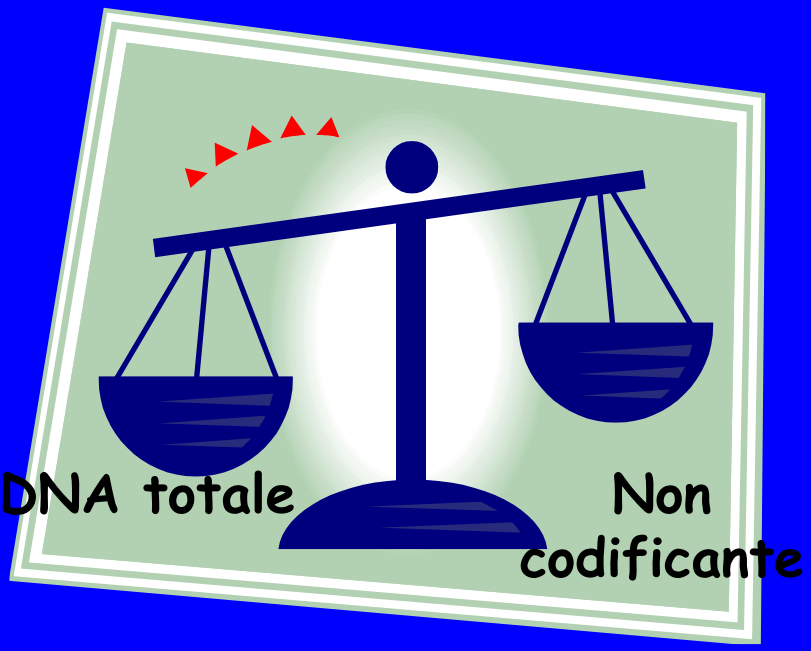
La complessità di un organismo NON dipende dal numero di geni

Ipotesi numero 2

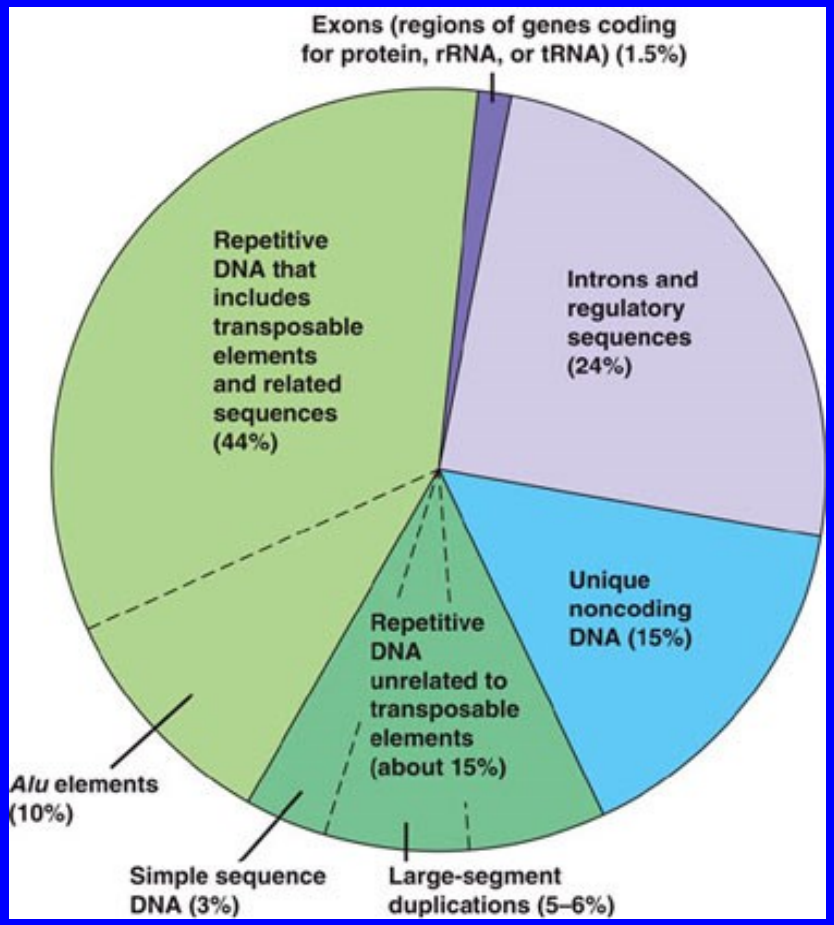
La complessità è legata alla quantità di

<u>DNA non codificante</u>

rispetto all'intero genoma



DNA codificante e non codificante nel genoma umano



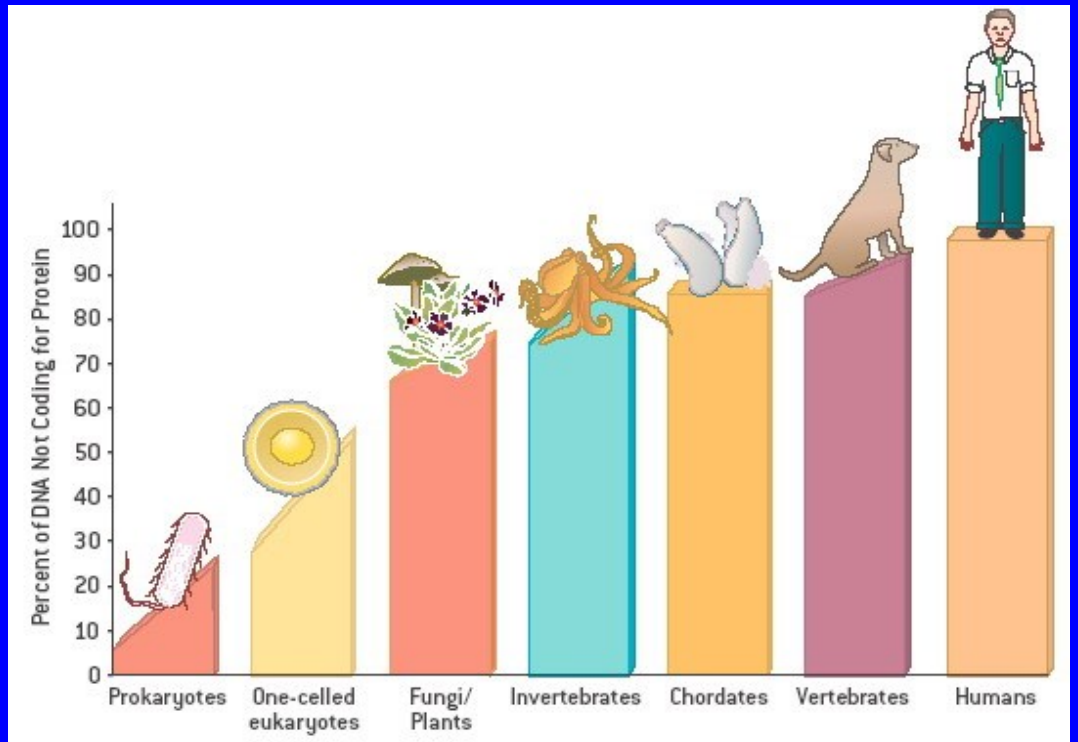
Problema della complessità

Rapporto tra DNA

non codificante(ncDNA) e

DNA del genoma totale(tgDNA)

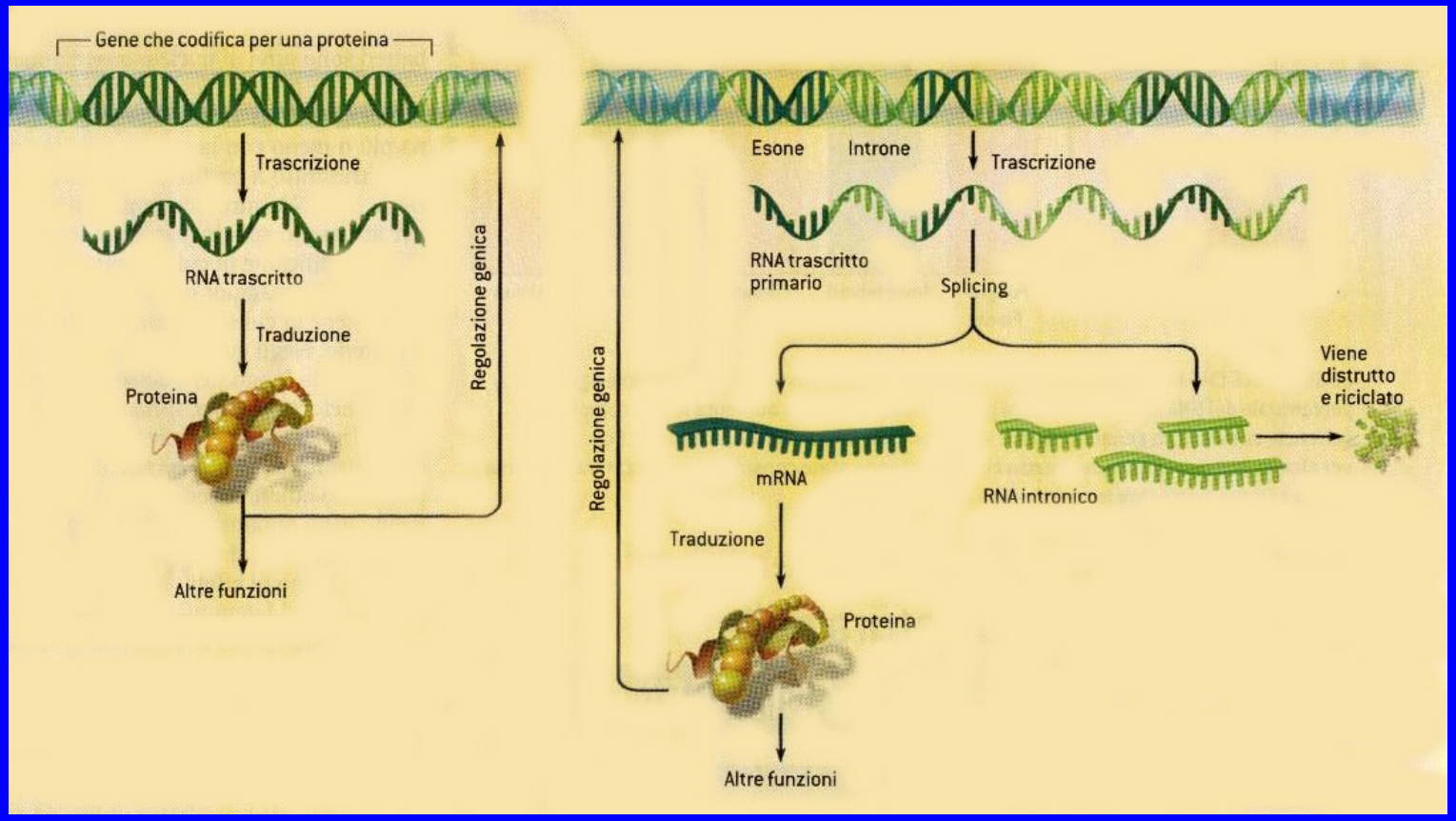
in alcuni genomi sequenziati.



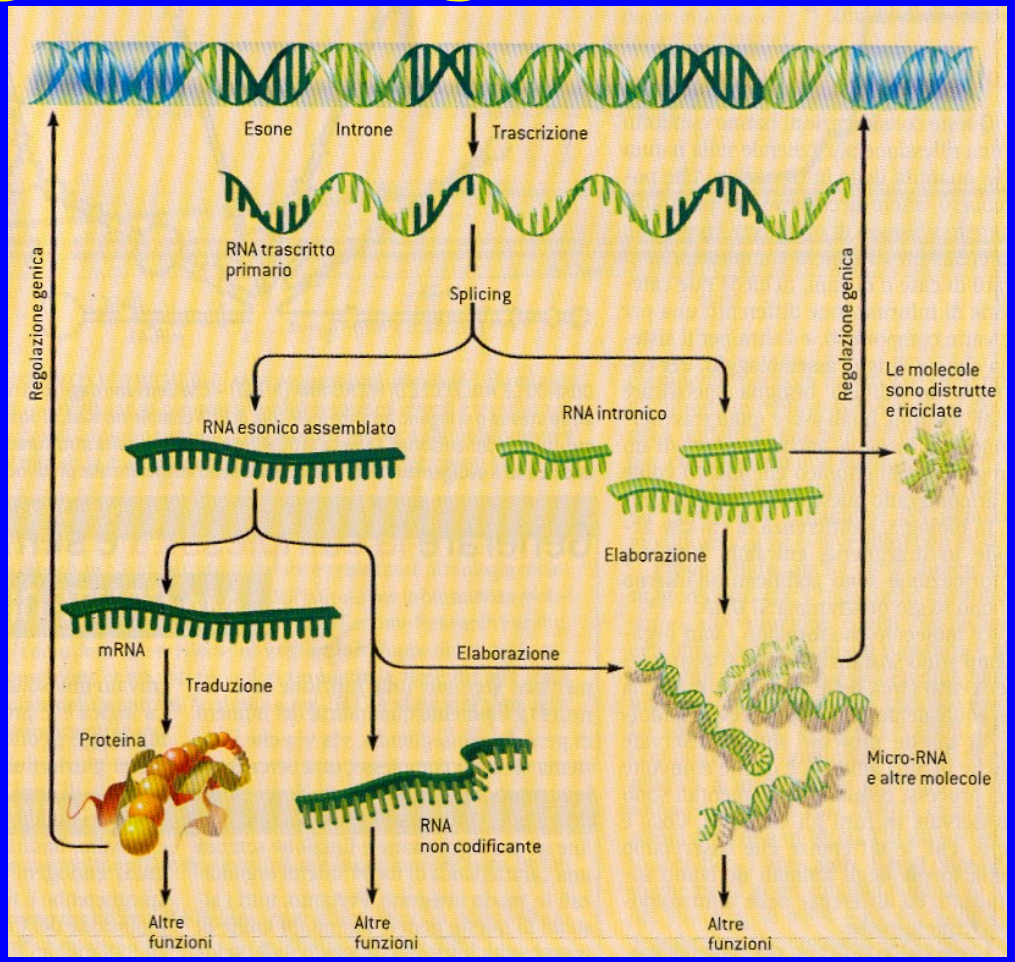
NONPROTEIN-CODING SEQUENCES make up only a small fraction of the DNA of prokaryotes. Among eukaryotes, as their complexity increases, generally so, too, does the proportion of their DNA that does not code for protein. The noncoding sequences have been considered junk, but perhaps it actually helps to explain organisms' complexity.

La complessità degli organismi è correlata alle dimensioni del genoma non codificante

Vecchia teoria sull'attività genica nei procarioti e negli eucarioti



Recente teoria sull'attività genica negli eucarioti



Evoluzione DNA eucariotico

Eucarioti accrescono la loro complessità grazie all'inserimento di sequenze ripetitive che aumentano la loro quantità di DNA

Aumenta la possibilità di evolversi attraverso la sperimentazione casuale di proteine

Cambia la struttura di controllo

Si basa su trascritti di "DNA spazzatura"

Evoluzione DNA eucariotico

Aumenta la complessità degli organismi

Esplode la diversità dei viventi

Utilità degli introni

- Recenti studi hanno mostrato che gli introni non vengono immediatamente riciclati dopo essere stati rimossi dall'RNA
- Importantissima funzione di regolazione tramite

RNA attivi

iRNA

micro-RNA

Riboswitch

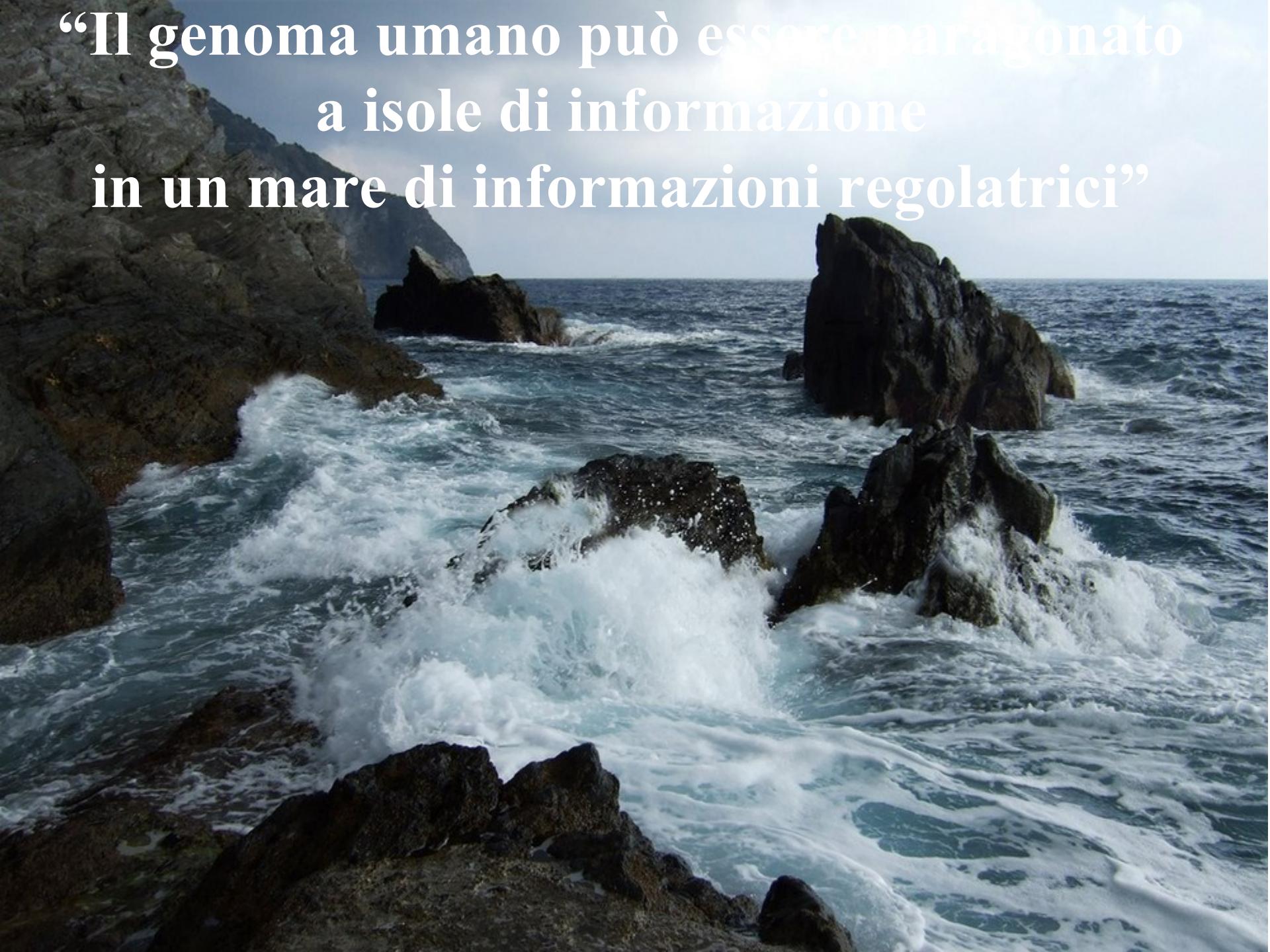
RNA antisenso

Utilità degli introni

Introni =
Laboratori di sperimentazione
per nuove proteine

Una mutazione non può che portare vantaggi per l'organismo ospitante: la vecchia proteina è sempre conservata ma c'è la possibilità di crearne una nuova, che, se utile, può essere conservata

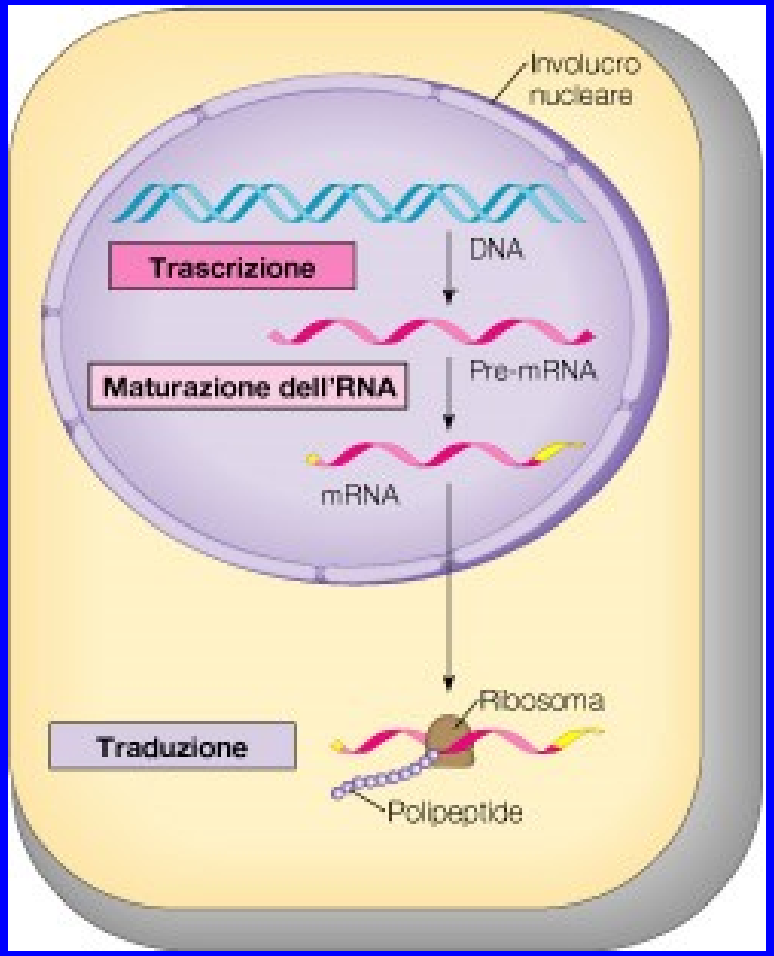
Il DNA spazzatura
non è spazzatura!


“Il genoma umano può essere paragonato
a isole di informazione
in un mare di informazioni regolatrici”

I microRNA:
il loro geni e i loro target

Flusso dell'informazione genetica - Dogma centrale

Quando la cellula ha bisogno di una particolare proteina, la sequenza nucleotidica di un preciso tratto di DNA, situato sulla infinitamente lunga molecola di un cromosoma, viene inizialmente ricopiata ad RNA che farà da stampo per dirigere la sintesi delle proteine

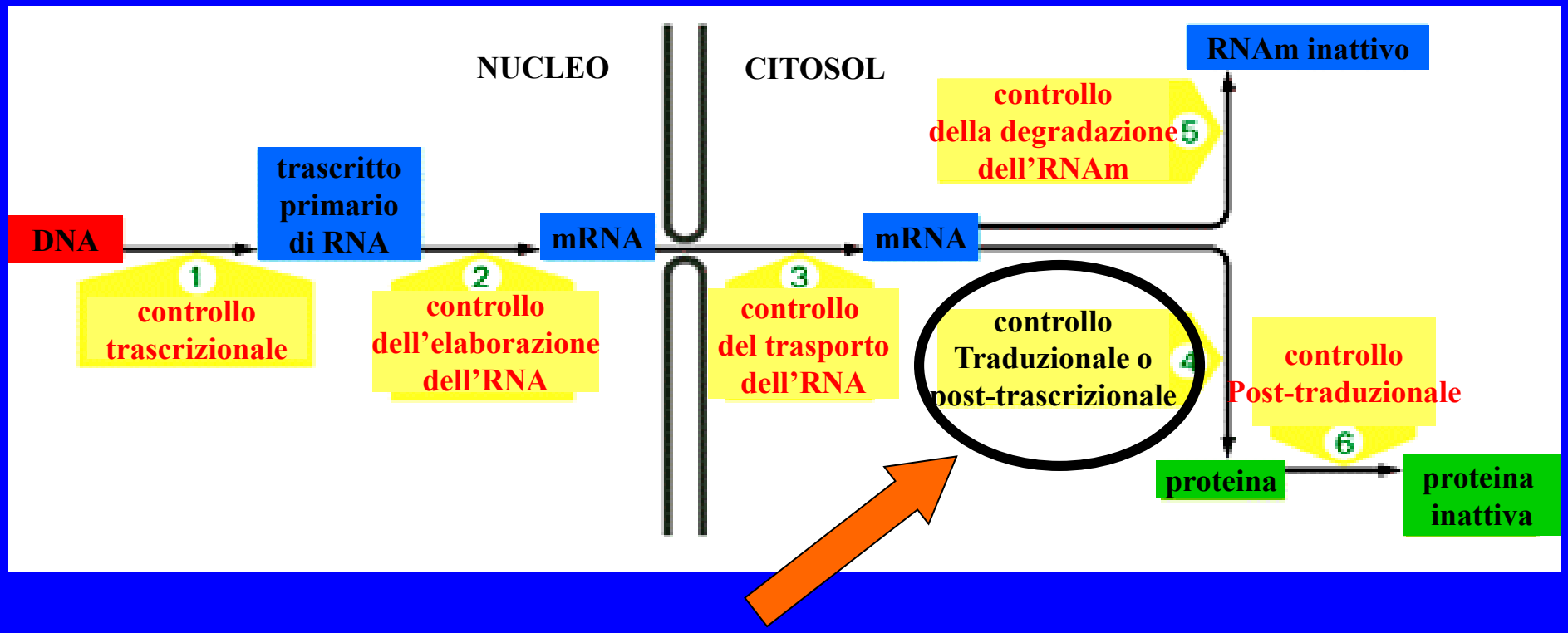


DNA
↓
RNA
↓
PROTEINA

Dogma centrale della biologia molecolare:

L'informazione genetica fluisce continuamente dal DNA all'RNA alle proteine

Il controllo dell'espressione dei geni negli eucarioti

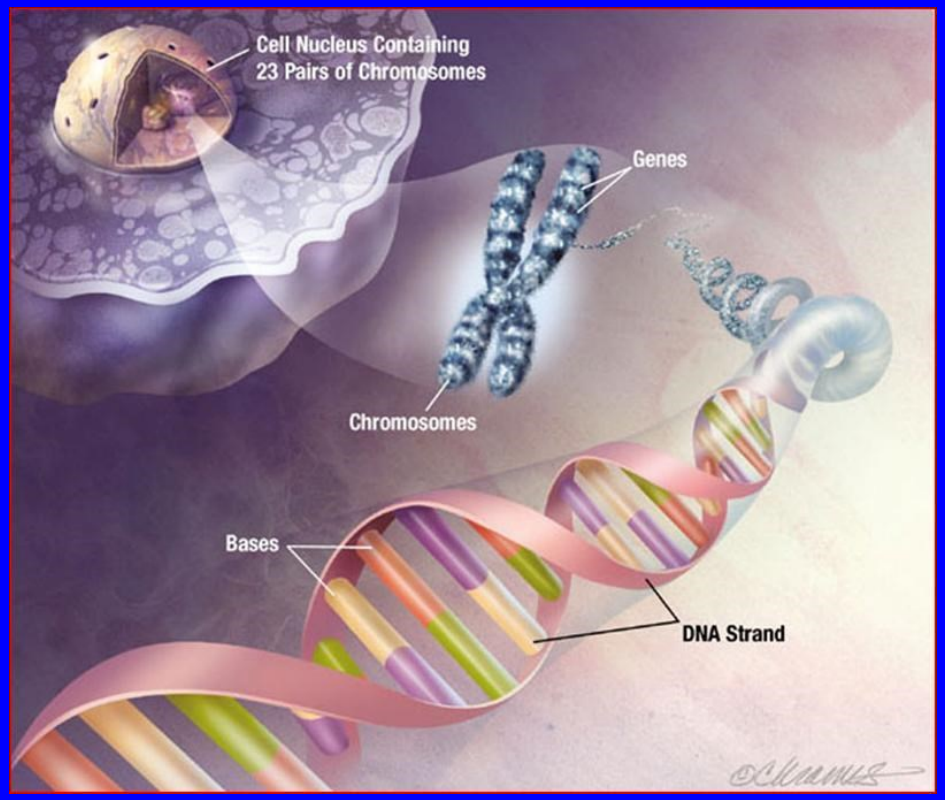


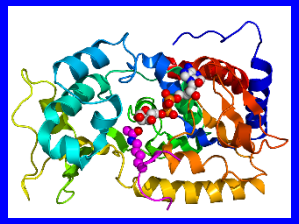
L'espressione genica può essere regolata in più punti del percorso che conduce dal DNA all'RNA e quindi alle proteine

Flusso dell'informazione genetica

Stima del numero di geni presenti sul genoma umano:

50 000 geni

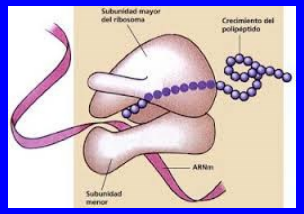


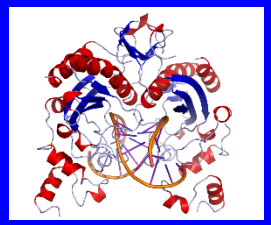


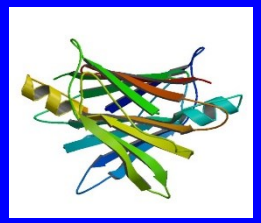
Prodotti genici

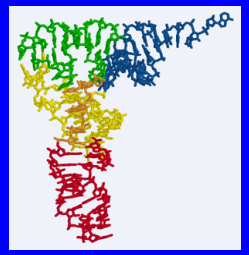
Proteine

RNA









…ma non solo…

RNA: una molecola per molteplici funzioni

Classici RNA coinvolti nella sintesi proteica:

mRNA	RNA messaggero
rRNA	RNA ribosomiale
tRNA	RNA transfert

RNA coinvolti in duplicazione, compattamento, splicing, maturazione dell'RNA e sorting delle proteine:

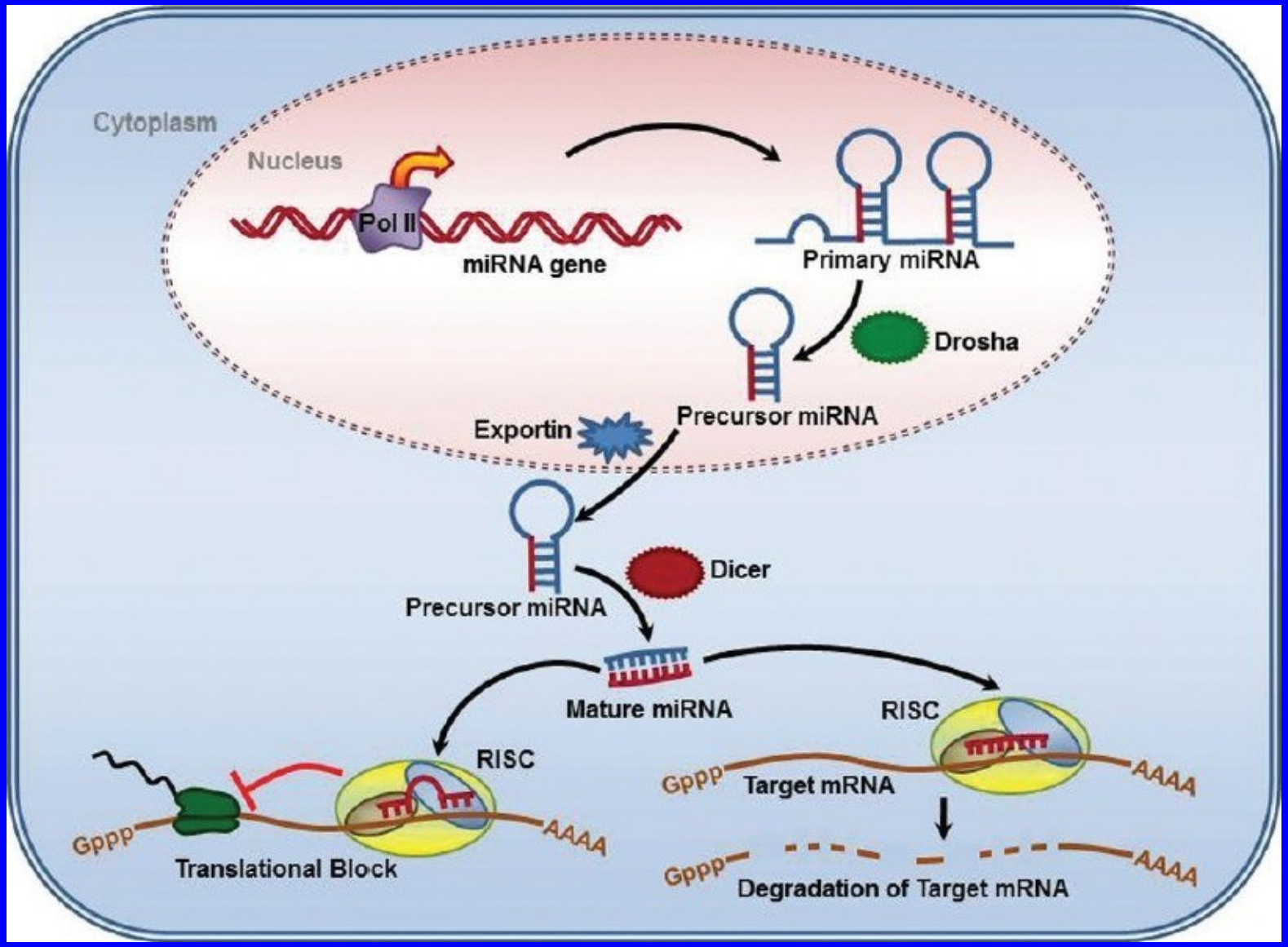
TERC *(Telomerase RNA component)*	Coinvolto nella duplicazione del DNA
Xist *(X inactive-specific transcript)*	Coinvolto nella formazione del corpo di Barr
snRNA *(small nuclear RNA)*	Coinvolti nello splicing
snoRNA *(small nucleolar RNA)*	Coinvolti nella maturazione dell'rRNA
scRNA *(small cytoplasmic RNA)*	Coinvolti nel sorting delle proteine

RNA: una molecola per molteplici funzioni

RNA non codificanti coinvolti nel controllo dell'espressione genica:

miRNA *(micro-RNA)*	Regolano negativamente l'espressione genica
siRNA *(Small interfering RNA)*	Piccoli RNA sintetizzati chimicamente o di origine virale (invece i **miRNA** sono endogeni!) Hanno la funzione di degradare l'mRNA bersaglio attraverso un meccanismo definito RNA interference (RNAi) Agiscono solo per complementarietà perfetta: ogni siRNA può avere un unico mRNA bersaglio (invece i **miRNA** possono avere più bersagli!)
piRNA *(PiwiRNA)*	Generati da lunghi precursori ssRNA agiscono grazie alla proteina piwi (Ago) e sono coinvolte nello sviluppo delle cellule germinali
rasiRNA *(repeat associated small interfering RNA)*	Sottofamiglia dei piRNA, ma ancora tutta da scoprire
ncRNA *(longer non-coding RNA)*	70-5000 nt: funzione sconosciuta

MicroRNA

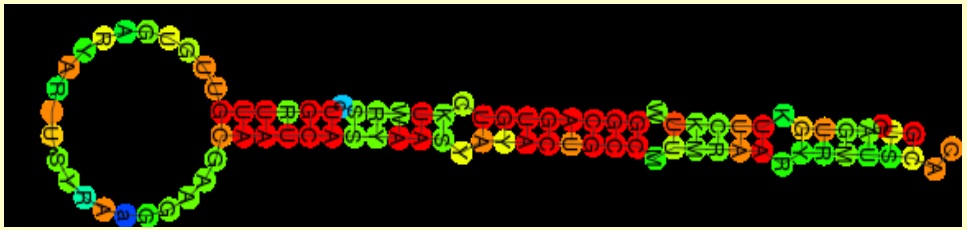

Cytoplasm
Nucleus
Pol II
miRNA gene
Primary miRNA
Drosha
Precursor miRNA
Exportin
Dicer
Precursor miRNA
Mature miRNA
RISC
Gppp
AAAA
Translational Block
RISC
Gppp
Target mRNA
AAAA
Gppp
AAAA
Degradation of Target mRNA

Cosa sono i MicroRNA o miRNA?

I microRNA sono un gruppo di piccoli RNA non codificanti a singolo filamento (ss) che sono stati identificati in molti organismi

Sono formati da 18-22 nucleotidi

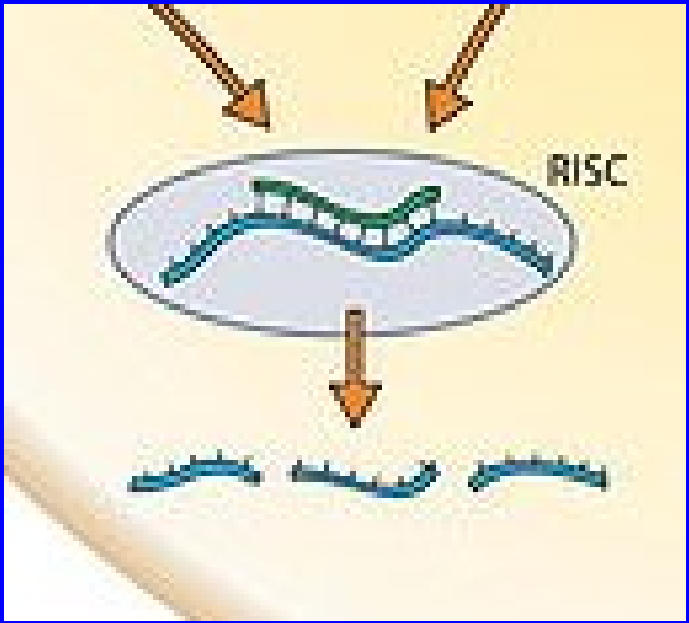
Sono originati da un precursore a stem-loop



Funzione dei microRNA

Il loro ruolo fondamentale è quello di

regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale (post-transcriptional gene silencing, PTGS)

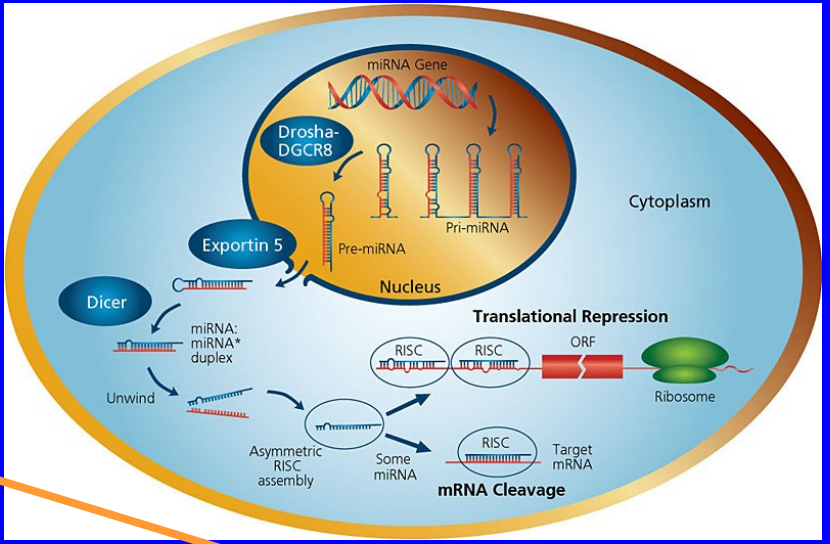


I miRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA targets al fine di determinarne la degradazione o la repressione della traduzione

Funzione dei microRNA

Il loro ruolo fondamentale è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale

La funzione di molti miRNA non è nota, ma per alcuni è stata provata la partecipazione a processi fisiologici e patologici:



Hanno un ruolo in proliferazione, apoptosi e differenziazione cellulare

Possono essere deregolati in malattie umane

Possono essere coinvolti nella tumorigenesi

Conservazione dei miRNA

Table II. **miRNAs conserved across phyla**

Name	Sequence[1]	Homologues[2]
miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGGAG	C, D, H
miR-2	UAUCACAGCCAGCUUUGA(G/U)G(U/A)GC[3]	C, D
miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU	D, H
miR-34	AGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUG	C, D, H
miR-60	UAUUAUGCACAUUUUCUAGUUCA	C, D, H
miR-79	AUAAAGCUAGGUUACCAAAGCU	C, D
miR-84	UGAGGUAGUAUGUAAUAUUGUA	C, D, H
miR-87	GUGAGCAAAGUUUCAGG(U/A)GU[3]	C, D, H

[1]RNA sequences are deduced from cDNA sequencing; no RNAs have yet been sequenced.
[2]C, *C. elegans*; D, *D. melanogaster*; H, *H. sapiens*.
[3]Letters in parentheses indicate variations in otherwise identical miRNAs from different organisms or variant genes within one organism.

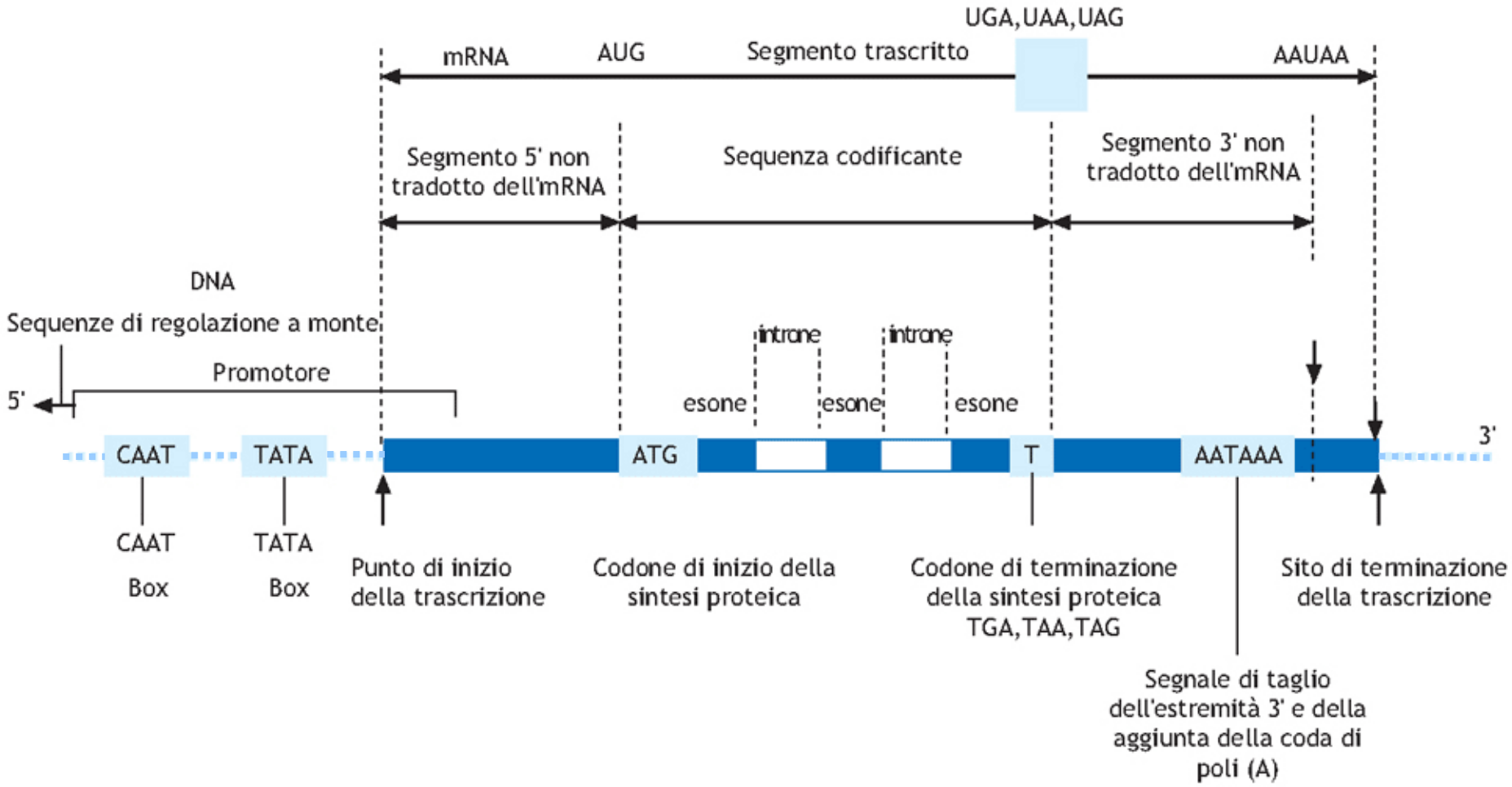
Scoperta dei miRNA

Tappe della scoperta dei miRNA:
Chalfie, 1981;
Ambros, 1989;
Ruvkun, 1991
Lee, 1993
Wightman, 1993
Reinhart, 2000

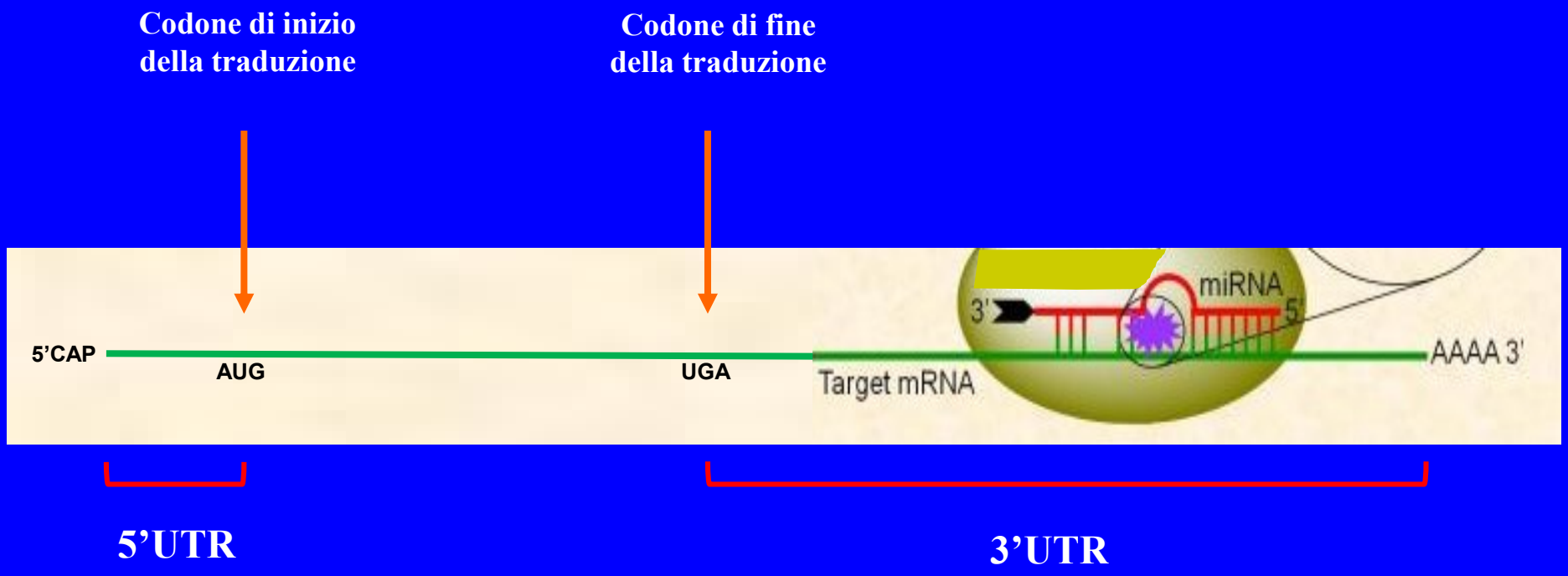
2001: <u>Dimostrata l'esistenza di una grande nuova classe di RNA con un potenziale ruolo regolativo (miRNA):</u>
sono una nuova abbondante classe di riboregolatori e possono regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale attraverso

l'appaiamento delle basi nel <u>3'UTR</u> dell'mRNA target

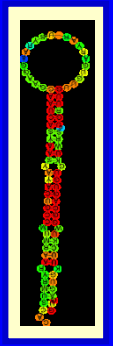
Come si legge un gene



Il microRNA agisce mediante l'appaiamento delle basi nel 3'UTR dell'mRNA target



The miRNA Registry: miRBase



Nel 2003 è stato creato un miRNA database: in base alle seguenti osservazioni:

1. I miRNA sono prodotti da un trascritto precursore di 70-100 nt con un struttura a stem-loop
2. I miRNA sono altamente conservati tra le specie
3. I miRNA hanno un pattern caratteristico di divergenza nell'evoluzione

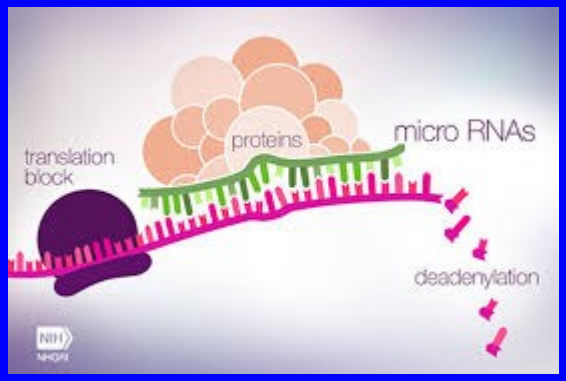
Approccio di bioinformatica per predire i miRNA

e poi molti sono stati confermati con northern blot e PCR

Stima del numero di miRNA

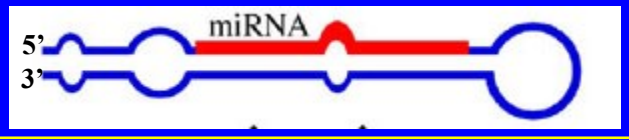
La stima della quantità di miRNA nel genoma è vicina all'1%

simile a quella di altre grandi famiglie geniche con ruolo regolatorio, come quelle che codificano per i fattori di trascrizione



Ad oggi sono stati scoperti circa 2000 miRNA

Nomenclatura

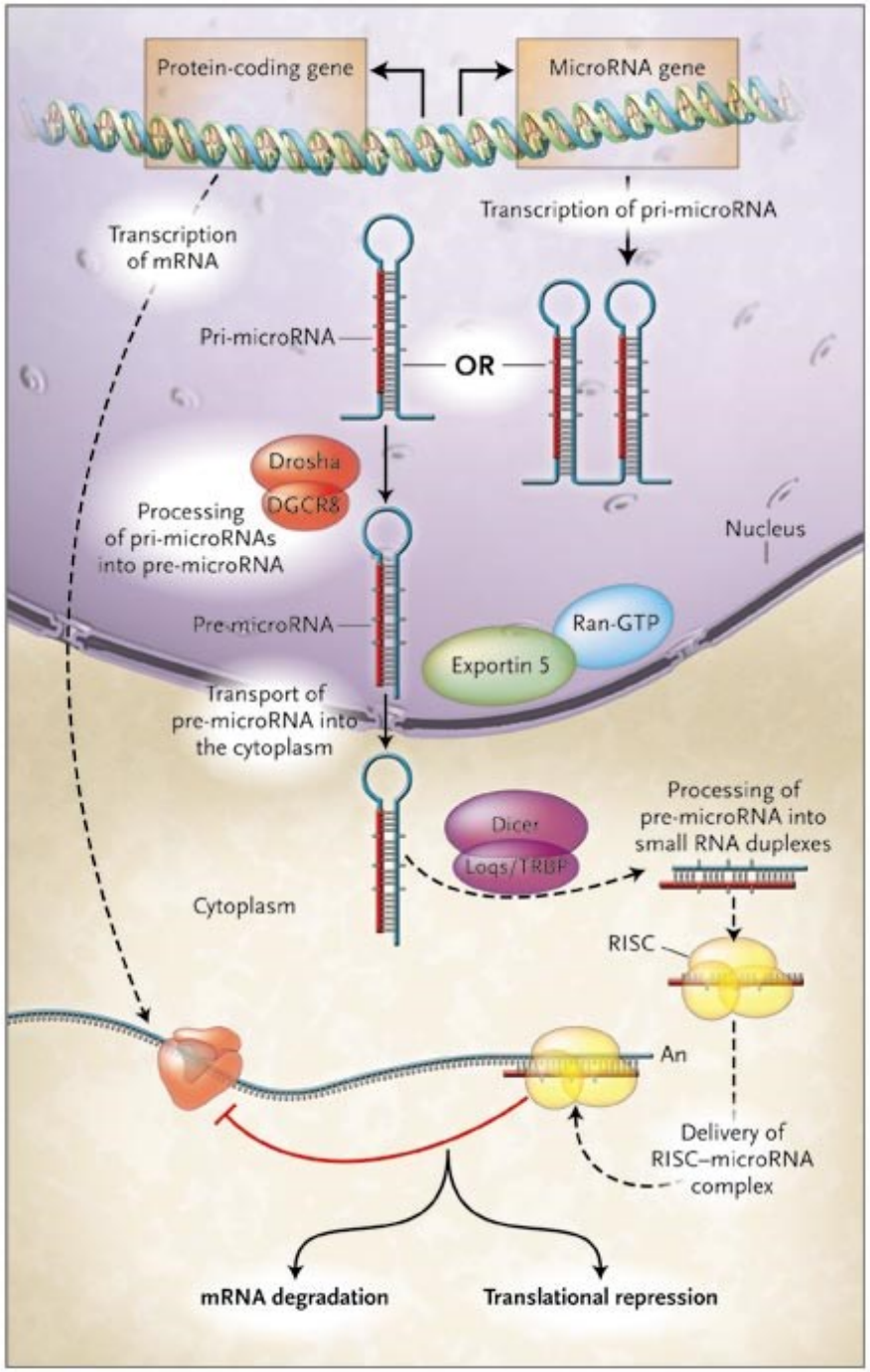
ESEMPIO	NOMENCALTURA
miR-15	I miRNA sono identificati con un numero
miR-16	Il prossimo miRNA senza somiglianza viene chiamato con i numero successivo MiRNA omologhi in organismi diversi vengono chiamati con lo stesso nome
miR-16-1 e miR-16-2	Forme mature identiche ma che vengono prodotte da loci diversi vengono indicate con lo stesso nome, ma con un suffisso numerico
miR-181a e miR-181b	Differenze in 1 o 2 basi vengono indicati con un suffisso letterale
miR-142-5p (sul braccio in 5') e miR-142-3p (sul braccio in 3')	Se un precursore a stem-loop dà origine a 2 miRNA, uno per ogni braccio vengono chiamati con il seguente suffisso: 
miR-191*	La forma meno espressa può essere indicata con un asterisco

Genomica dei miRNA

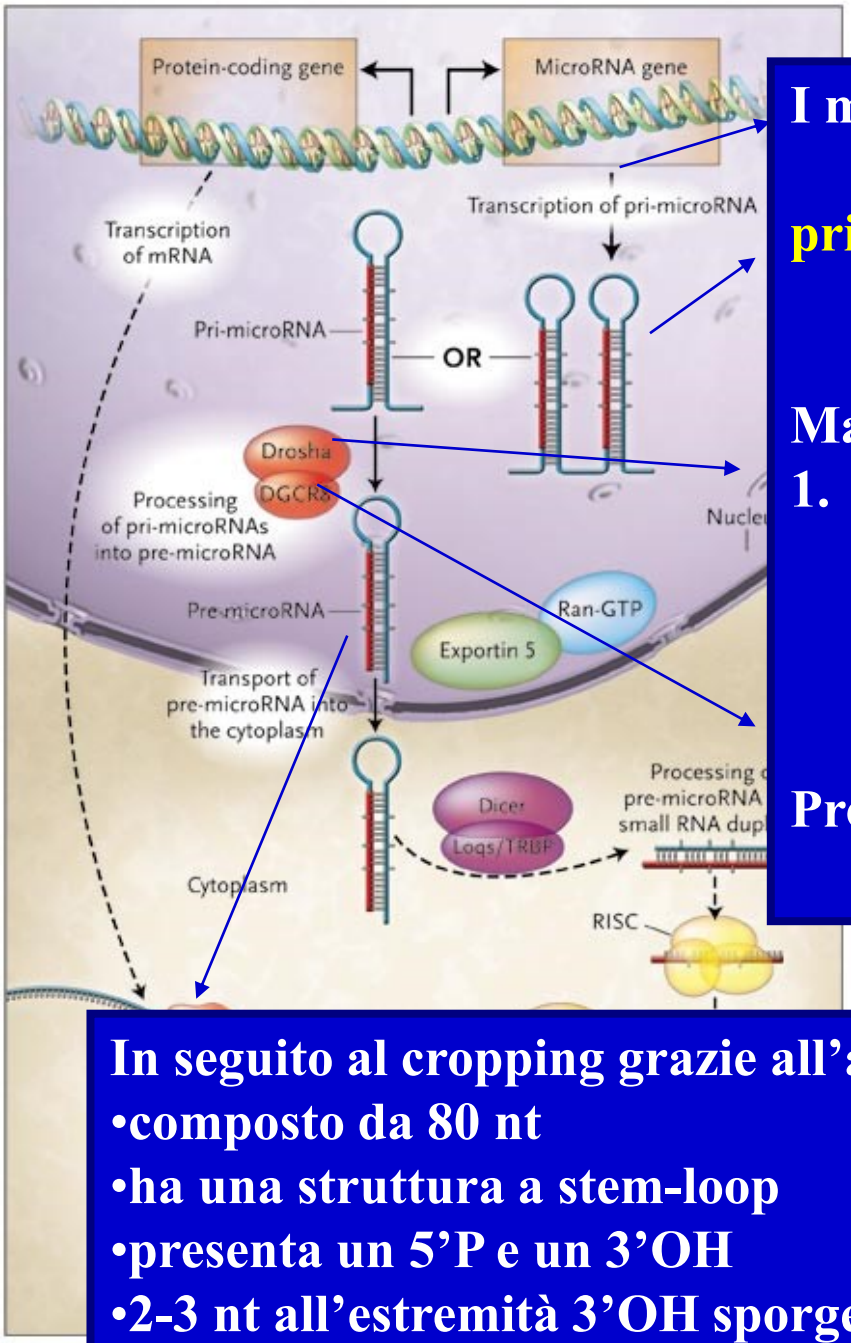
<table>
<tr><th colspan="3">MiRNA</th></tr>
<tr><td colspan="2">50%
miRNA intragenici</td><td rowspan="3">50%
sono unità trascrizionali indipendenti con un promotore e segnali di poli-adenilazione</td></tr>
<tr><td>40%
in introni di geni che codificano per proteine</td><td>10%
in introni di trascritti non codificanti</td></tr>
<tr><td>Molti cluster dei miRNA sono:
-unità trascrizionali singole
-o si sovrappongono con il trascritto ospite, con introni o esoni
-in alcuni casi dipende dello splicing alternativo del gene ospite
-(trascritti policistronici)
-o si sovrappongono con unità trascrizionali trascritte sulla strand opposta</td><td rowspan="2">Molti miRNA si trovano in trascritti che non codificano proteine, classificati ncRNAs (long noncoding RNA).</td></tr>
<tr><td>I geni ospiti codificano per proteine coinvolte nello sviluppo embrionale e nel ciclo cellulare.</td></tr>
</table>

Biogenesi dei miRNA

Azione dei miRNA



Biogenesi dei miRNA -1



I miRNA vengono trascritti dalla **RNA pol II**

pri-miRNA: precursore primario: 100-1000 nt; ha il 5'-cap, il poly-A e può avere introni

Maturazione dei miRNA: 3 fasi:

1. Cropping: taglio operato da **Drosha**: una endonucleasi ribonucleasi III nucleare capace di tagliare la regione fiancheggiante il pri-miRNA

Proteine associate a Drosha conferiscono specificità (es. DGCR8)

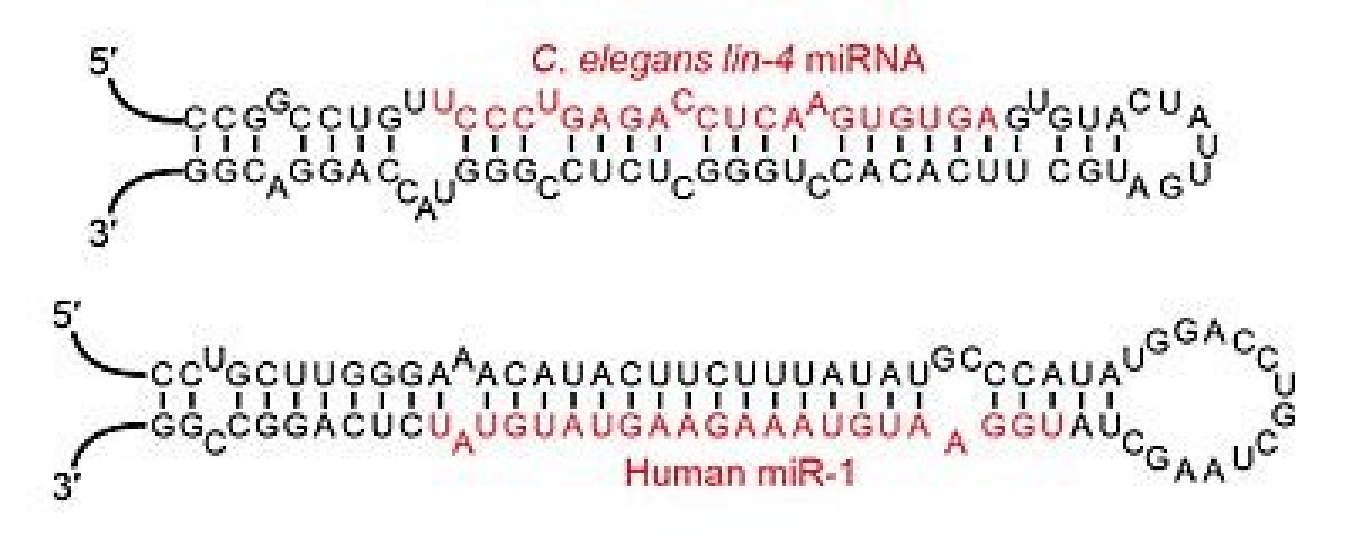
In seguito al cropping grazie all'azione di Drosha si libera il **pre-miRNA**:

- composto da 80 nt
- ha una struttura a stem-loop
- presenta un 5'P e un 3'OH
- 2-3 nt all'estremità 3'OH sporgente a singola elica

Biogenesi dei miRNA -1

Maturazione dei miRNA: 3 fasi:

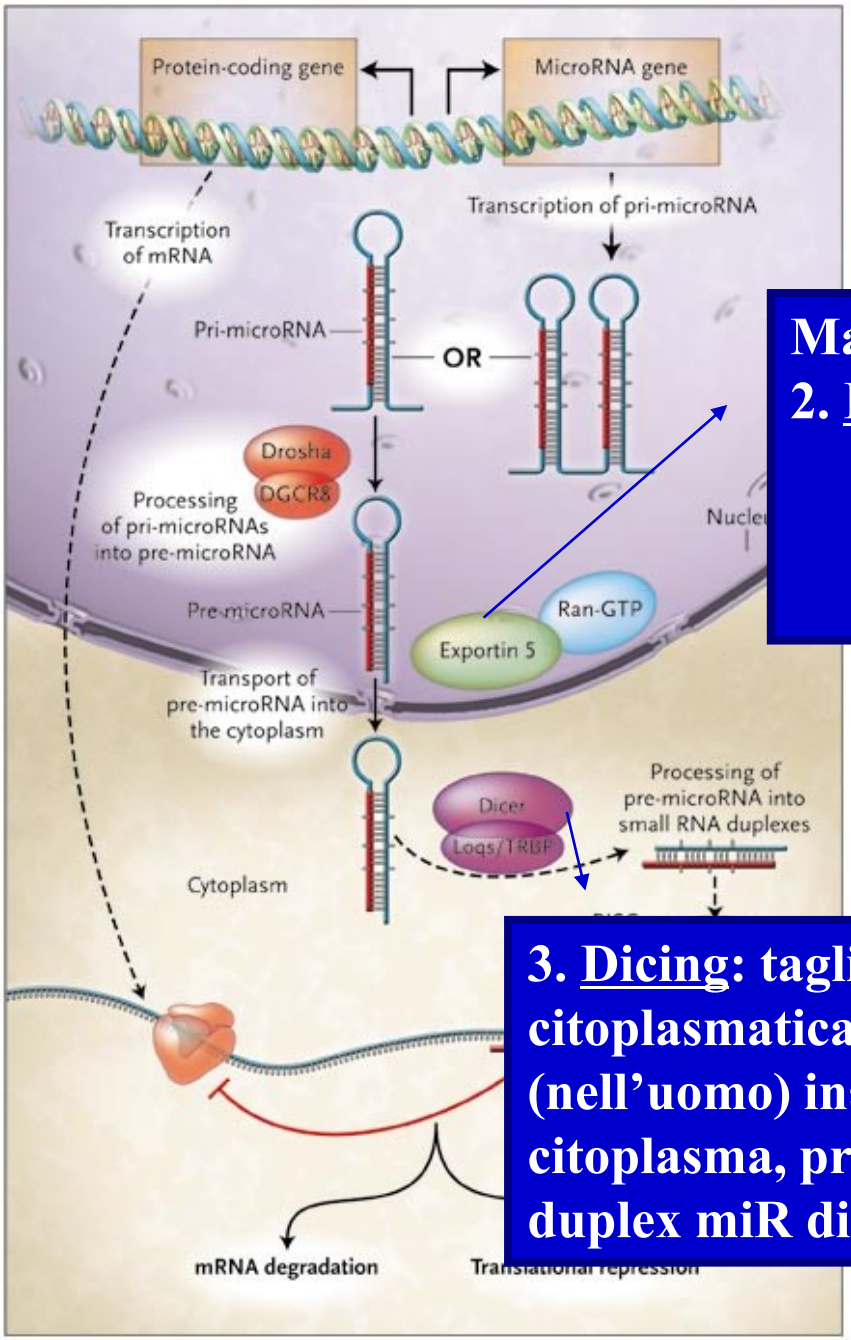
1.<u>Cropping</u>:



In seguito al cropping grazie all'azione di Drosha si libera il pre-miRNA:

- **composto da 80 nt**
- **ha una struttura a stem-loop**
- **presenta un 5'P e un 3'OH**
- **2-3 nt all'estremità 3'OH sporgente a singola elica**

Biogenesi dei miRNA -2

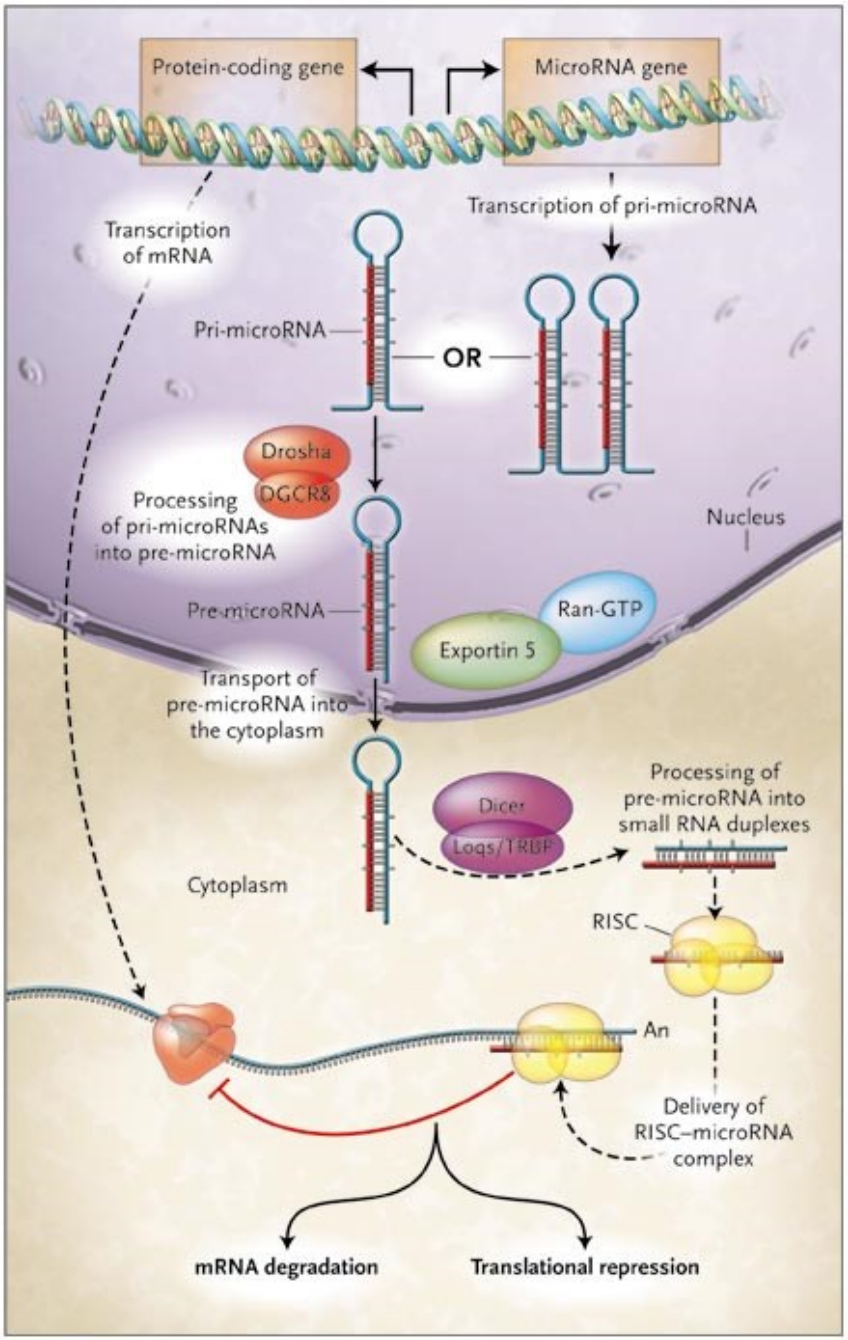


Maturazione dei miRNA: 3 fasi:

2. <u>Export</u>: il pre-miRNA viene trasportato nel citoplasma da Exportin5/RanGTP; si forma un eterotrimero che passa attraverso i pori nucleari

3. <u>Dicing</u>: taglio di Dicer: una RNAse III citoplasmatica chiamata Dicer che (nell'uomo) insieme al suo partner TR, nel citoplasma, processa il pre-miRNA in un duplex miR di 18-22 nt

Biogenesi dei miRNA -3

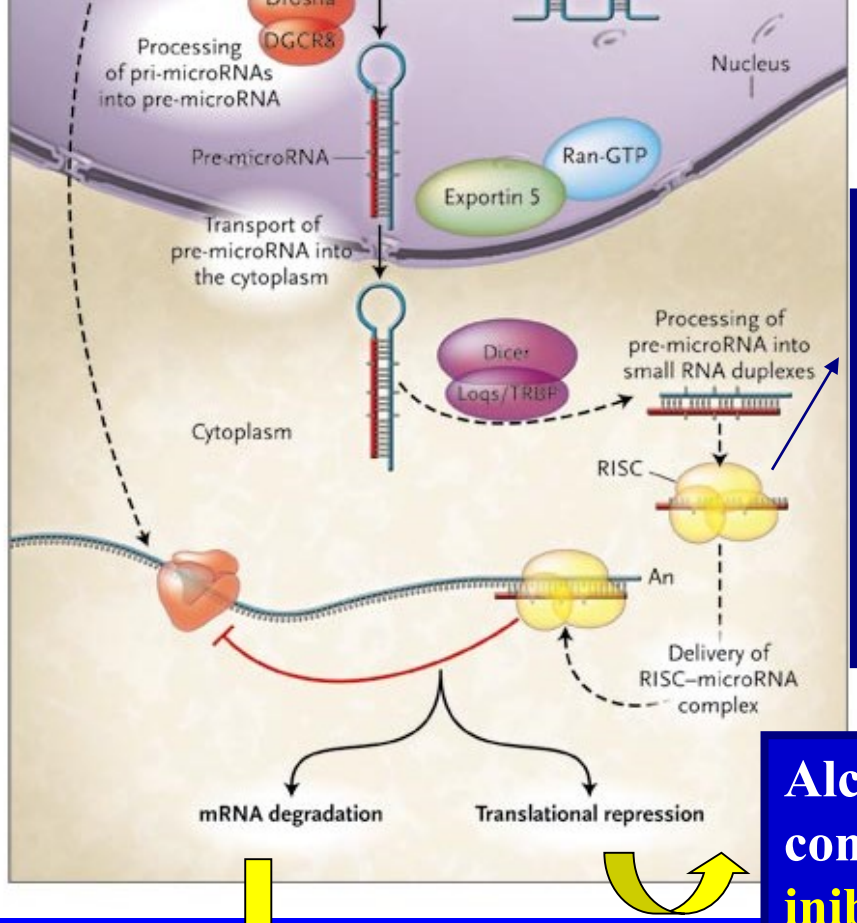


In alcuni casi una delle 2 strand del duplex viene degradata, mentre l'altra si accumula come miRNA maturo.

In altri casi funzionano entrambi da mir e la strand meno rappresentata era indicata con un *.

Ora si è visto che entrambi possono essere miR e con target diversi, perciò ora sono chiamati invece che con l'asterisco:
5p e 3p.

MiRNA in azione:
RISC e inibizione del gene target

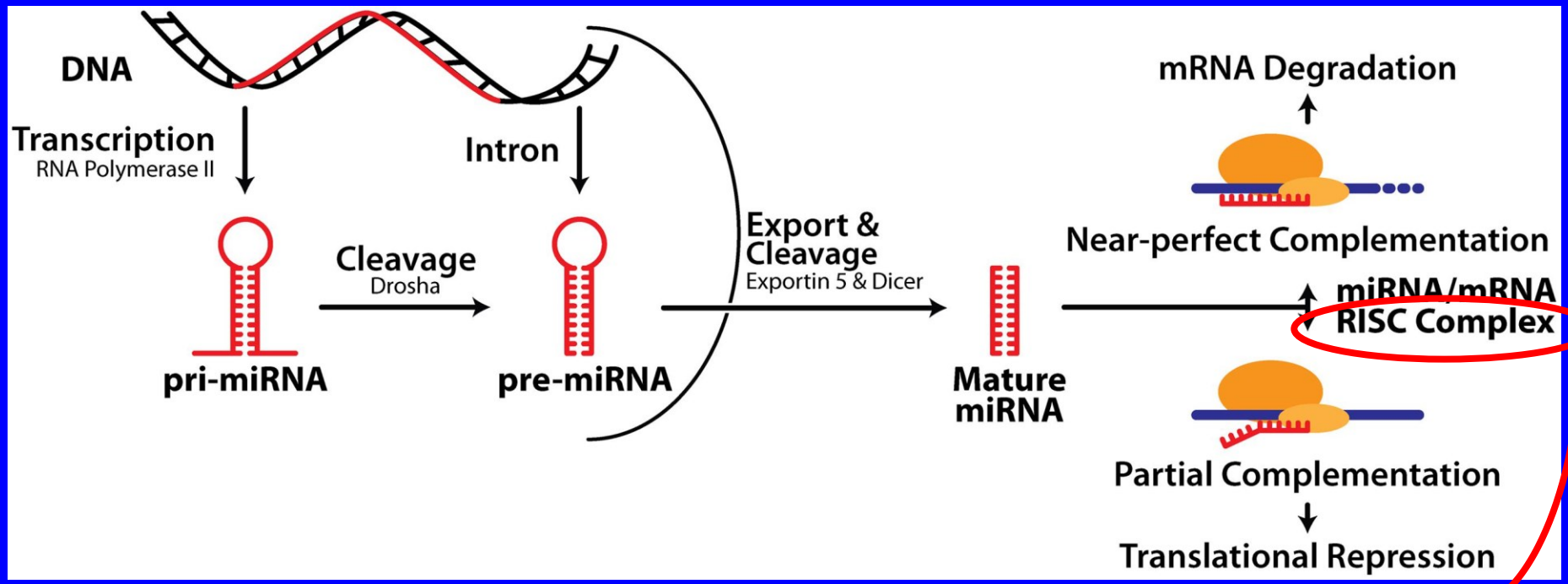


Dal duplex prodotto da Dicer il miRNA entra nel complesso effettore proteico, il **RISC:** complesso di silenziamento indotto da RNA o miRgonauta, che media la degradazione o l'inibizione della traduzione dell'mRNA del gene target

Alcuni miRNA appaiano imperfettamente con il 3'UTR dell'mRNA taget e **inibisocono la traduzione** (produzione della proteina)

Altri miRNA mostrano una complementarietà quasi precisa al loro target e portano alla **degradazione dell'mRNA**

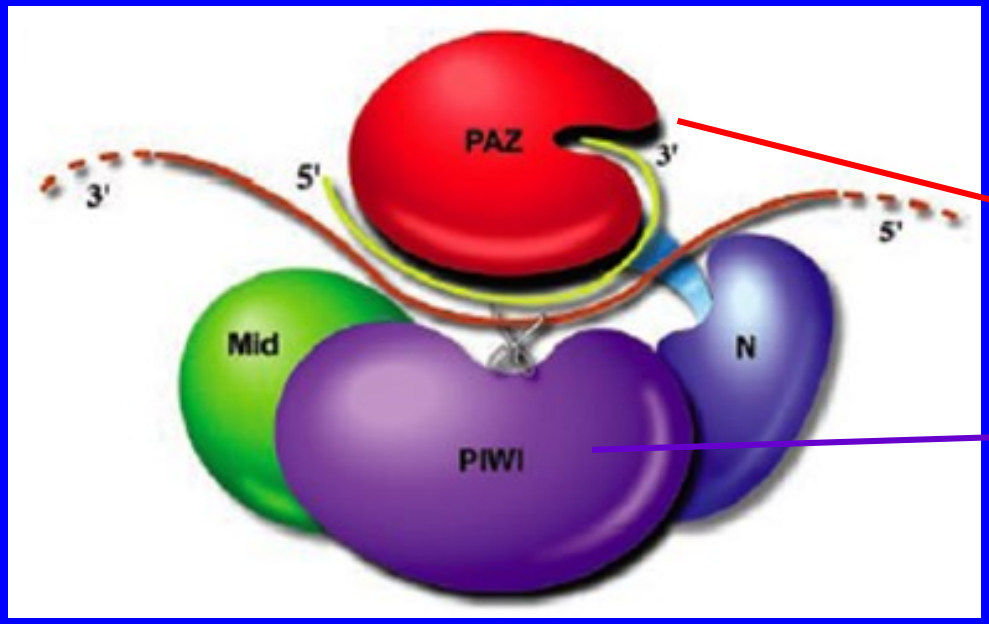
MiRNA in azione



Le proteine componenti del RISC non sono state tutte identificate, alcune sono della famiglia proteica Argonaute (Ago)…

Proteine Argonaute (AGO):

Famiglia di proteine essenziali nel processo di RNA interference (RNAi).
Sono in grado di formare complessi ribonucleoproteici con i siRNA o i miRNA, che riconoscono per complementarità sequenze omologhe presenti in mRNA bersaglio



Le proteine AGO:
due domini caratteristici:

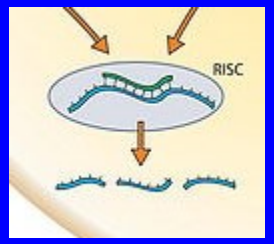
1. dominio PAZ lega il 3′-OH del piccolo RNA

2. dominio Piwi riconosce il terminale 5′-P del piccolo RNA ed ha attività endonucleasica

La proteina AGO2 insieme ad altre proteine forma un complesso multiproteico chiamato RISC (RNA-induced silencing complex) che possiede attività endonucleasica ed è capace di degradare in maniera specifica un RNA bersaglio contenente sequenze complementari alla sequenza guida del siRNA o miRNA

Nell'uomo sono stati identificati 8 membri della famiglia AGO. Tuttavia si conosce bene solo la funzione enzimatica della proteina AGO2.

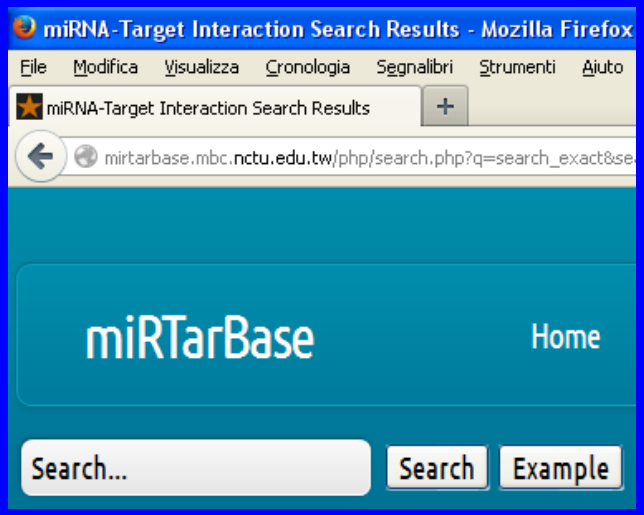
Target



La più importante caratterizzazione della funzione dei miRNA è l'identificazione dei mRNA bersaglio

Poiché la complementarietà tra miRNA e mRNA taget non è perfetta molto probabilmente ciascun miRNA può regolare un ampio numero di geni
Sono stati sviluppati molti algoritmi per predire i geni bersaglio:

MiRTarBase
Diana-microT
miRanda
MICRORNA.ORG
MIRDB
RNA22-HSA
TARGETMINER
TARGETSCAN-VERT
PICTAR-VERT



Ma ogni bersaglio predetto deve essere validato in laboratorio!

Target

miRNA-Target Interaction Search Results - Mozilla Firefox

File Modifica Visualizza Cronologia Segnalibri Strumenti Aiuto

miRNA-Target Interaction Search Results

mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php?q=search_exact&se.hword=hsa-miR-17-5p

miRTarBase Home

Search... Search Example

Page 1 of 11 1 2 3 ... 11 Next ›

					Validation methods								
					Strong evidence			Less strong evidence					
ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other	Sum	# of papers
MIRT000256	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	ZNFX1	✔				✔		✔	3	2
MIRT000257	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	CCL1	✔						✔	2	1
MIRT000258	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	GPR137B	✔						✔	2	1
MIRT000259	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	NABP1	✔						✔	2	1
MIRT000261	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	NPAT	✔						✔	2	1
MIRT000263	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	YES1	✔						✔	2	1
MIRT000482	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	JAK1	✔	✔					✔	3	2

Target

miRNA-Target Interaction Search Results - Mozilla Firefox

File Modifica Visualizza Cronologia Segnalibri Strumenti Aiuto

miRNA-Target Interaction Search Results

mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php?q=search_exact&se...

miRTarBase Home

Search... Search Example

Page 1 of 2 1 2 Next ›

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other		
MIRT035908	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	FAM200B					✔			1	1
MIRT035910	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	SYNRG					✔			1	1
MIRT035911	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	KLC4					✔			1	1
MIRT035912	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	FUT7					✔			1	1
MIRT035913	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	TRAP1					✔			1	1
MIRT035914	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	RFWD2					✔			1	1
MIRT035915	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	STIP1					✔			1	1
MIRT035916	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	C16orf62					✔			1	1
MIRT035917	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	THOC2					✔			1	1
MIRT035918	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	BAZ2A					✔			1	1
MIRT035919	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	HPS4					✔			1	1
MIRT035920	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	GNB2L1					✔			1	1
MIRT035921	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	PSMD1					✔			1	1
MIRT035922	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	BAMBI					✔			1	1
MIRT035923	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	HIST1H2BK					✔			1	1
MIRT035924	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	TBX1					✔			1	1
MIRT035925	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	EZR					✔			1	1
MIRT035926	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	USP9X					✔			1	1
MIRT035927	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	TAF3					✔			1	1

MiRNA: funzioni negli stati di normalità

Poiché si scoprono miRNA nuovi tutti i giorni è evidente che questi piccoli geni potrebbero essere coinvolti nella normale omeostasi cellulare

I miRNA partecipano a processi biologici essenziali:

- **proliferazione cellulare**
- **destino della linea B ematopoietica**
- **pattern del cervello**
- **secrezione di insulina dalle cellule del pancreas**
- **sviluppo degli adipociti**
- **meccanismi biologici coinvolti nell'embriogenesi**

……..

- **Ma anche nello sviluppo di diverse patologie…**

MiRNA: funzioni negli stati di malattia

Poichè i miRNA partecipano a molte normali funzioni ci si è chiesto se anormalità nei miRNA potessero avere importanza in alcune malattie.

Infatti i miRNA sono stati visti coinvolti in molte malattie

I miRNA possono agire sia

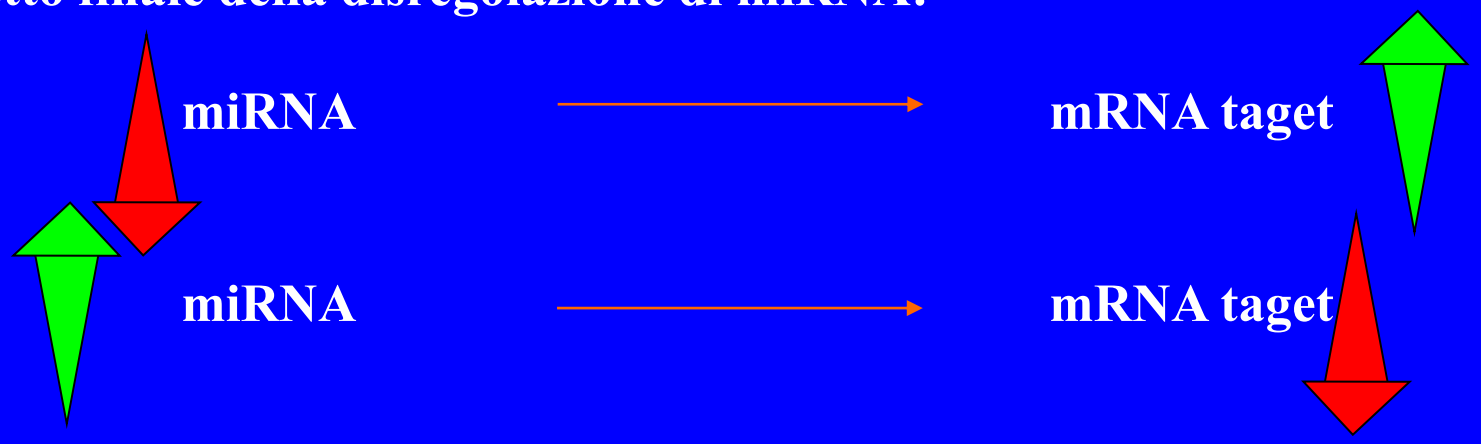
oncogeni

oncosoppressori

Sono stati dimostrati meccanismi di inattivazione o attivazione di determinati miRNA.

MiRNA: funzioni negli stati di malattia

L'effetto finale della disregolazione di miRNA:



Nel caso di inattivazione di un miRNA si avrà la sovraespressione dell'mRNA bersaglio mentre l'attivazione di un miRNA porterà alla down-regolazione dell'mRNA target che potrebbe essere coinvolto in:

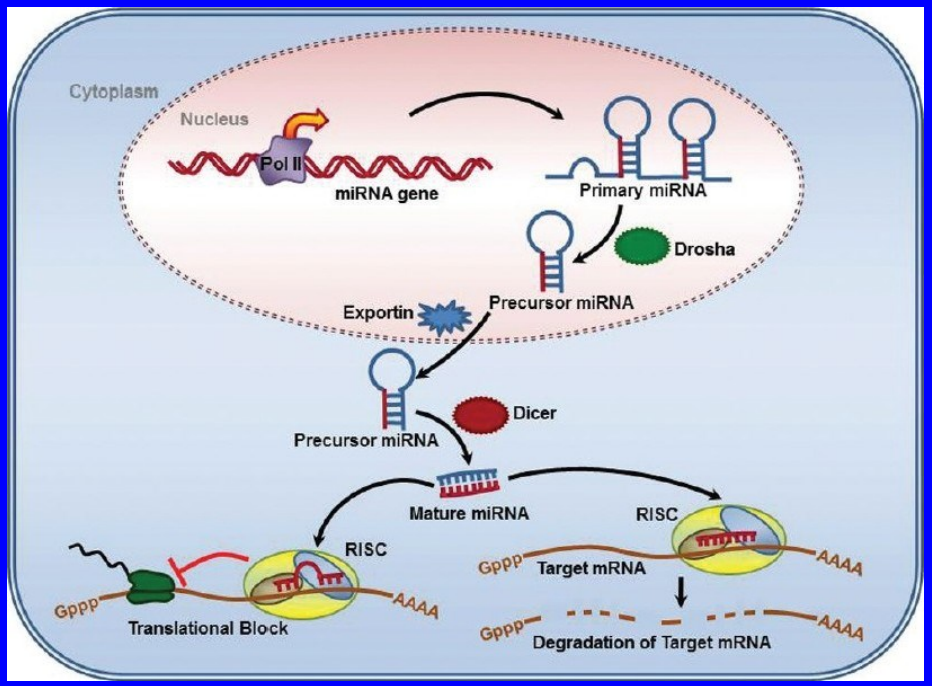
Apoptosi
Ciclo cellulare
Invasione
Angiogenesi

Quindi la disregolazione dell'espressione dei miRNA intracellulari è stata associata a molte condizioni patologiche.

Interazioni miRNA-mRNA con importanza per il cancro

MiRNA	Azione nel cancro	Referenza
famiglia miRNA let-7	Regola gli oncogeni RAS: Let-7 ha una bassa espressione nei tumori del polmone rispetto al polmone normale e la proteina RAS ha una variazione inversa	Johnson 2005
Cluster mir-17-92	L'aumento di espressione insieme a c-myc, accelera lo sviluppo tumorale in un modello di linfoma delle cellule B del topo	He 2005
Cluster mir-17-92: miR-17-5p miR-20a	Regolano negativamente il fattore di trascrizione E2F1, un gene che funziona come un soppressore del tumore	O'Donnel 2005
mir-189	Coinvolto nella sindrome di Tourette (TS), una patologia neurologica: il mir-189 potrebbe influenzare l'espressione del gene SLITRK1	Abelson 2006
Mir-221 Mir-222 Mir-146	Sono overespressi nel tumore della tiroide e interagiscono con l'oncogene c-KIT	He 2005

Non solo MicroRNA cellulari…..



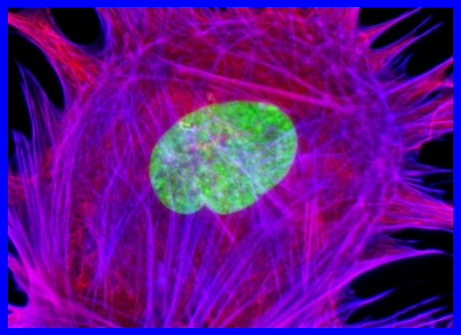
… ma anche…..

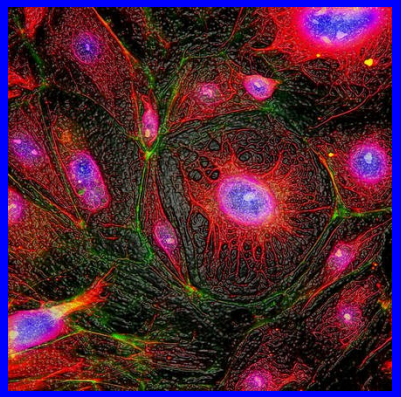
MiRNA circolanti

I miRNA possono essere trasportati al di fuori delle cellule e forse possono essere usati come indici diagnostici extracellulari per la diagnosi e la terapia di alcune patologie.

I miRNA circolanti nei fluidi biologici, miRNA extracellulari, rappresentano una nuova forma di comunicazione intercellulare attraverso

il trasferimento di informazioni genetiche



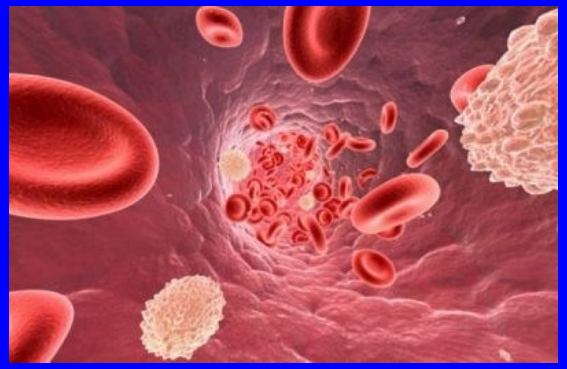


da una cellula donatrice **a una cellula accettrice**

MiRNA circolanti

Quando sono stati individuati dei miRNA extracellulari come biomarkers di patologie è divenuto evidente che i miRNA possono essere esportati dalle cellule e si trovano in molti fluidi biologici come:

- Plasma
- Siero
- Saliva
- Urine
- Lacrime
- Latte materno

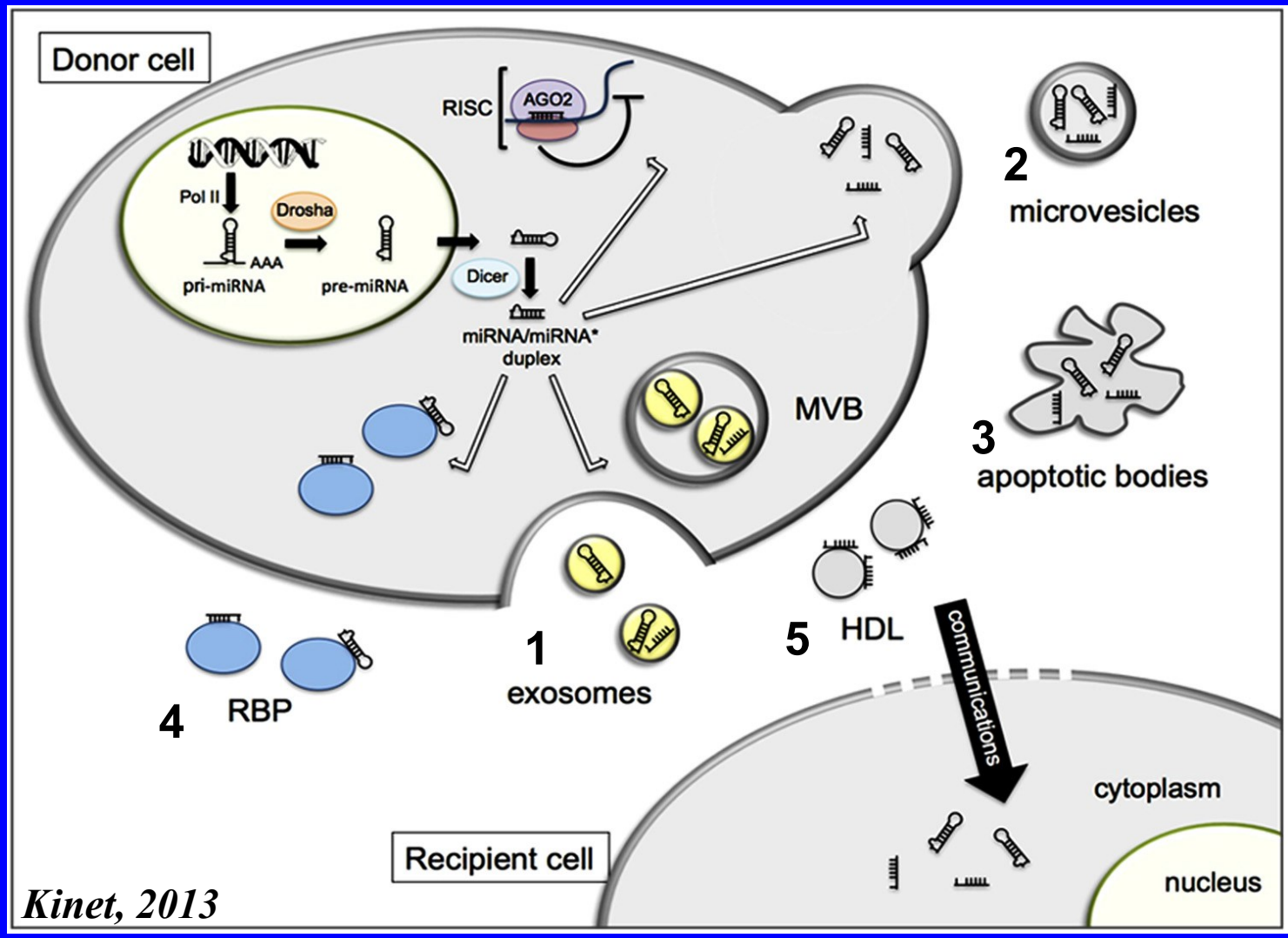


I miRNA extracellulari sono inaspettatamente stabili e devono essere protetti dalla degradazione, poiché l'RNA nudo è prontamente bersagliato dalle esonucleasi che sono abbondantemente presenti in molti fluidi extracelluari. Quindi i miRNA sono impacchettati grazie a 5 diversi meccanismi:

1. Esosomi
2. micro-vescicole o micro-vescicole di distaccamento (SMVs)
3. corpi apoptotici
4. proteine che legano l'RNA
5. HDL

MiRNA circolanti

Il miRNA una volta maturo può essere incorporato nel RISC e appaiare con il suo mRNA target e reprimerne la traduzione o indurre la sua degradazione.



Kinet, 2013

Oppure il miRNA maturo può essere esportato fuori dalla cellula e trasportato da 5 diversi carrier

Infine i miRNA extracellulari possono essere trasferiti a cellule riceventi dove possono alterare l'espressione genica

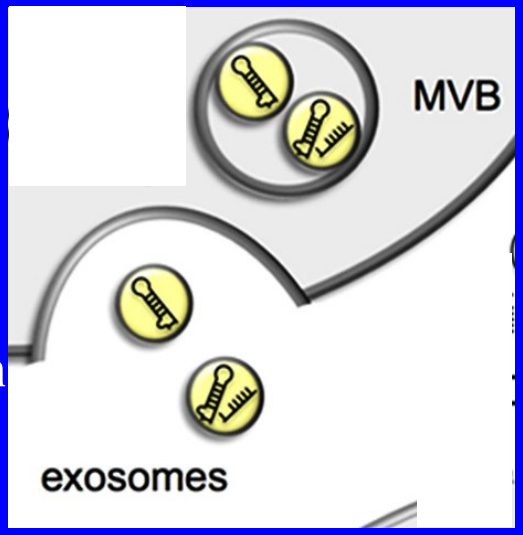
Carrier dei MiRNA circolanti

1. **ESOSOMI:**

Micro-vescicole extracellulari piccole (40-120 nm) che si originano da corpi multi-vescicolari (MVBs) e sono rilasciate tramite esocitosi di questi MVBs.

Prodotti da molti tipi di cellule:

- **Epiteliali**
- **Ematopoietiche**
- **Endoteliali**
- **Tumorali**



Gli esosomi sono stati identificati in molti fluidi circolan

- **Plasma**
- **Urine**
- **Latte**
- **Saliva**
- **Sperma**

L'interesse nella biologia degli esosomi è aumentata in seguito alla dimostrazione che essi possono servire da carrier dei miRNA

Processi di selezione devono avere luogo per caricare i miRNA negli esosomi: probabilmente esistono meccanismi cellulari che attivamente concentrano specifiche specie di miRNA negli esosomi

Carrier dei MiRNA circolanti

2. <u>MICRO-VESCICOLE</u>

O MICRO-VESCICOLE DI DISTACCAMENTO (SMVS):

sono un'altra forma di vescicole piccole e definite che si distaccano dalla membrana plasmatica di una grande varietà di cellule

Dimensioni: 0.1-1 μm: sono più grandi degli esosomi e il loro meccanismo di produzione è diverso

Mentre gli esosomi sono prodotti da una fusione esocitotica di MVBs, le micro-vescicole sono prodotte da una germogliazione di vescicole dalla membrana plasmatica

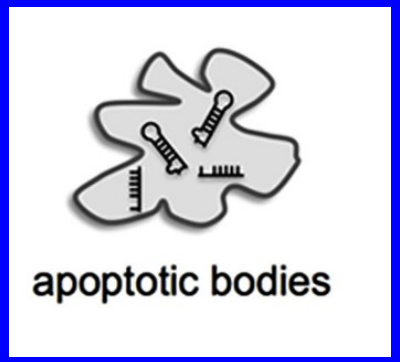
La presenza di miRNA nelle micro-vescicole è descritta dal 2008.

Carrier dei MiRNA circolanti

3. <u>CORPI APOPTOTICI</u> o vescichette apoptotiche

Le cellule apoptotiche o che stanno morendo rilasciano vescicole di membrana nell'ambiente extracellulare.

Sono grandi particelle (1-5 μm) con forma eterogenea.



Per esempio è stato dimostrato che nell'Aterosclerosi: le cellule endoteliali producono corpi apoptotici ricchi di <u>mir-126</u>. Questo porta le cellule accettrici a produrre una chemochina che limita l'aterosclerosi e conferisce stabilità alle placche

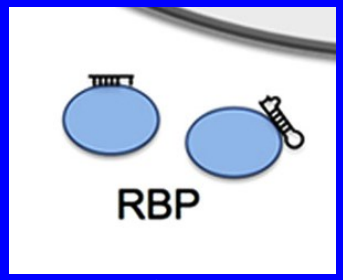
Carrier dei MiRNA circolanti

4. PROTEINE CHE LEGANO L'RNA

una significativa frazione di miRNA extracellulari è associata a proteine che legano l'RNA e che li proteggono dalla degradazione:

Es:

NPM1: nucleofosmina

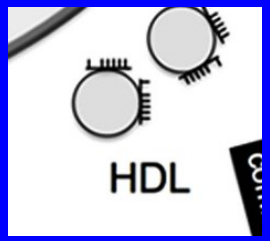


Proteine della famiglia delle Argonaute:

Ago2, 1, 3, 4 (ma alcuni studi sono in disaccordo)

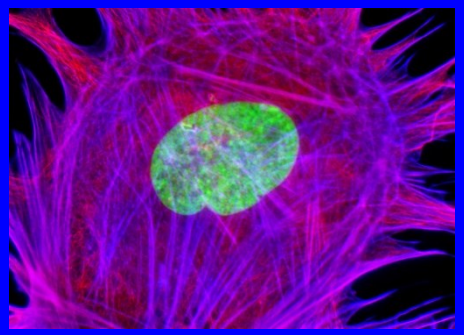
5. HDL

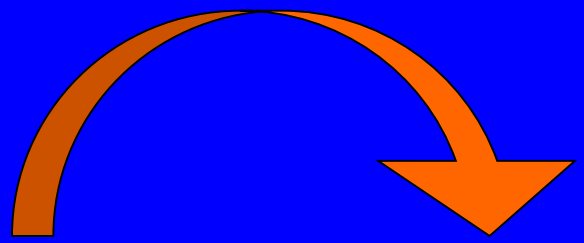
i miRNA extracellulari possono essere trasportati anche dalle HDL. Mentre le vescicole di trasporto sono composte da un doppio strato fosfolipidico, le lipoproteine hanno un singolo strato di lipidi.

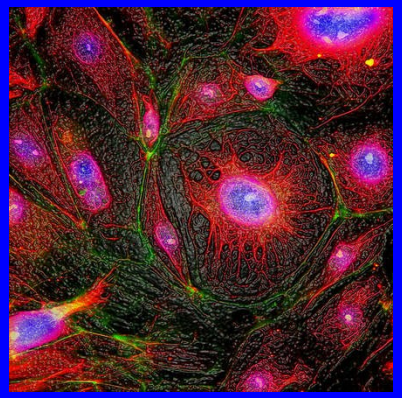


MiRNA circolanti nella comunicazione cellula-cellula

il trasferimento di informazioni genetiche







da una cellula donatrice **a una cellula accettrice**

Questa forma di trasferimento tra cellule è di rilevanza funzionale esercitando <u>silenziamento genico nelle cellule riceventi</u>

Questa può spiegare → **come un miRNA possa influenzare un tipo cellulare o un tessuto in cui esso non viene prodotto**

↓

come cellule adiacenti all'interno di un organo possano comunicare

Questa forma di comunicazione è coinvolta:
nella regolazione dell'immunità *(Mittelbrunn, 2011)*
nella migrazione cellulare *(Zhang, 2010)*
nello sviluppo dei tumori *(Yang, 2011)*

MiRNA circolanti come marcatori diagnostici tumorali

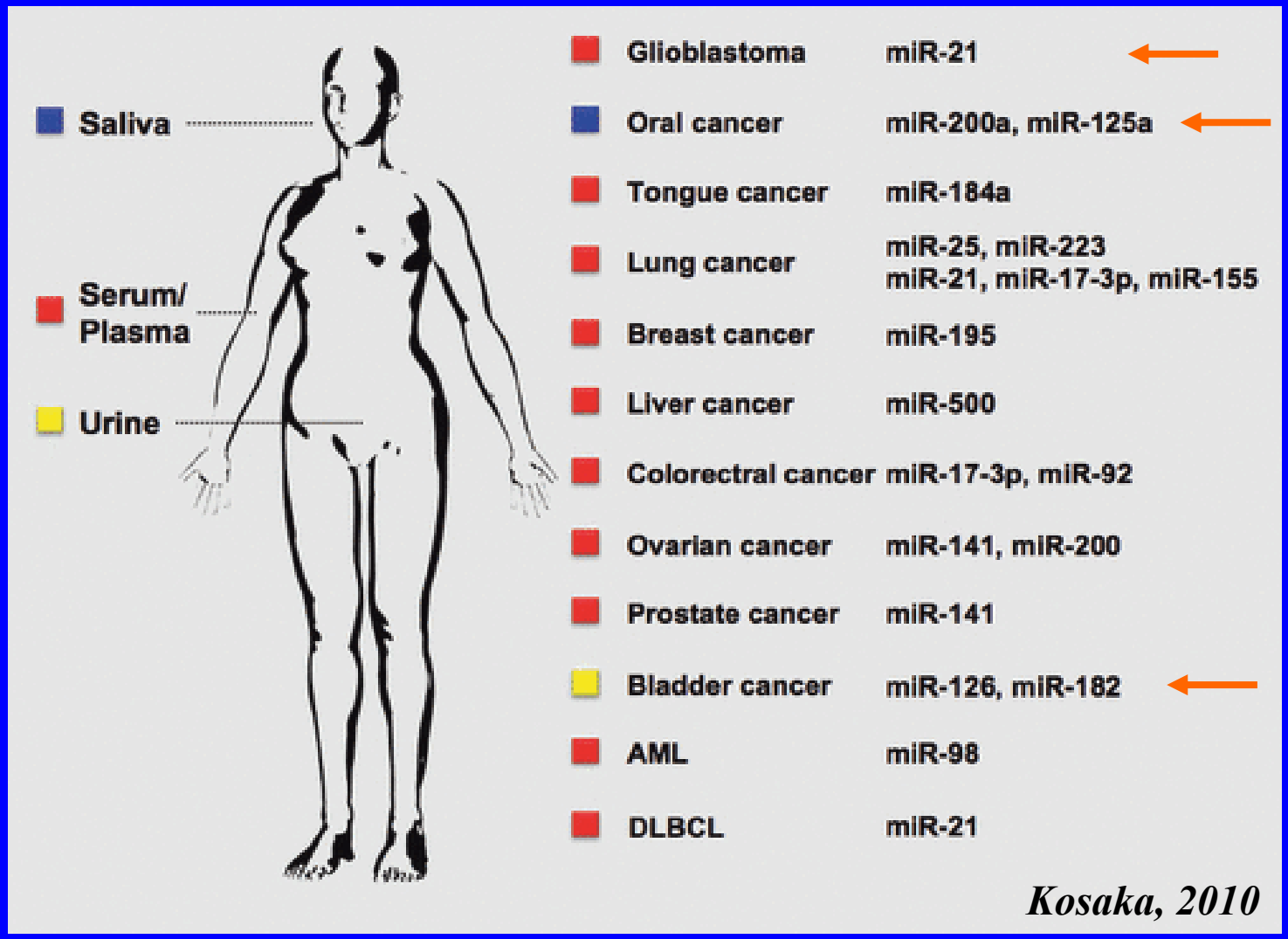
Sulla base della scoperta che i microRNA circolano nel sangue, è stata fatta l'ipotesi che essi abbiano, un ruolo di biomarcatori associati allo sviluppo di patologie

miRNAs nei fluidi del corpo umano sono
<u>marcatori diagnostici tumorali</u>
non invasivi

Molti tipi di miRNA circolanti sono stati riportati in molti tipi di cancro.
In alcuni casi, miRNA circolanti in siero, saliva ed urina sono buoni candidati per un futuro utilizzo

Tuttavia alcuni tipi di cancro <u>non possono essere diagnosticati</u> conoscendo i biomarcatori sierici.

MiRNA circolanti come marcatori diagnostici tumorali



AML:

acute myeloid leukemia

DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma

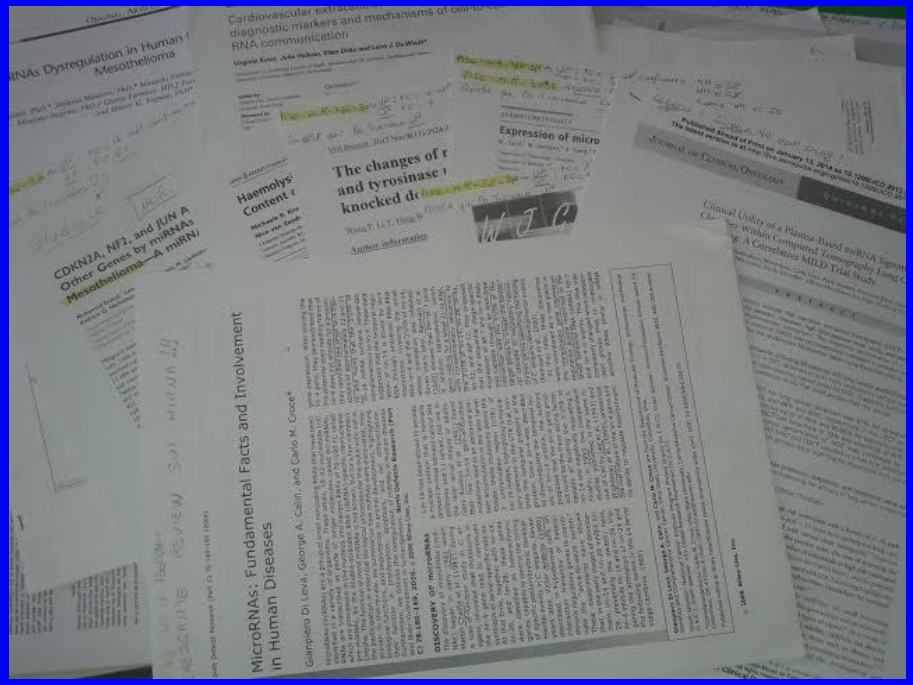
Qui sono riassunte ricerche recenti che mostrano l'esistenza di miRNA circolanti nel fluidi di pazienti con il cancro

Conclusioni: hot topic!!!

Facendo una ricerca su Pub-Med si trovano quasi 12000 articoli nel 2019 sui miRNA…

I miRNA sono una rivoluzione nella comprensione della biologia cellulare…

C'è ancora molto da lavorare….. e molto da leggere…….



Grazie per l'attenzione!