

Sommario

Lo spliceosoma ed il microprocessore sono complessi molecolari che agiscono sull'RNA nascente (pre-mRNA). Entrambi i complessi tagliano il pre-mRNA per produrre rispettivamente l'RNA messaggero ed il microRNA (miRNA) maturo. Il preciso riconoscimento della giunzione tra introne ed esone da parte dello spliceosoma avviene grazie alla presenza di elementi regolatori dello splicing, che, interagendo con proteine attivatorie o inibitorie, favoriscono la selezione dei corretti siti di splicing. RNA, che formano una struttura secondaria a forcina (pri-miRNA), vengono invece riconosciuti e processati dal complesso del microprocessore.

Durante l'attività di ricerca, ho approfondito la relazione tra l'attività del microprocessore e dello spliceosoma nel processamento di un particolare gruppo di miRNA, gli SO-miRNA (microRNA che si sovrappongono ai siti di splicing), la cui struttura secondaria è localizzata a livello della giunzione tra introne ed esone. Nella prima fase del mio progetto di ricerca ho focalizzato l'attenzione sullo SO-miR-34b, la cui struttura secondaria, situata a livello della giunzione tra introne 1 ed esone 2 di una unità trascrizionale non codificante, contiene al suo interno un sito accettore di splicing (3'ss). L'utilizzo di un sistema di minigeni ha permesso l'identificazione di una sequenza di ramificazione (branch point) localizzata all'interno della struttura secondaria del pri-miRNA e di un enhancer di splicing esonico (ESE) ricco in purine, localizzato nell'esone 2, che risultano essere necessari per il corretto riconoscimento del 3'ss. L'inibizione dello splicing, attraverso l'introduzione di mutazioni a livello del 3'ss o della sequenza esonica identificata, si riflette in un aumento della produzione del miR-34b maturo. Contrariamente, il silenziamento dei due componenti del microprocessore Droscha ed il suo co-fattore DGCR8 abolisce la produzione del miR-34b maturo e migliora l'efficienza dello splicing. La loro overespressione produce, come atteso, il risultato opposto. La produzione dell'mRNA maturo o del miR-34b a partire dallo stesso trascritto primario è, pertanto, regolata in maniera antagonista dallo spliceosoma e dal microprocessore.

Per valutare l'influenza generale dello splicing sul processamento dei miRNA, ho analizzato l'effetto del silenziamento del fattore SF3b1 (componente del complesso U2 snRNP, coinvolto nel riconoscimento del 3'ss e con un'alta frequenza di mutazioni in diverse patologie oncoematologiche) sulla produzione degli SO-miRNAs. Ho effettuato un'analisi globale mediante la tecnologia di sequenziamento di piccoli RNA (small RNA-seq) della differenza di espressione dei miRNA come conseguenza della modulazione dello splicing. Il silenziamento di SF3b1 correla con un arricchimento significativo degli SO-miRNA la cui produzione è incrementata nei campioni cellulari con deplezione di SF3b1, rispetto ai controlli non trattati, indicando che lo splicing ha un'influenza diretta sulla biosintesi degli SO-miRNA.

Per approfondire la relazione fra lo spliceosoma ed il microprocessore in un contesto fisiologico, ho analizzato tre SO-miRNA espressi nei cheratinociti: il miR-936, il miR-4260 ed il miR-711, appartenenti rispettivamente ai trascritti COL17A1, LAMB3 e COL7A1. Il livello di questi trascritti, espressi nello strato basale dell'epidermide, diminuisce durante il differenziamento dalla strato basale allo strato corneo ed è correlato ad un aumento di produzione dei rispettivi SO-miRNA. La trasfezione dei tre SO-miRNA esogeni inibisce la proliferazione dei cheratinociti, confermando il loro coinvolgimento nel processo di differenziazione.

Inaspettatamente il silenziamento di SF3b1 e la differenziazione dei cheratinociti non causano un cambiamento del pattern di splicing degli esoni che comprendono parte degli SO-miRNA. L'analisi dei dati provenienti dal sequenziamento della cromatina dimostra che la deplezione di Droscha è correlata ad un aumento del livello di trascrizione dei trascritti nascenti a valle dei siti di taglio degli SO-miRNA, suggerendo che il Microprocessore può causare una prematura terminazione della trascrizione dei trascritti che contengono uno SO-miRNA.

La competizione tra lo spliceosoma ed il microprocessore rappresenta un nuovo modo per regolare la produzione di due differenti prodotti genici a partire da un unico trascritto primario. Si ipotizza che alcuni SO-miRNA possano fungere da segnali di terminazione interni ai trascritti e, quando attivati, stimolano la produzione dei miRNA maturi, inibendo la maturazione dei trascritti che sono rapidamente degradati.