

Regolazione
dello splicing alternativo
mediante
modificazioni istoniche



Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications

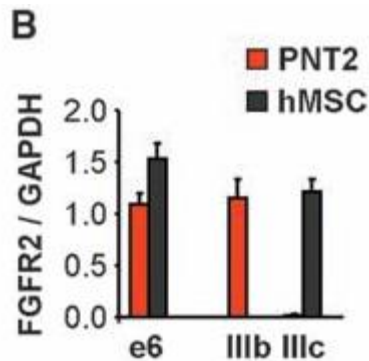
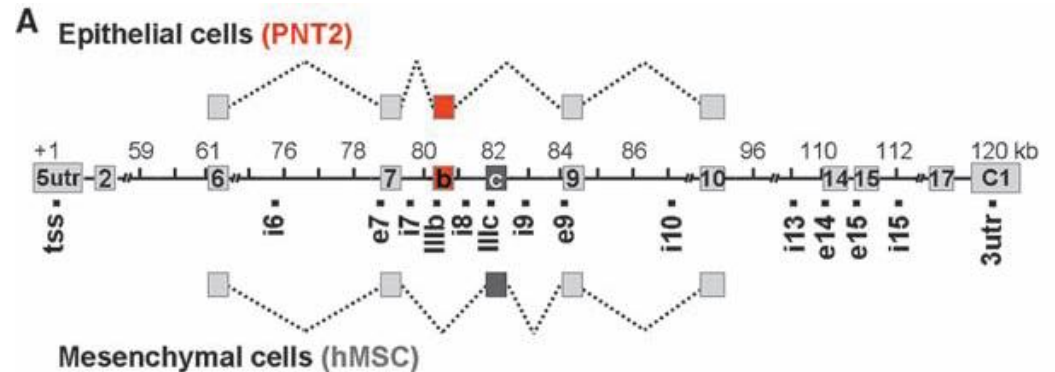
Reini F. Luco,¹ Qun Pan,² Kaoru Tominaga,³ Benjamin J. Blencowe,² Olivia M. Pereira-Smith,³ Tom Misteli^{1*}

Dimostrazione che le modificazioni degli istoni hanno un ruolo nello splicing alternativo:

- esiste una diretta corrispondenza tra le modificazioni istoniche e il prodotto dello splicing;
- la modulazione di tali modificazioni causa variazioni del sito di splicing, influenzando il reclutamento delle proteine che legano la cromatina e promuovono lo splicing.
- la mappatura delle modificazioni istoniche ha rivelato una distribuzione non casuale dei nucleosomi e delle modificazioni sugli esoni.

Il gene studiato è il gene umano FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor*, recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti). Questo ha uno splicing alternativo conosciuto:

Rappresentazione schematica del gene FGFR2 gli esoni IIIb e IIIc sono mutualmente esclusivi e tessuto specifici.



Le cellule **PNT2** (cellule normali dell'epitelio prostatico) includono l'esone IIIb

Le cellule **hMSC** (cellule mesenchimali staminali) includono l'esone IIIc

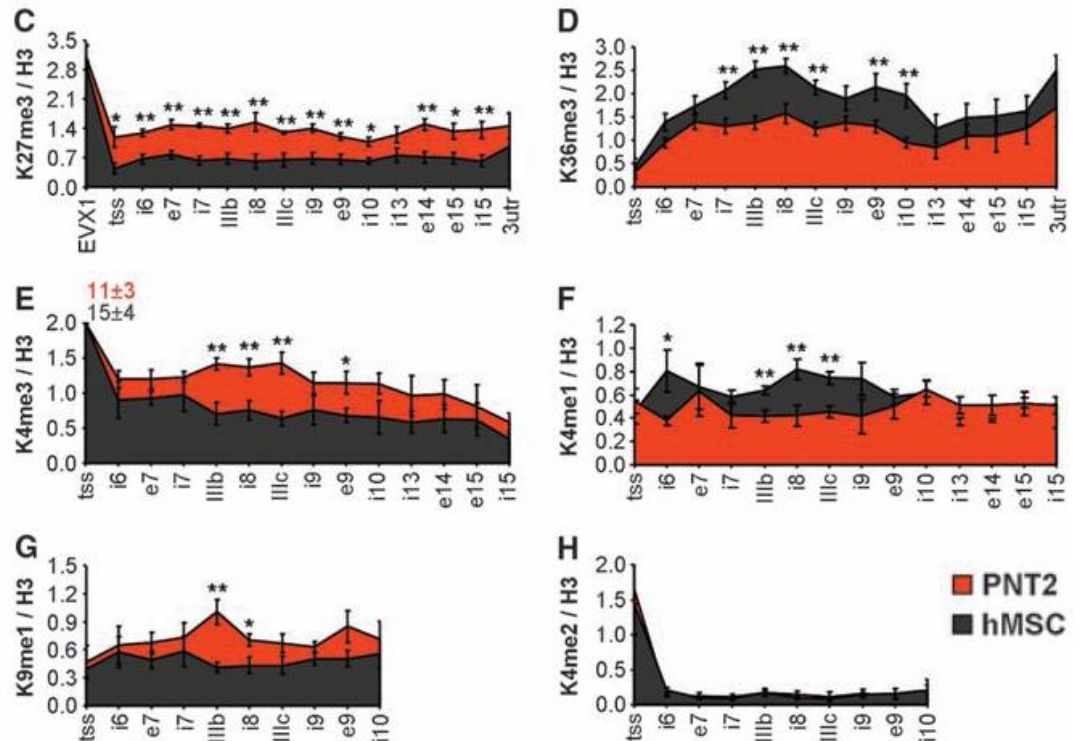
La differente inclusione di questi esoni è influenzata da PTB (*polypyrimidine tract-binding protein*, proteina legante un tratto di polipirimidine), che si lega vicino all'esone IIIb determinando la sua repressione.

Sono stati mappati tramite chip quantitativa le modificazioni istoniche nelle cellule PNT2 e hMSC nelle regioni coinvolte nello splicing alternativo :

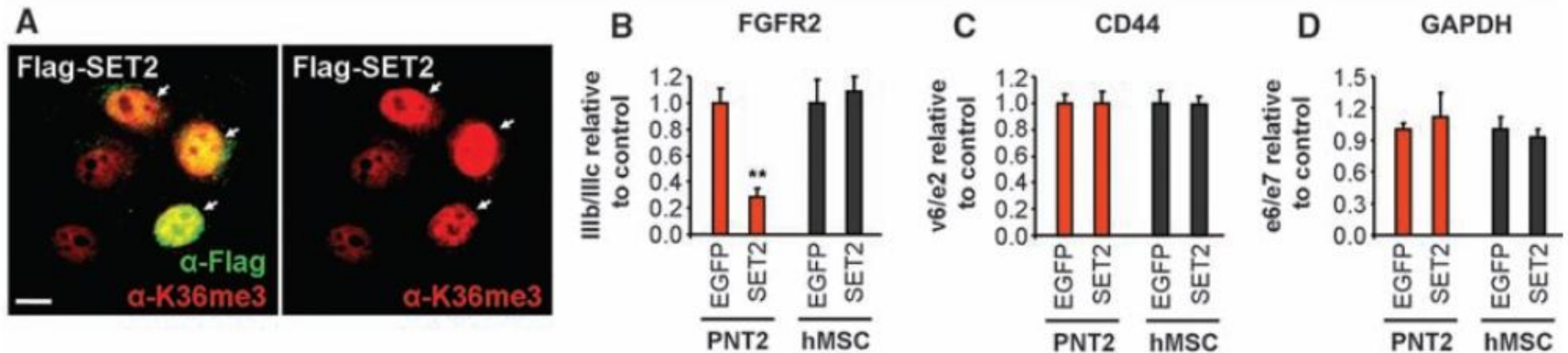
I livelli di H3-K4me2 non presentano alcuna differenza (H)

i livelli di H3-K36me3 e H3-K4me1 sono più abbondanti in hMSC (IIIb represso) (D-F)

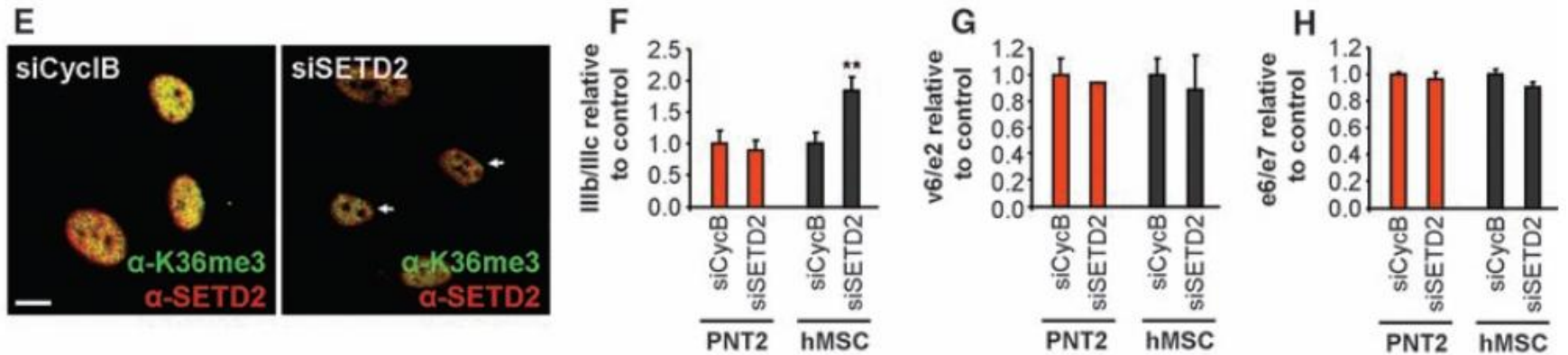
i livelli di H3-K27me3, H3-K4me3 e H3-K9me1 sono più abbondanti in PNT2 (IIIb non represso) (C-E-G)



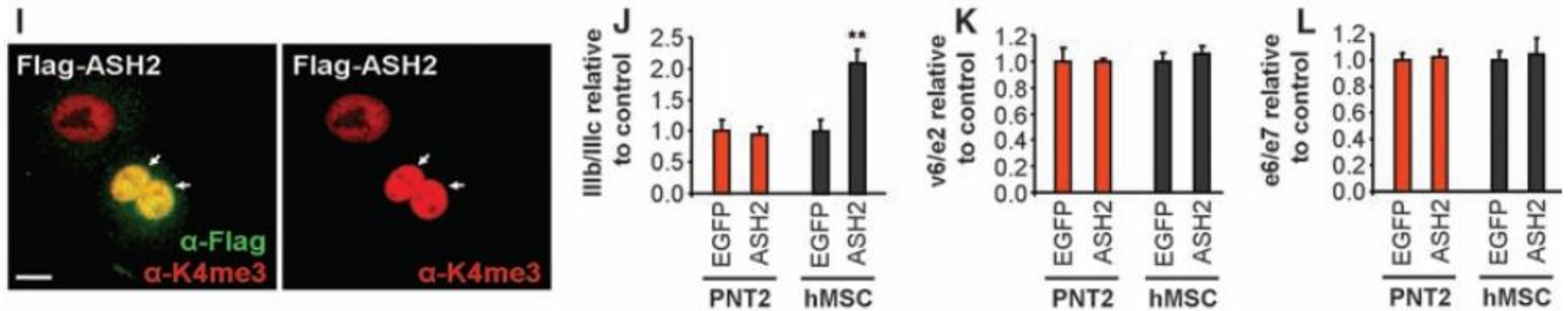
Per capire come le modificazioni istoniche determinino la selezione del sito di splicing si è andati a modulare i livelli di H3-K36me3, che è la modificazione in cui la differenza tra i due tipi cellulare è maggiore



Aumentando l'espressione di SET2 (metiltransferasi che responsabile della metilazione di H3-K4) si ha un conseguente aumento della metilazione H3-K36me3 che determina la riduzione dell'inclusione dell'esone IIIb in cellule PNT2 (osservata tramite PCR real-time).



Una down-regolazione di SET2 tramite RNAi promuove l'inclusione dell'esone IIIb anche in cellule hMSC

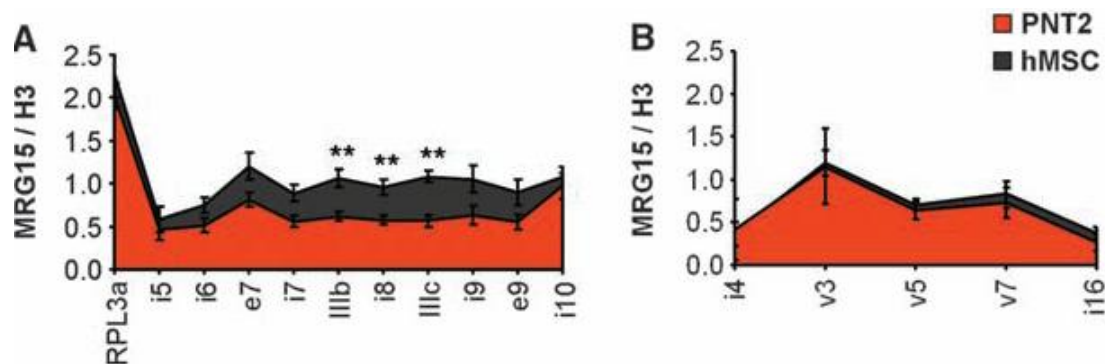


Come atteso, una up-regolazione di ASH2 responsabile della modificazione H3-K4me3 tipica delle cellule PNT2 induce l'inclusione dell'esone IIIb anche nelle cellule hMSC

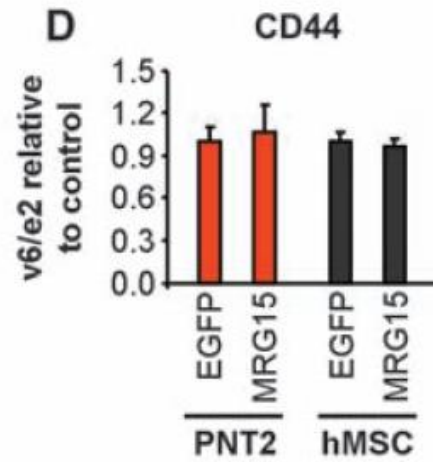
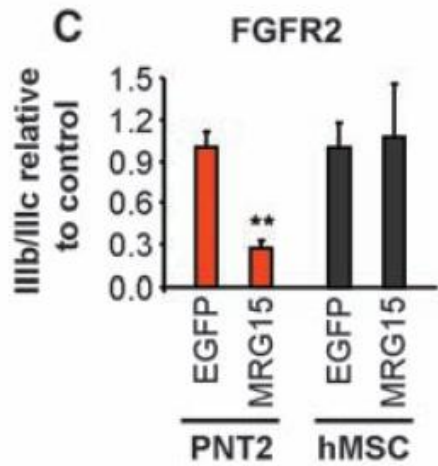
CONCLUSIONE:

le modificazioni istoniche influenzano la selezione dei siti di splicing

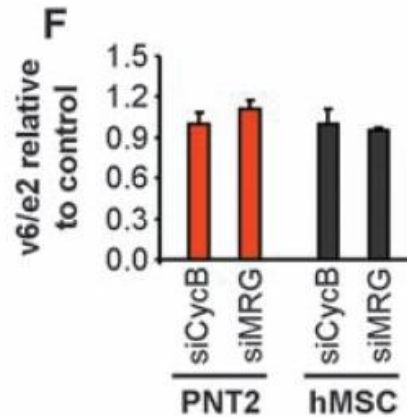
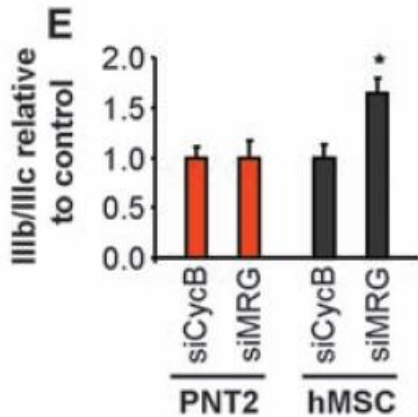
Per definire il meccanismo molecolare tramite il quale si verifica questa influenza è stata studiata la proteina MRG15 che si lega alla coda degli istoni e specificamente alla H3-K36me3



La distribuzione di MRG15 è analoga a quella delle H3-K36me3: è maggiormente presente nelle cellule hMSC, ma solo in cellule con splicing PTB dipendente (A). Il controllo con CD44 che ha splicing non PTB dipendente dimostra la stessa abbondanza di MRG15 nei due tipi cellulari



Una up-regolazione di MRG15 è sufficiente per forzare l'esclusione dell'esone IIIb anche nelle cellule PNT2.



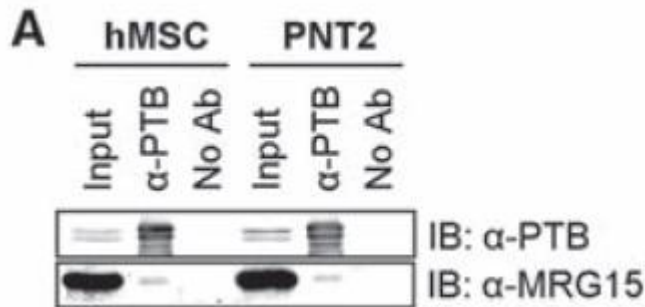
Una down-regolazione induce l'inclusione dell'esone anche nelle cellule hMSC.

Si conclude che MRG15 influenza la modulazione dello splicing PTB-dipendente.

Si ipotizza che MRG15 possa reclutare direttamente PTB tramite interazioni proteina-proteina

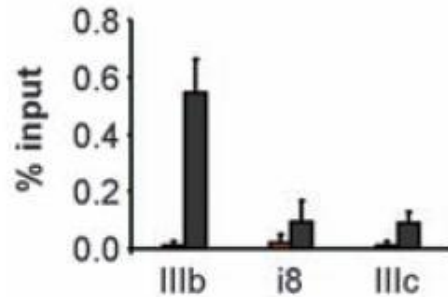


Esperienza di co-immunoprecipitazione

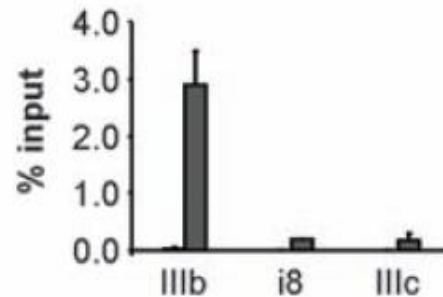


PTB co-immunoprecipita
MRG15 nei due tipi cellulari

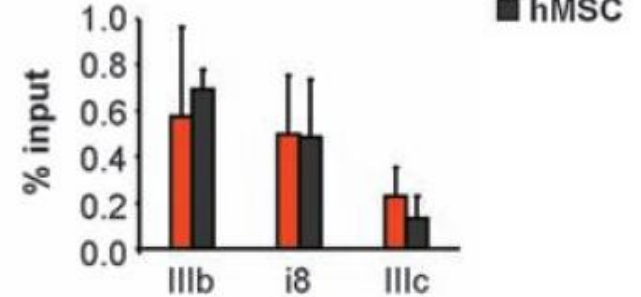
C RNA-IP α -PTB



D RNA-IP α -MRG15

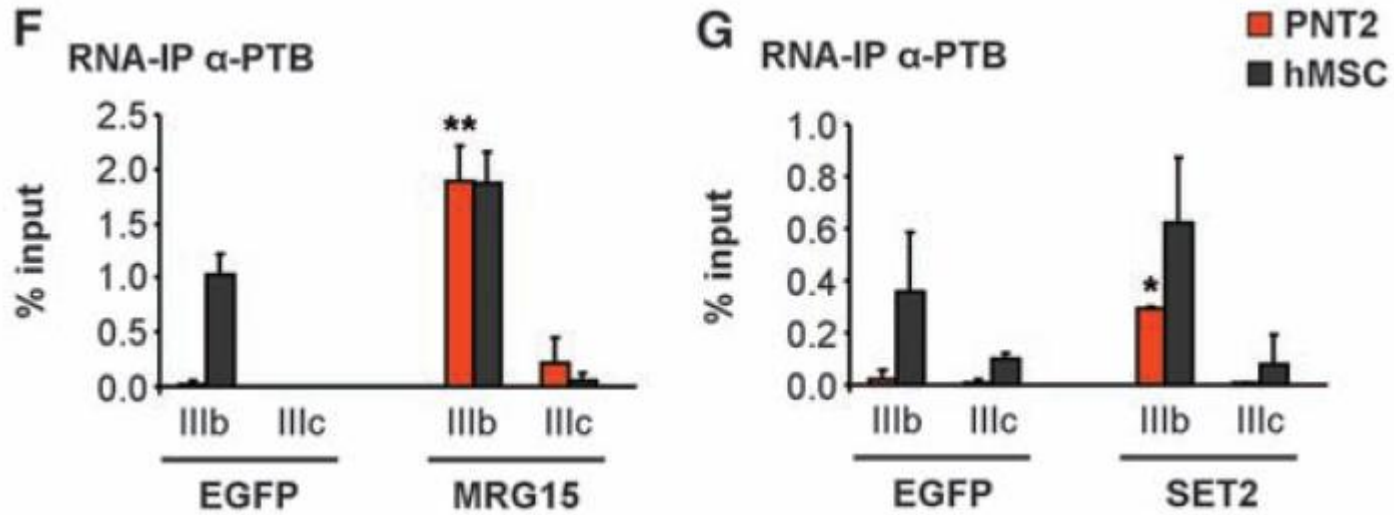


E RNA-IP α -SM

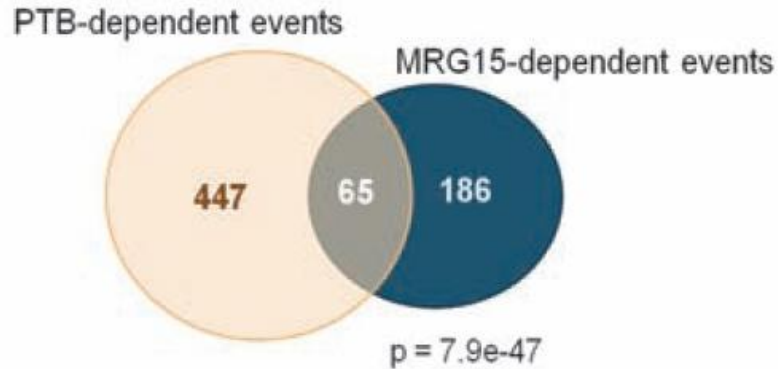


La localizzazione di PTB rispecchia quella di MRG15

Inoltre una up-regolazione di MRG15 induce un maggiore reclutamento di PTB anche in cellule PNT2



B



Analisi comparativa genome-wide dello splicing alternativo tramite silenziamento dei geni per PTB e per MRG15

12235 eventi di splicing analizzati:

- ✓ 447 cambiano in mancanza di PTB
- ✓ 186 cambiano in mancanza di MRG15
- ✓ 65 sono sensibili a entrambi

Quasi tutti i casi di codipendenza cambiano nella stessa direzione



C'è una relazione tra i fattori PTB e MRG15

CONCLUSIONE:

Le modificazioni istoniche (H3-K36me3) sono lette da proteine specifiche (MRG15) che reclutano i fattori di splicing (PTB)

