

Corso di
**Metodologie diagnostiche di
Biochimica e di Biologia molecolare**
modulo di Biologia molecolare

A.A. 2012/2013

Michela A. Denti
denti@science.unitn.it

Lezione 5:
RNA, trascrizione

Lezione 5

(17 ottobre 2012)

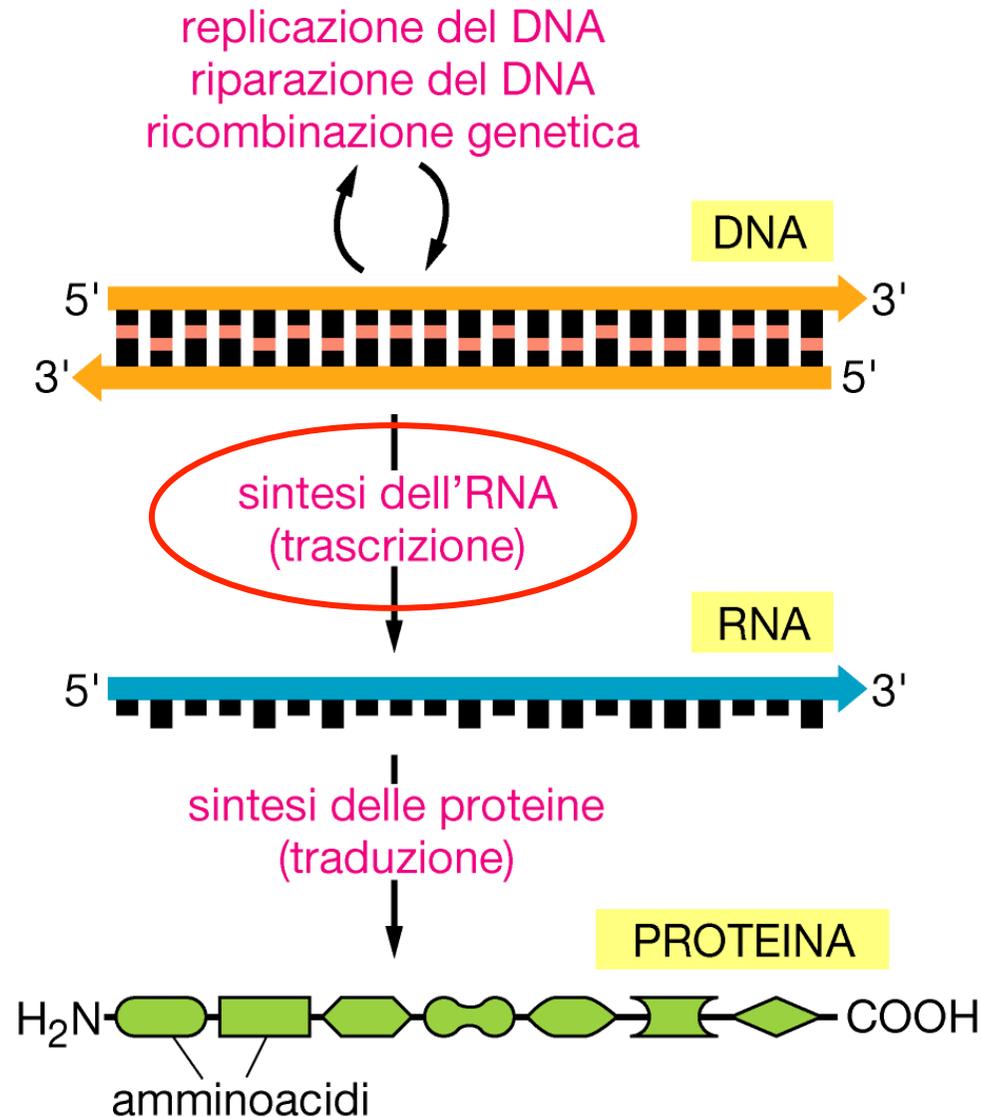
- La struttura e la versatilità dell'RNA.
- La trascrizione nei procarioti e negli eucarioti.

Allison cap. 4, 10, 11

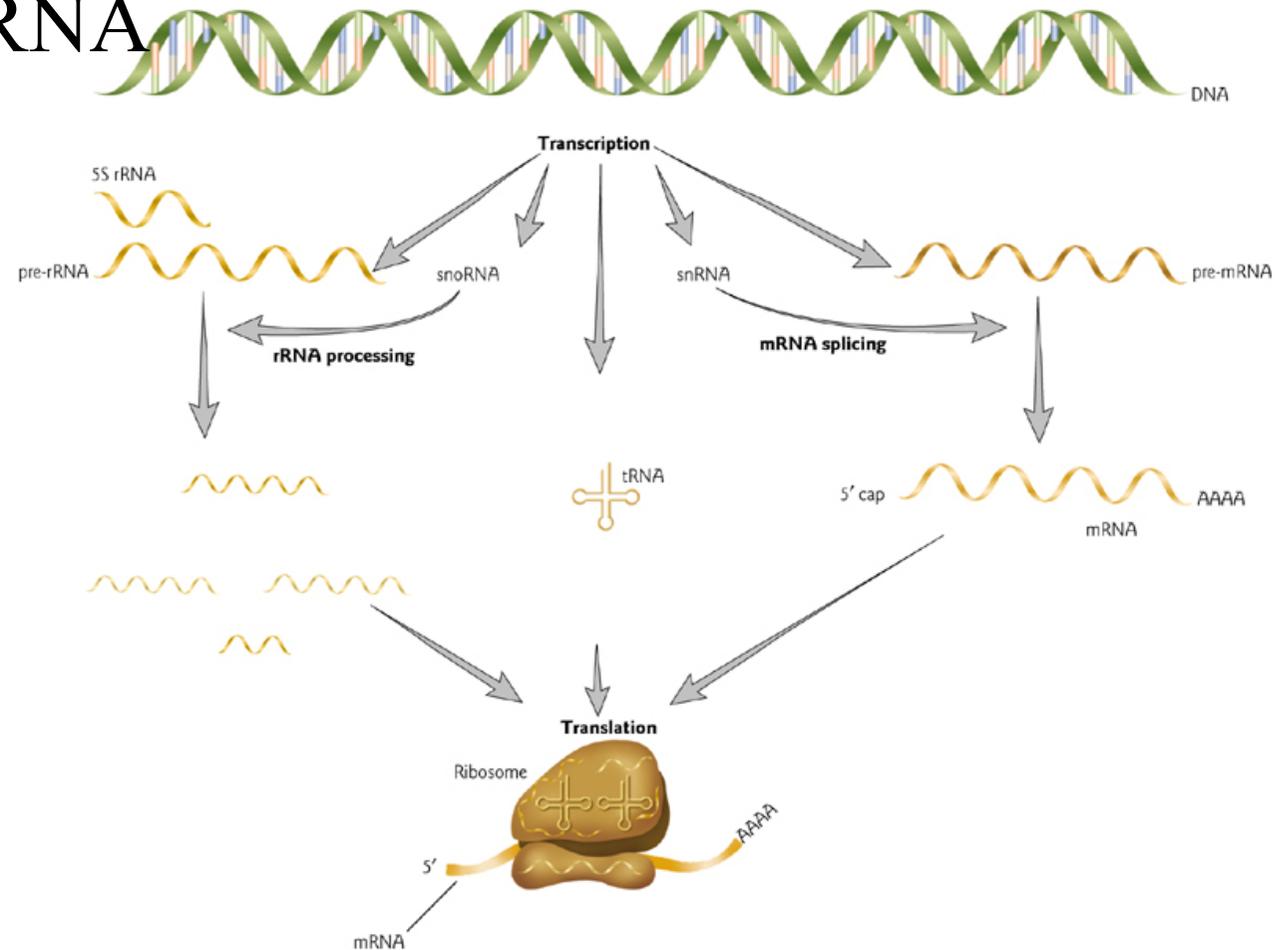
Alberts cap. 6

Watson cap. 6, 12

Dal DNA alle proteine. Il flusso dell'informazione genetica dal DNA all' RNA (trascrizione) e dall'RNA alle proteine (traduzione).



Funzioni dell'RNA



- mRNA** messenger RNA
- tRNA** transfer RNA
- rRNA** ribosomal RNA
- snRNA** small nuclear RNA
- snoRNA** small nucleolar RNA

- intermedio tra DNA e proteine
- decodifica il messaggio dell'mRNA
- struttura dei ribosomi (e catalisi)
- Splicing
- modifica l' RNA ribosomale

L' RNA può servire da “impalcatura” (“scaffold”) su cui le proteine si assemblano in maniera ordinata (es. signal recognition particle (SRP)).

l'RNA può avere funzione catalitica. Molecole di RNA chiamate “ribozimi” catalizzano molte reazioni che avvengono nella cellula.

Interazioni **RNA–proteina** influenzano l'attività catalitica delle proteine. In alcune RNP (Ribonucleoproteine) la proteina ha la funzione enzimatica, ma l'RNA è necessario per indirizzare l'enzima al suo substrato.

Un esempio di ciò è la telomerasi, in cui l'RNA serve da stampo per l'aggiunta di desossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs) da parte dell'attività di trascrittasi inversa

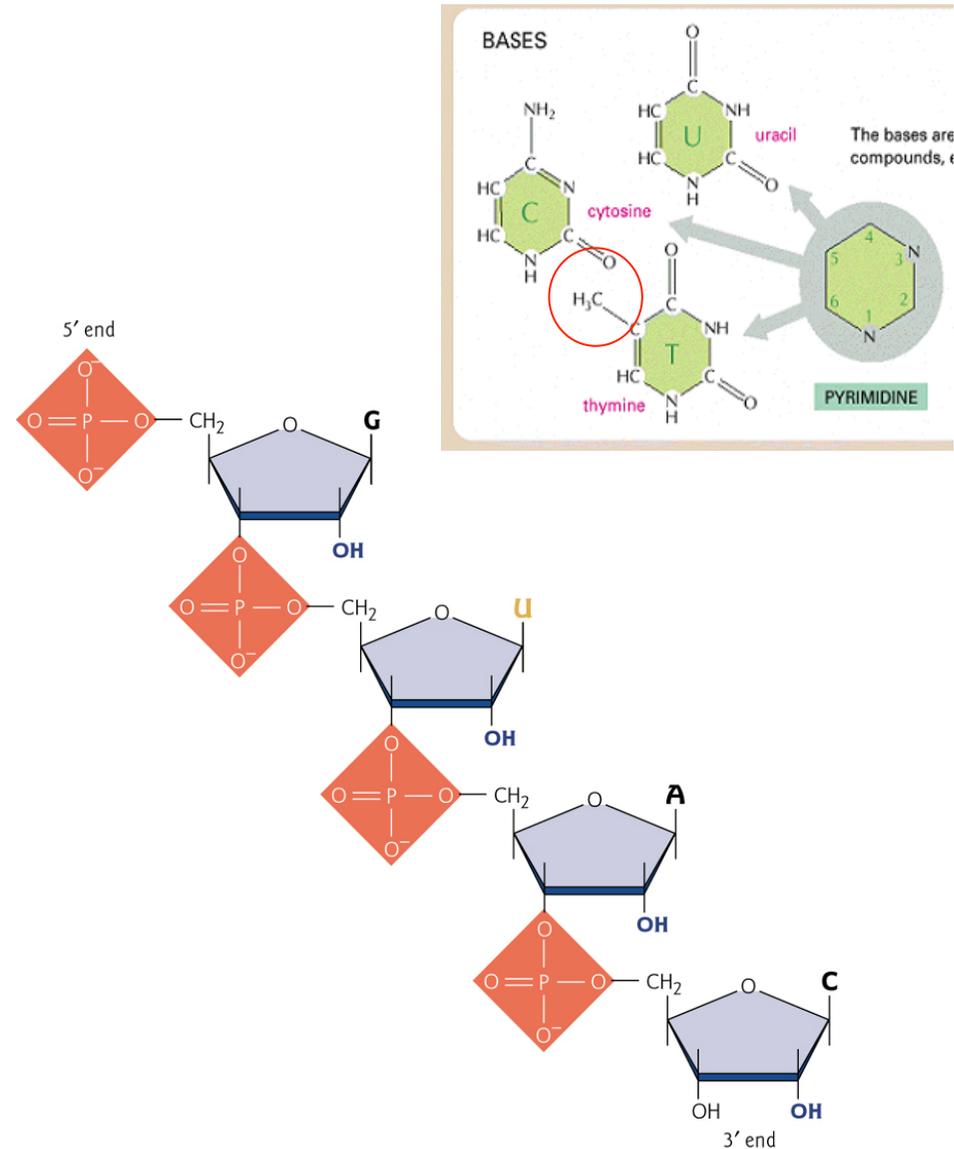
In altre RNP catalitiche, come l'RNAsi P (ribonucleasi P), è la porzione ad RNA, e non la proteina, ad avere funzione catalitica.

Piccoli RNA possono controllare direttamente l'espressione genica: riboswitches, microRNA, interferenza ad RNA, piccoli RNA nucleari etc.

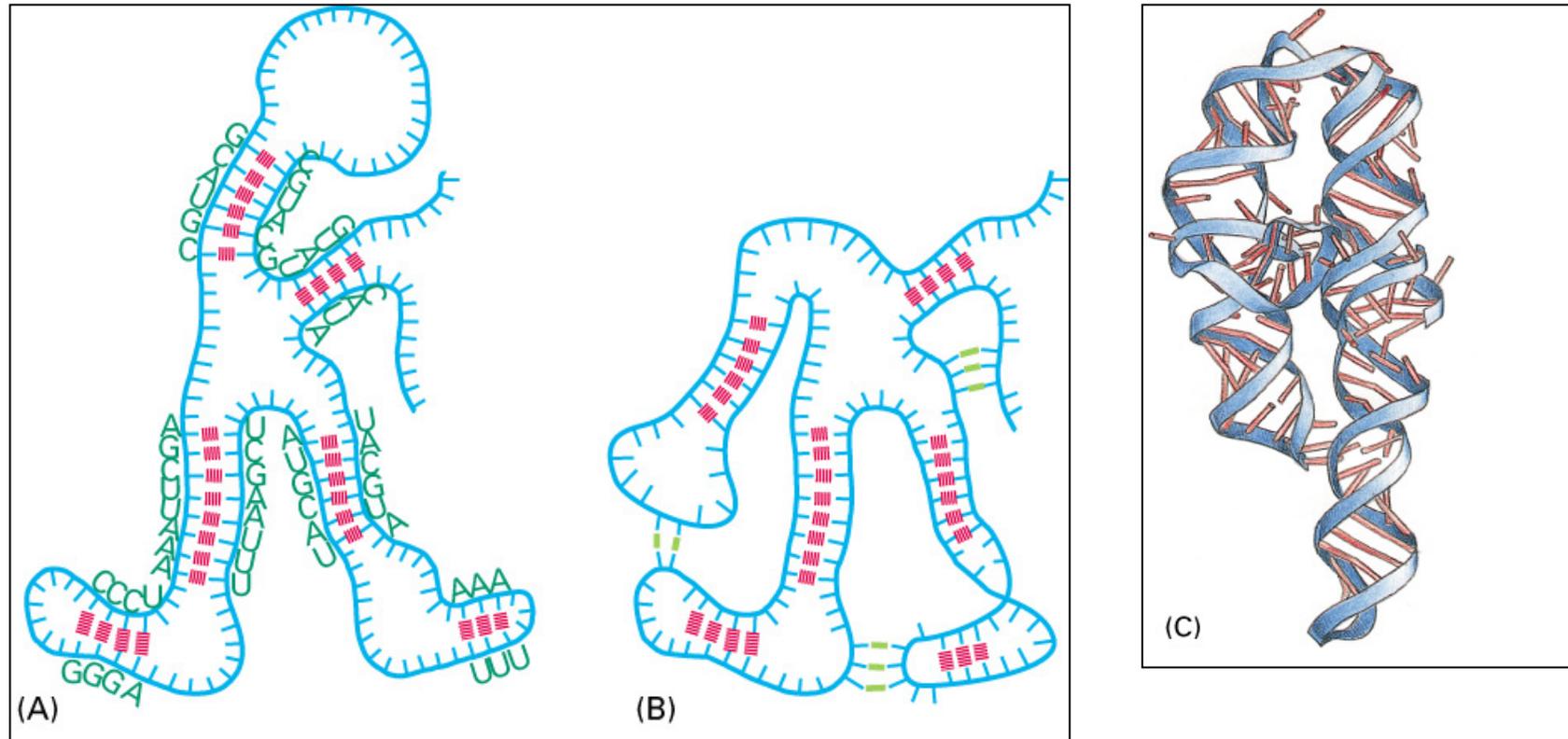
L'RNA può costituire il materiale ereditario. Molti virus hanno genomi ad RNA che replicano autonomamente o tramite un intermedio a DNA

L'RNA differisce dal DNA per tre caratteristiche

1. Lo scheletro è fatto di **ribosio** invece che desossiribosio. Il ribosio ha un 2'OH (idrossile) in posizione 2'.
2. L'RNA contiene la base **uracile** invece della timina. L'uracile ha la stessa struttura della timina (un singolo anello aromatico) ma non ha il gruppo metilico in posizione 5.
3. L'RNA è normalmente una **singola catena** polinucleotidica. Sebbene sia in grado di formare strutture a doppio filamento, tali strutture sono rare in natura.



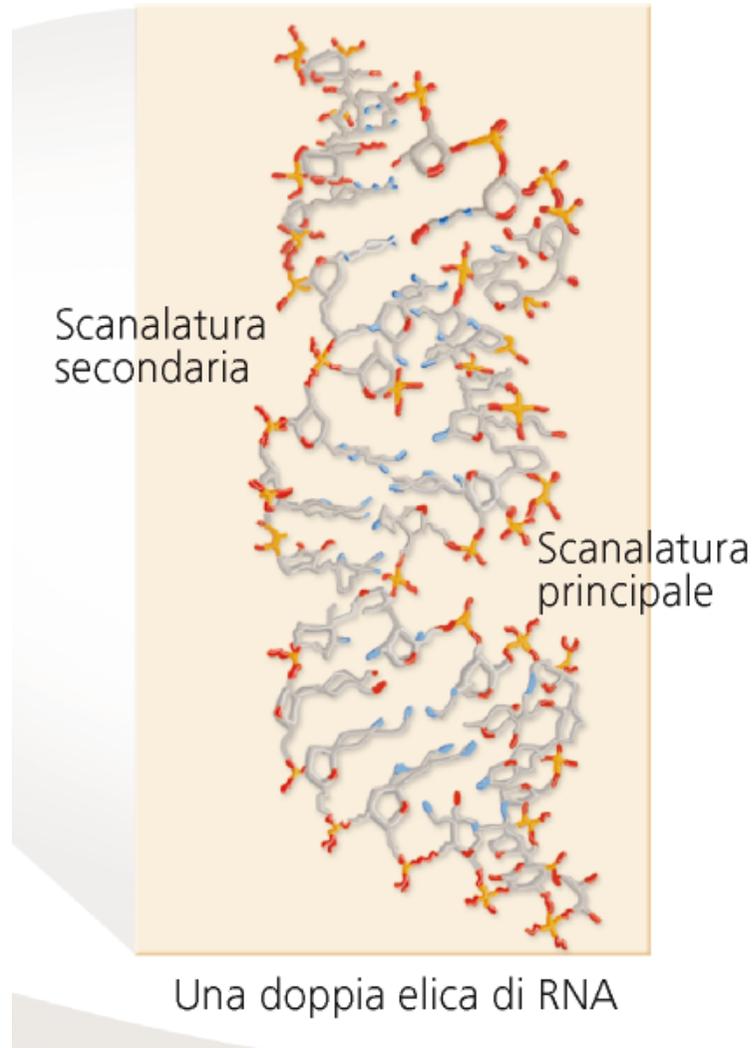
Folding dell'RNA



- L'RNA a singolo filamento si ripiega i strutture stabilizzata da base-pair convenzionali (rossi) e non convenzionali (verdi)

L'RNA a doppio filamento adotta una struttura a doppia elica di tipo A

Destrosa,
circa 11 bp per
giro



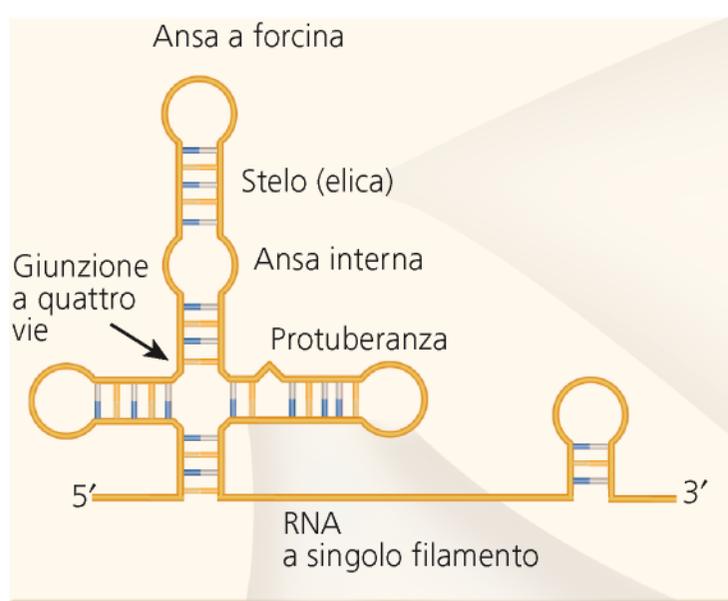
Il **gruppo 2'OH** impedisce la formazione di un'elica di tipo B ma può essere alloggiato in un elica di tipo A.

Solco maggiore profondo e stretto, non adatto all'interazione con i ligandi

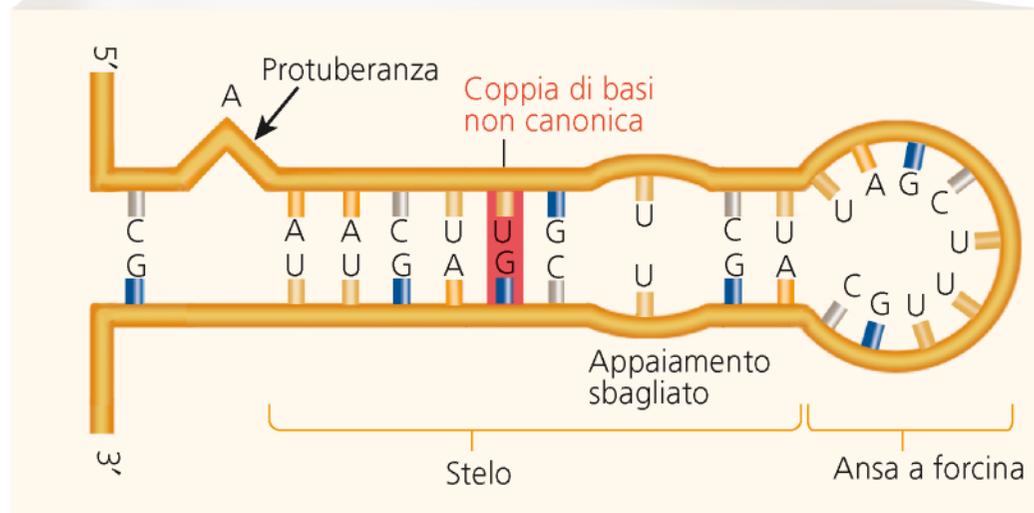
Sebbene il **solco minore** non abbia specificità per la sequenza, include i gruppi **2'OH**, che sono buoni accettori di legami idrogeno, ed è largo e poco profondo, quindi **accessibile ai ligandi**.

A causa di queste caratteristiche, è comune che l'RNA venga riconosciuto da parte delle proteine leganti RNA (**RNA-binding proteins**) nel suo **solco minore**.

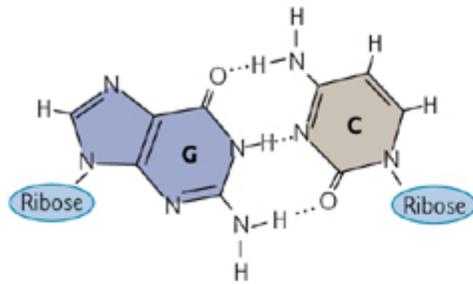
Struttura secondaria dell'RNA



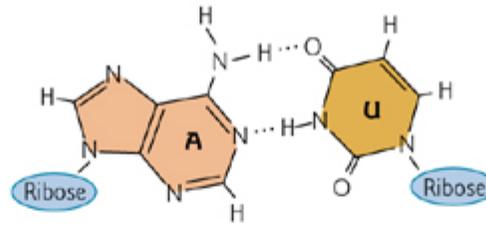
L'RNA a singolo filamento si ripiega in una varietà di motivi strutturali secondari che sono stabilizzati da appaiamenti di basi di tipo Watson-Crick o da appaiamenti non convenzionali di basi.



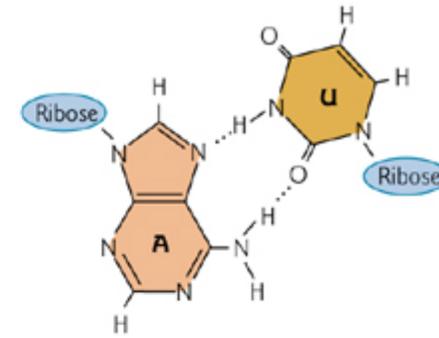
Coppie di basi canoniche e non canoniche



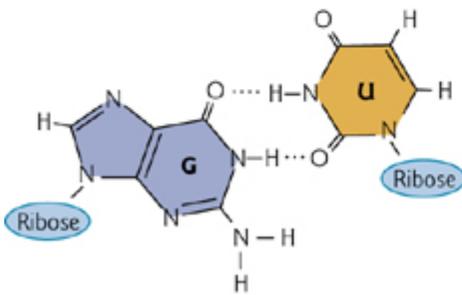
CG Watson-Crick



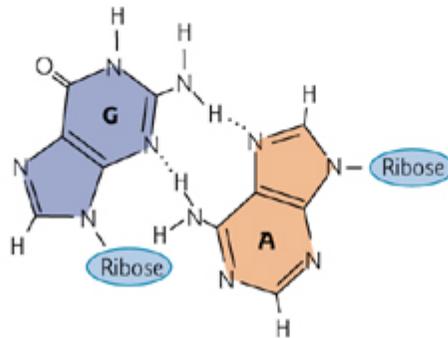
AU Watson-Crick



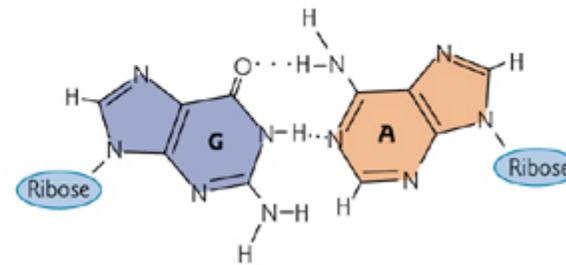
AU Reverse Hoogsteen



GU Wobble



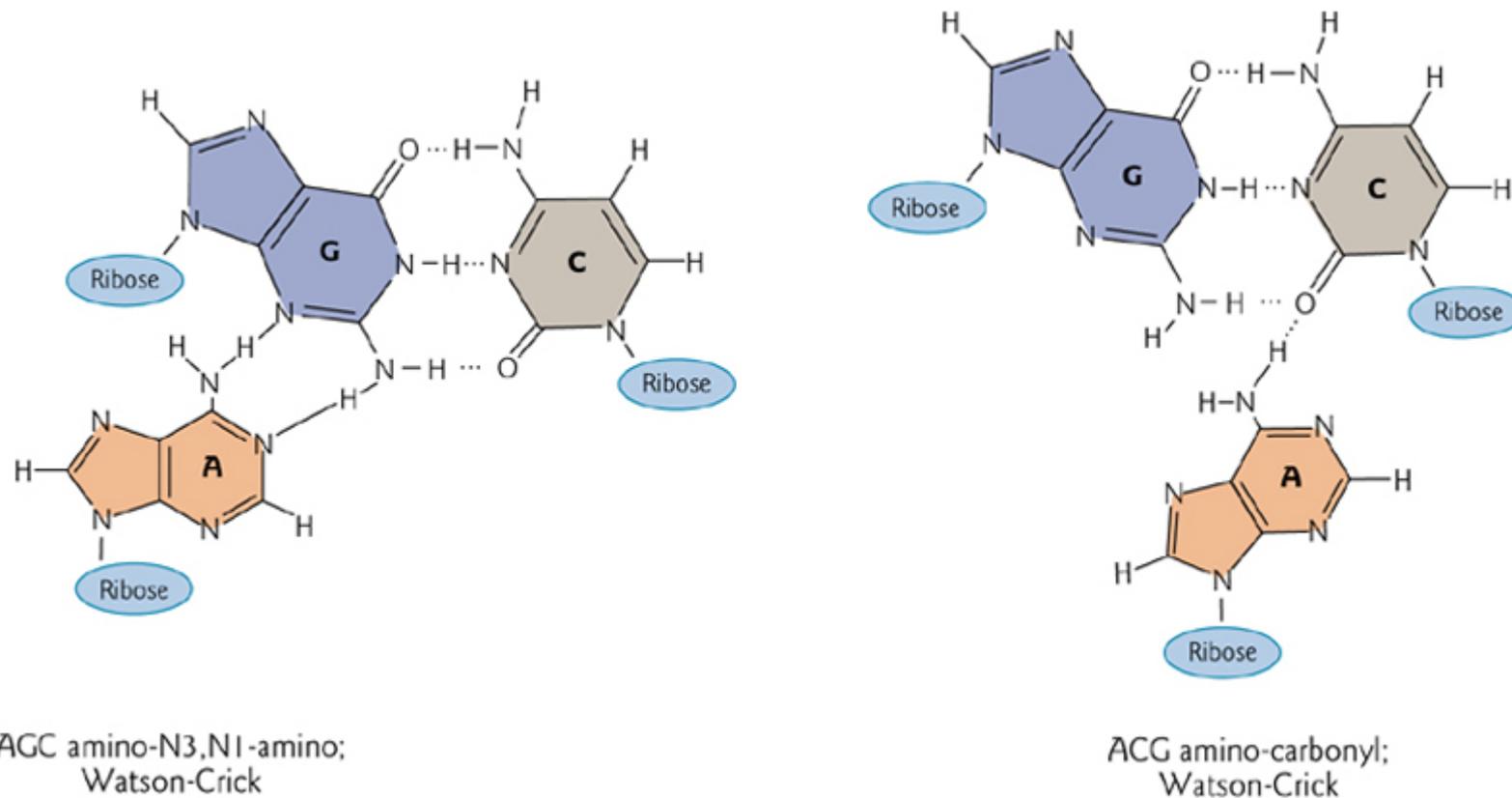
GA Sheared



GA imino

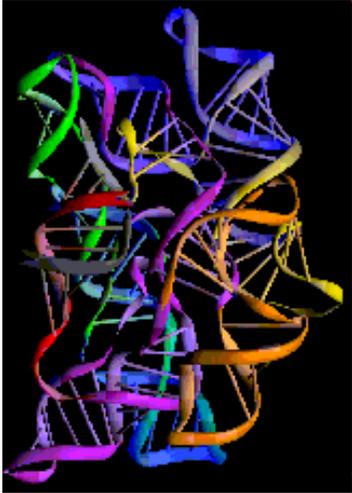
- Ci sono più di 20 tipi diversi di appaiamenti non canonici
- Le coppie di basi non canoniche allargano il solco maggiore e lo rendono più accessibile a ligandi e proteine

Le strutture dell'RNA coinvolgono anche triplette di basi



Un'appaiamento standard Watson-Crick o Hoogsteen forma il nucleo della tripletta. La terza base può interagire in molti modi “non convenzionali” mediante legami idrogeno.

Struttura terziaria dell'RNA



Le catene di RNA si ripiegano in una struttura tridimensionale specifica che agisce come una proteina globulare

Lezioni dai tRNA

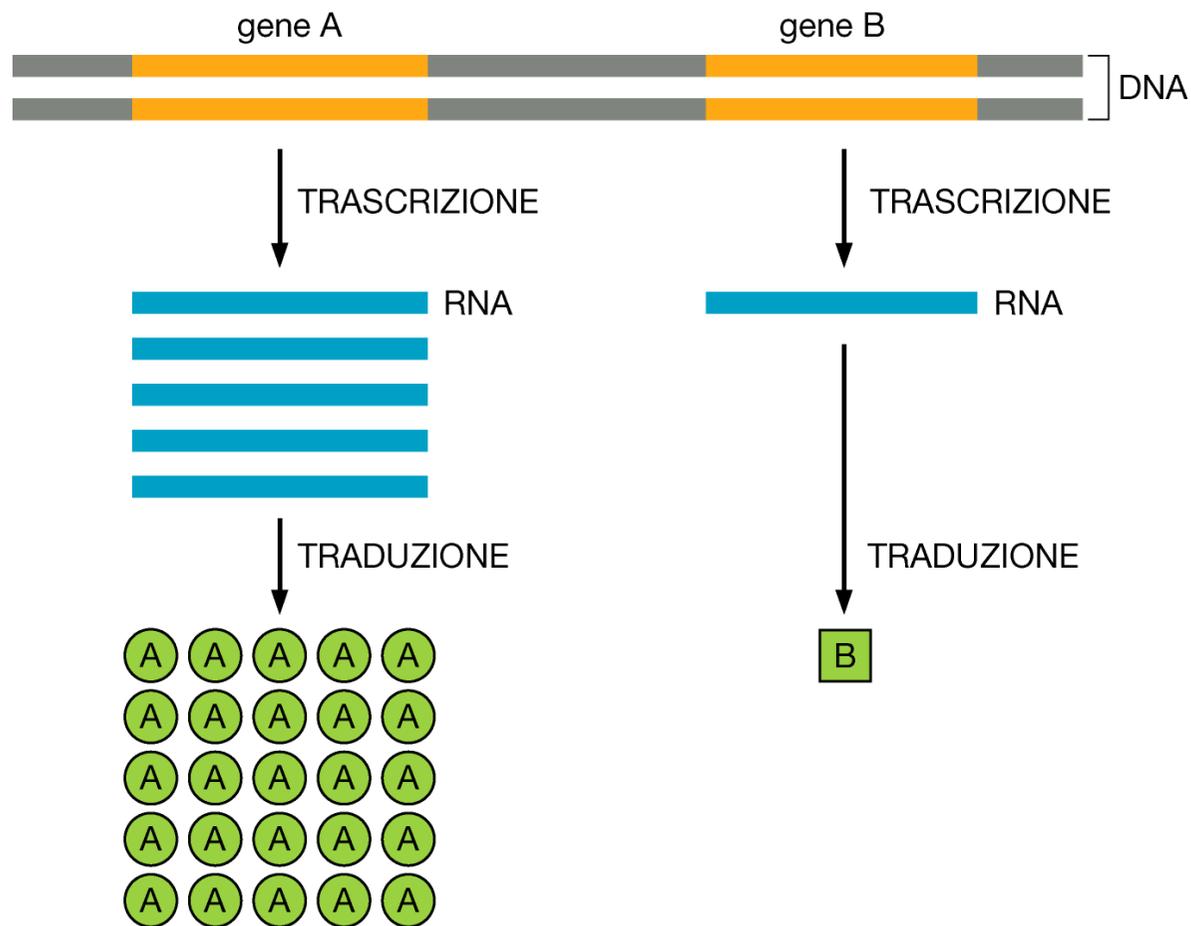
Lunghezza media dei tRNA 76 nt

Tutti i tRNA si ripiegano in una struttura simile

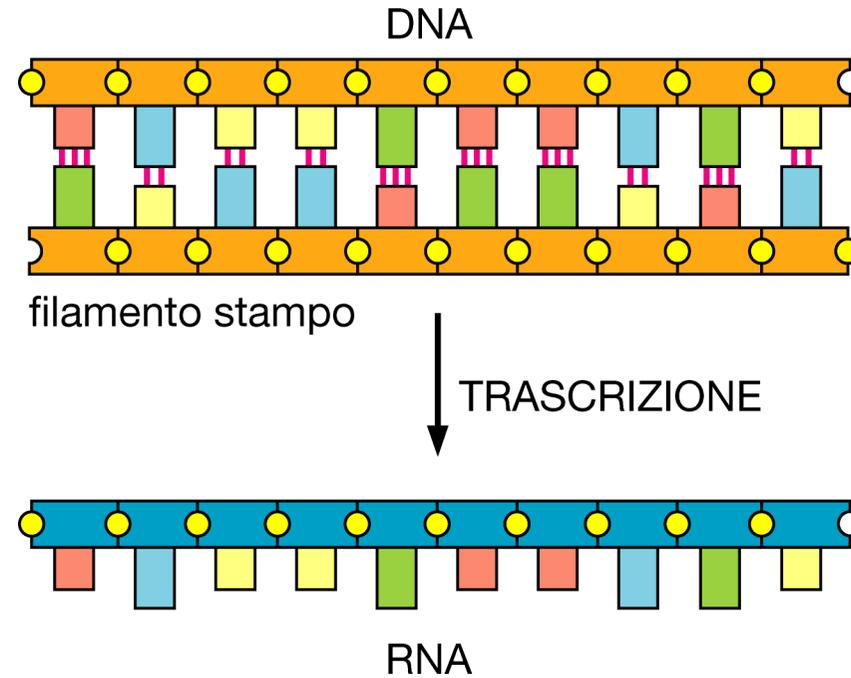
Dal DNA all'RNA: La trascrizione

- La trascrizione nei procarioti
- La trascrizione negli eucarioti

I geni possono essere espressi con efficienze diverse. Il gene A è trascritto e tradotto molto più efficientemente che il gene B. Questo fa sì che la quantità di proteina A nella cellula sia molto maggiore della quantità di proteina B.



La trascrizione del DNA produce una molecola di RNA a singolo filamento che è complementare ad un filamento del DNA (filamento stampo).

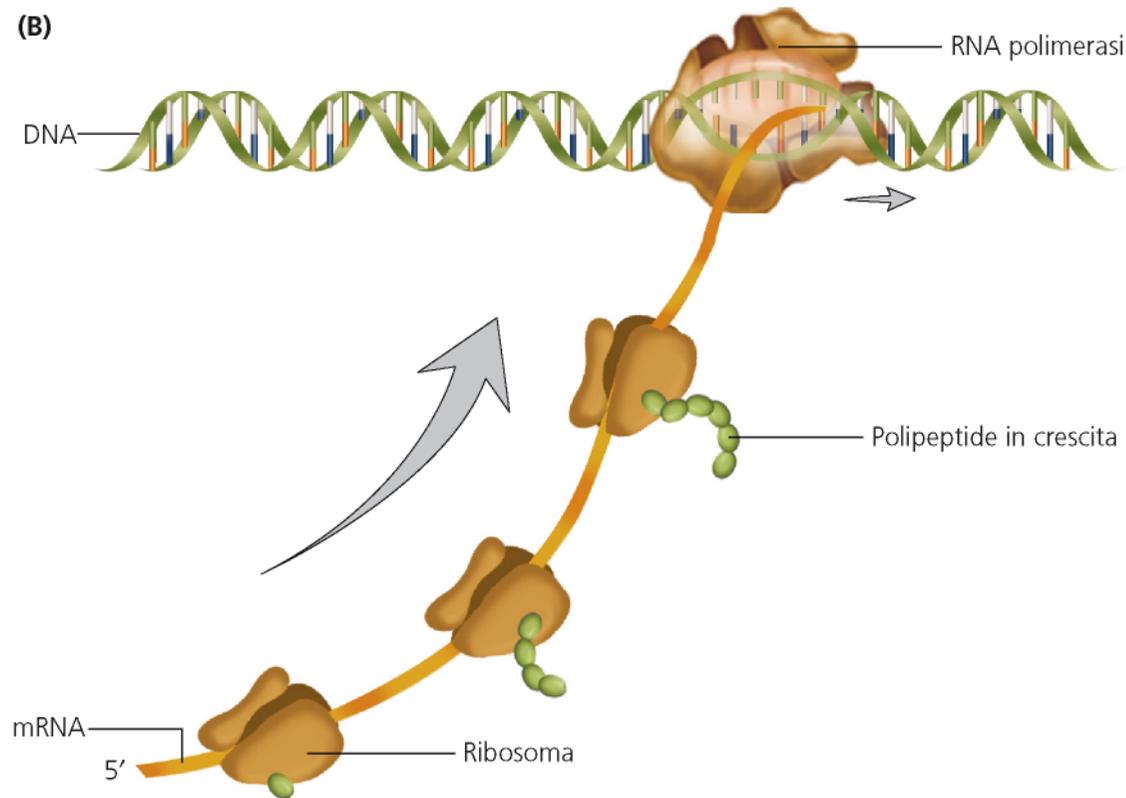


Nomenclatura

- la **coding strand (Sense strand)** del DNA ha la stessa sequenza del mRNA
- la **antisense strand (Template strand)** è quella che funge da template per la sintesi del mRNA.
- **RNA polymerases** sono enzimi che sintetizzano RNA usando DNA come template.
- Un **promoter** è una regione di DNA dove la RNA polimerasi si lega per iniziare la trascrizione.
- **Startpoint (Startsite)** si riferisce alla posizione sul DNA che corrisponde alla prima base incorporata nel RNA
- A **terminator** è una sequenza di DNA fa terminare la trascrizione alla RNA polymerase.
- A **transcription unit** è la distanza tra i siti di iniziazione e di terminazione della RNA polymerase; può includere più di un gene.
- **Upstream** = a monte.
- **Downstream** = a valle.
- A **primary transcript** è il prodotto di RNA non modificato che corrisponde ad una unità di trascrizione.

Nei batteri trascrizione e traduzione sono “accoppiate” perché avvengono in un unico compartimento cellulare.

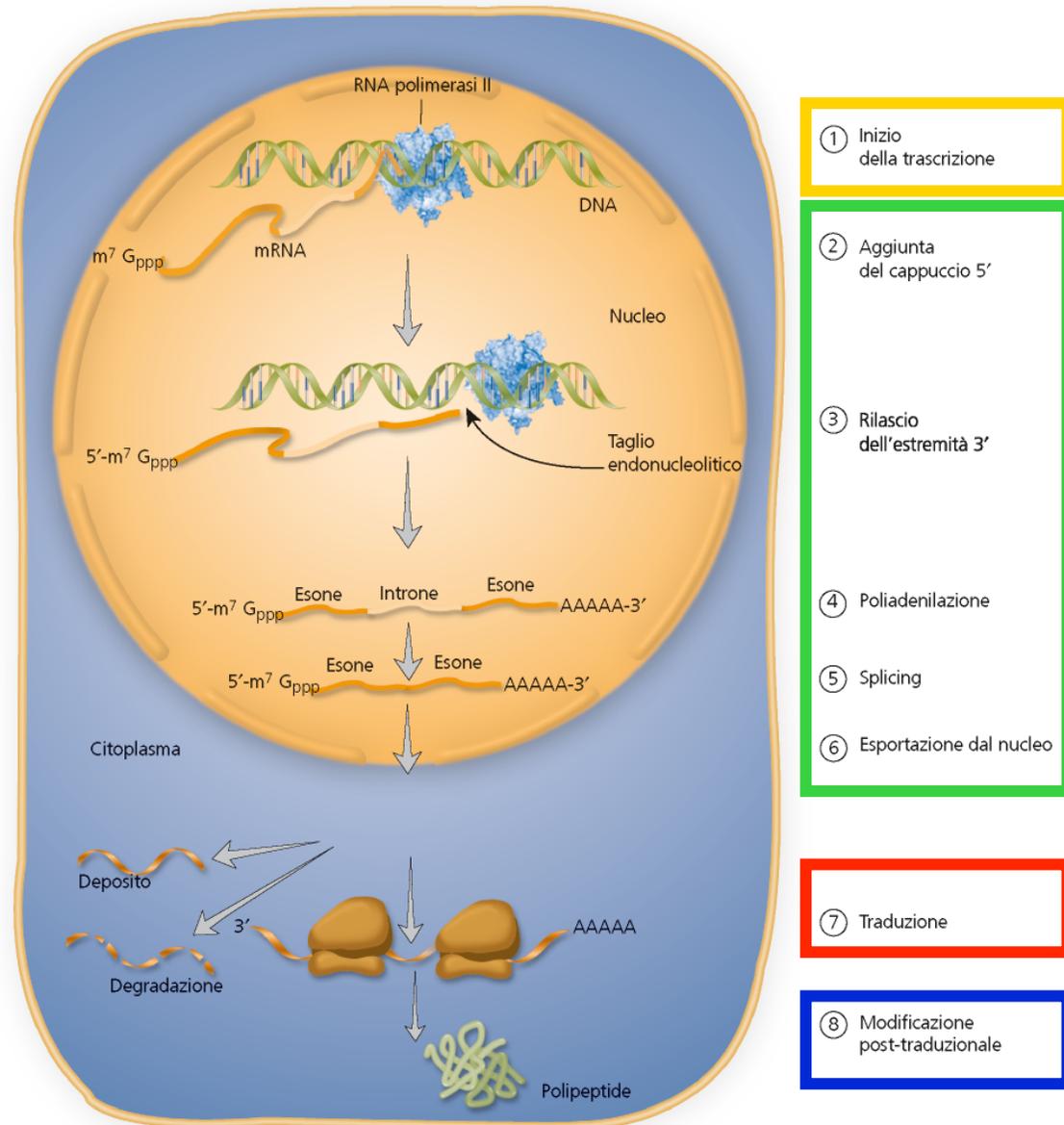
Non appena inizia la sintesi dell'mRNA i ribosomi vi si attaccano ed inizia la sintesi proteica.



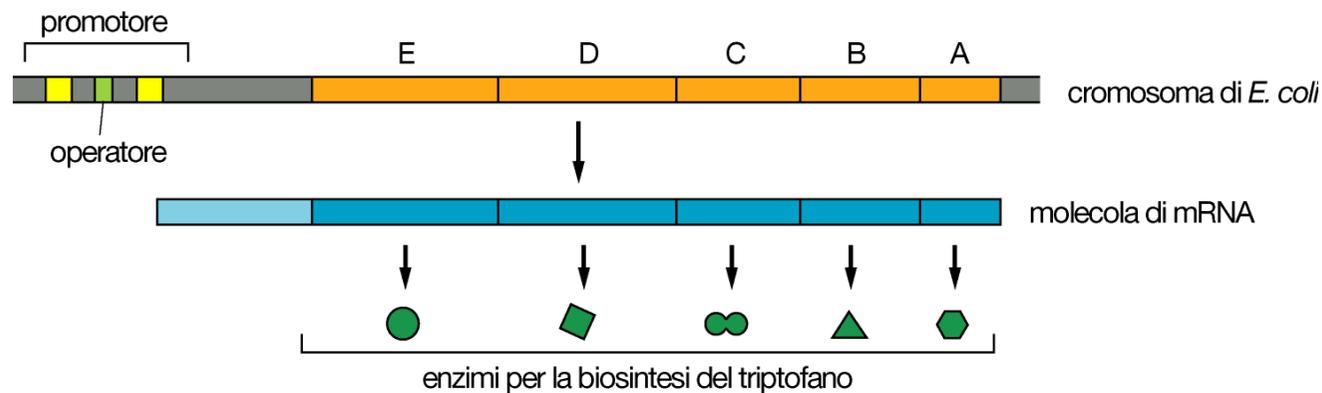
L'inizio della trascrizione è il processo a livello del quale la maggior parte dei geni sono regolati nei procarioti

Negli eucarioti trascrizione e traduzione sono separate in due compartimenti cellulari diversi: nucleo e citoplasma.

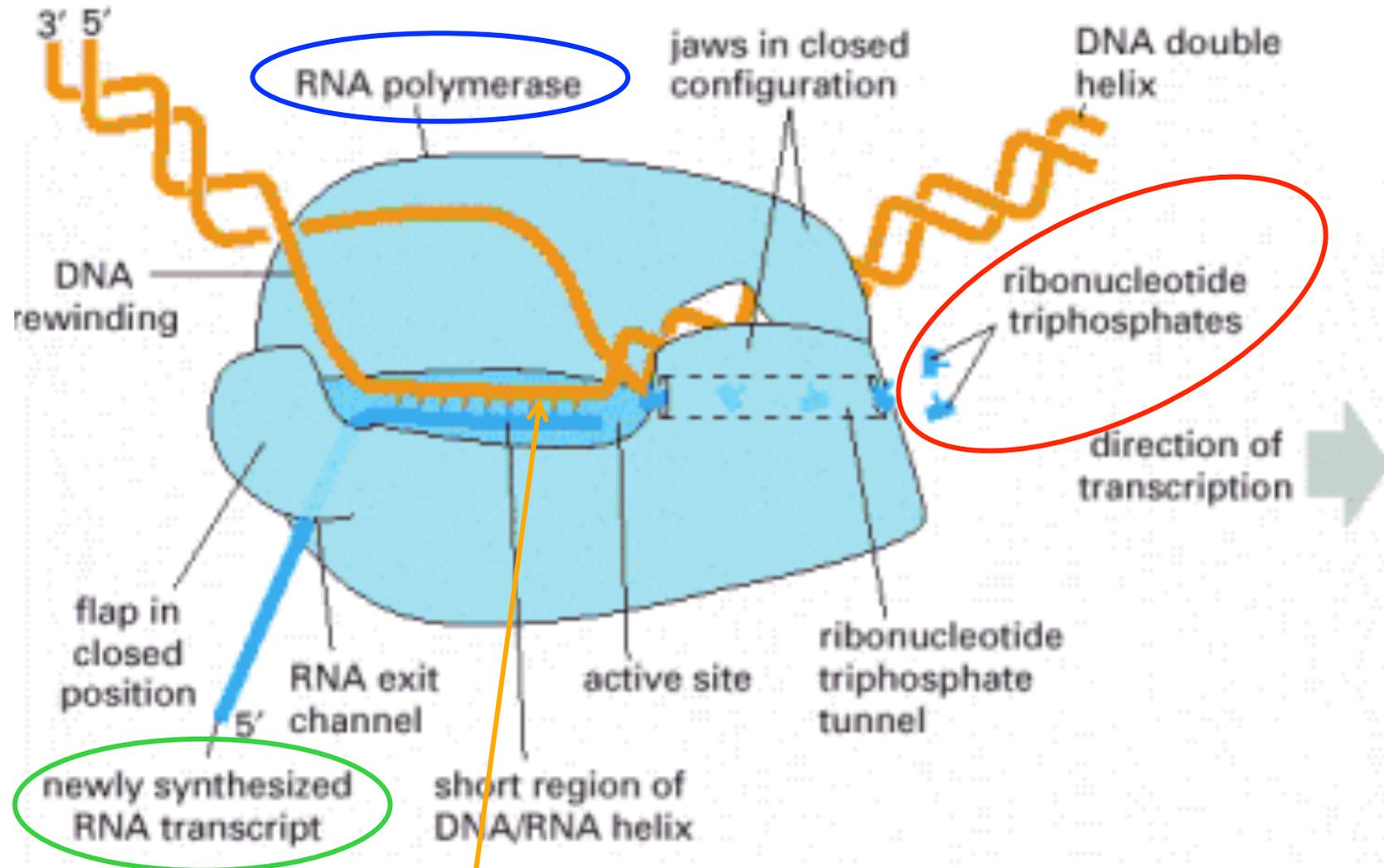
Oltre all'inizio di trascrizione (livello **trascrizionale**), il controllo dell'espressione genica negli eucarioti può essere esercitato anche a molti altri livelli: **post-trascrizionale**, **traduzionale** e **post-traduzionale**.



La trascrizione nei procarioti

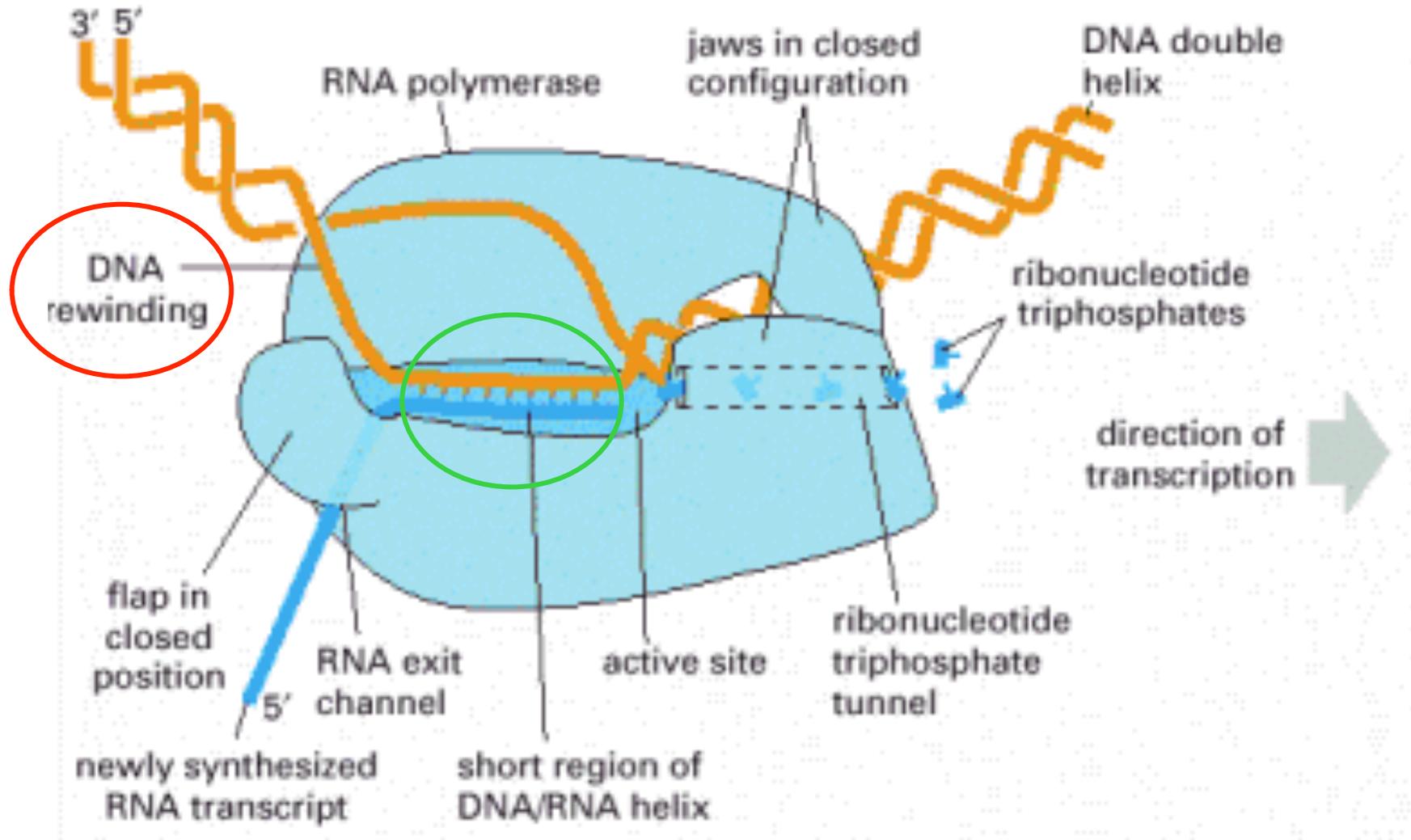


Nei batteri un solo promotore può controllare la produzione di più prodotti proteici (trascritto policistronico). Ciò non accade negli eucarioti (un mRNA- una proteina).



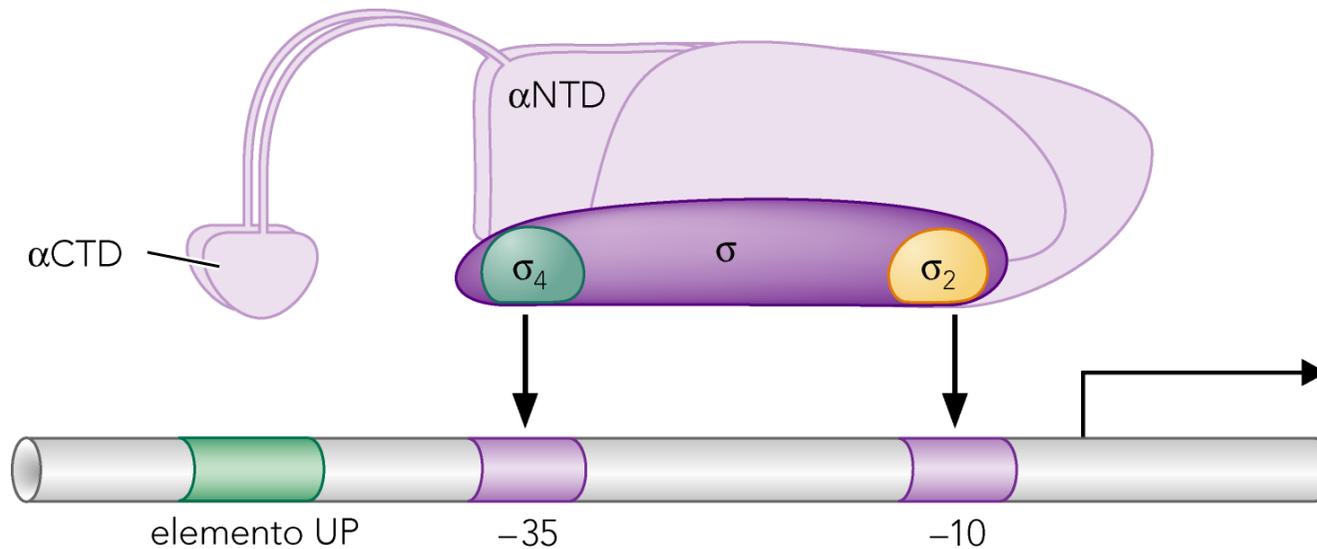
Il DNA è trascritto dall'enzima RNA polimerasi.

L' **RNA polimerasi** si muove lungo il DNA, aprendo la doppia elica. Avanzando, aggiunge **nucleotidi** uno ad uno alla catena di **RNA** nel sito di **polimerizzazione**, usando un **filamento di DNA** come stampo. L' RNA trascritto è quindi un copia complementare a singolo filamento di uno dei due filamenti di DNA.



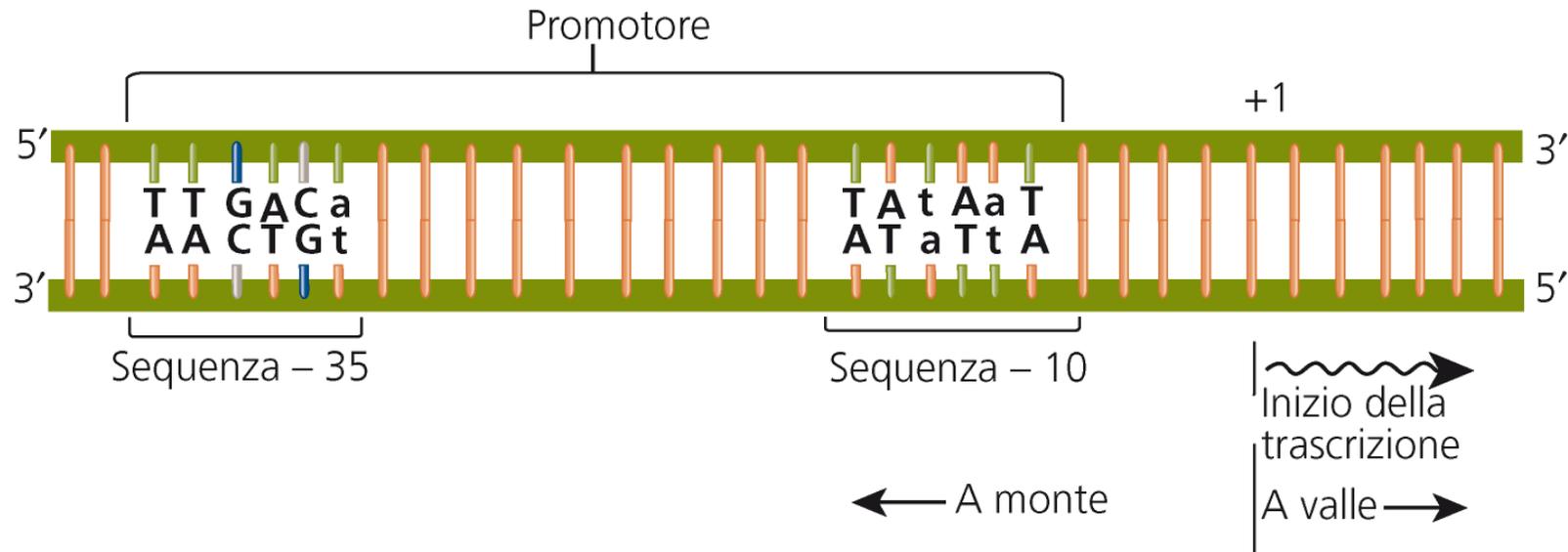
L' RNA polimerasi stacca l'RNA neoformato, permettendo ai due filamenti di DNA a monte di **riappaiarsi**. Una corta elica **DNA/RNA** (di circa 9 nt) si forma solo transientemente, e una “finestra” di DNA/RNA si muove lungo il DNA, insieme alla RNA polimerasi.

L'RNA polimerasi batterica è costituita dal **nucleo** (*core*) dell'enzima e da un fattore di trascrizione chiamato **fattore sigma** (σ). Insieme le due molecole formano il complesso enzimatico funzionante chiamato **oloenzima** (dal greco *holos*, intero).



Il fattore σ è coinvolto soprattutto nel riconoscimento del promotore.

I promotori batterici hanno due sequenze consenso distinte:
sequenza -10 e sequenza -35.



Le lettere maiuscole indicano le basi presenti in quelle posizioni in più del 50% dei promotori analizzati; le lettere minuscole indicano le basi presenti in quelle posizioni nel 50% o meno dei promotori analizzati.

La RNA polimerasi batterica è fatta da subunità multiple

- L'oloenzima (enzima completo) è un complesso di 5 subunità che comprende il “core enzyme” ($\alpha_2 \beta \beta'$) e il σ factor che è competente per l'inizio della trascrizione batterica.
- RNA core polimerasi batteriche sono ~500 kD complessi multisubunità con la struttura generale $\alpha_2 \beta \beta'$.
- Negli eubatteri un solo tipo di RNA polimerasi è responsabile della sintesi di tutti i RNA (mRNA, rRNA e tRNA)

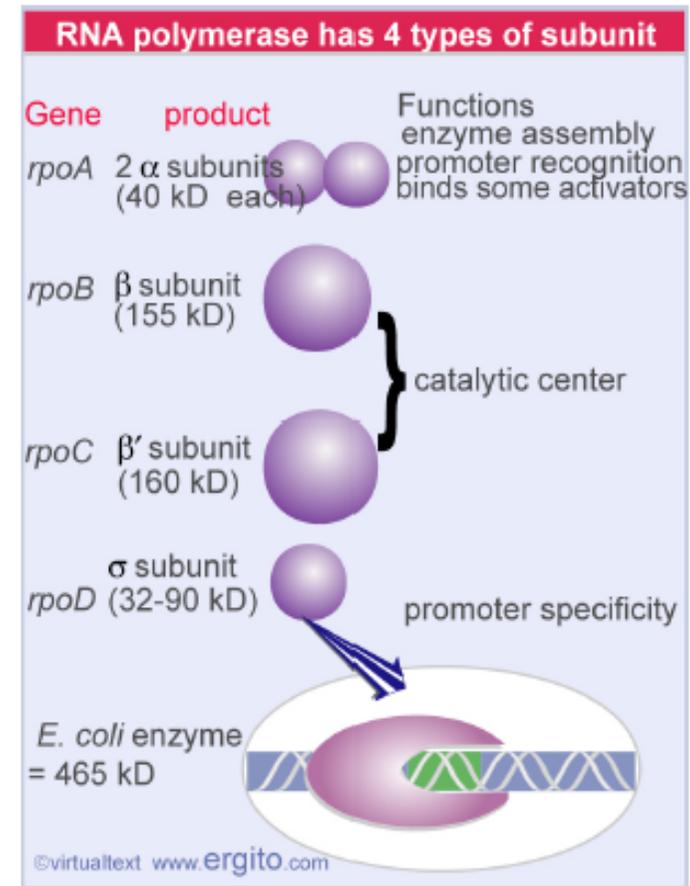


Figure 9.16 Eubacterial RNA polymerases have four types of subunit; α , β , and β' have rather constant sizes in different bacterial species, but σ varies more widely.

- ✓ C'è un dilemma tra i bisogni della iniziazione e la elongazione. **Iniziazione** necessita di un forte **legame solo con sequenze particolari** (promotori), mentre la **elongazione** necessita l'associazione **con tutte le sequenze** che l'enzima incontra durante la trascrizione.
- ✓ Quando l'enzima rilascia sigma (o cambia la sua associazione), torna ad avere affinità generale per tutto il DNA, indipendente dalla sequenza, per la continuazione della trascrizione.
- ✓ Come peptide indipendente, sigma non si lega al DNA, ma quando in complesso nell'oloenzima, σ ha **contatti col DNA nella regione a monte del sito di inizio**.

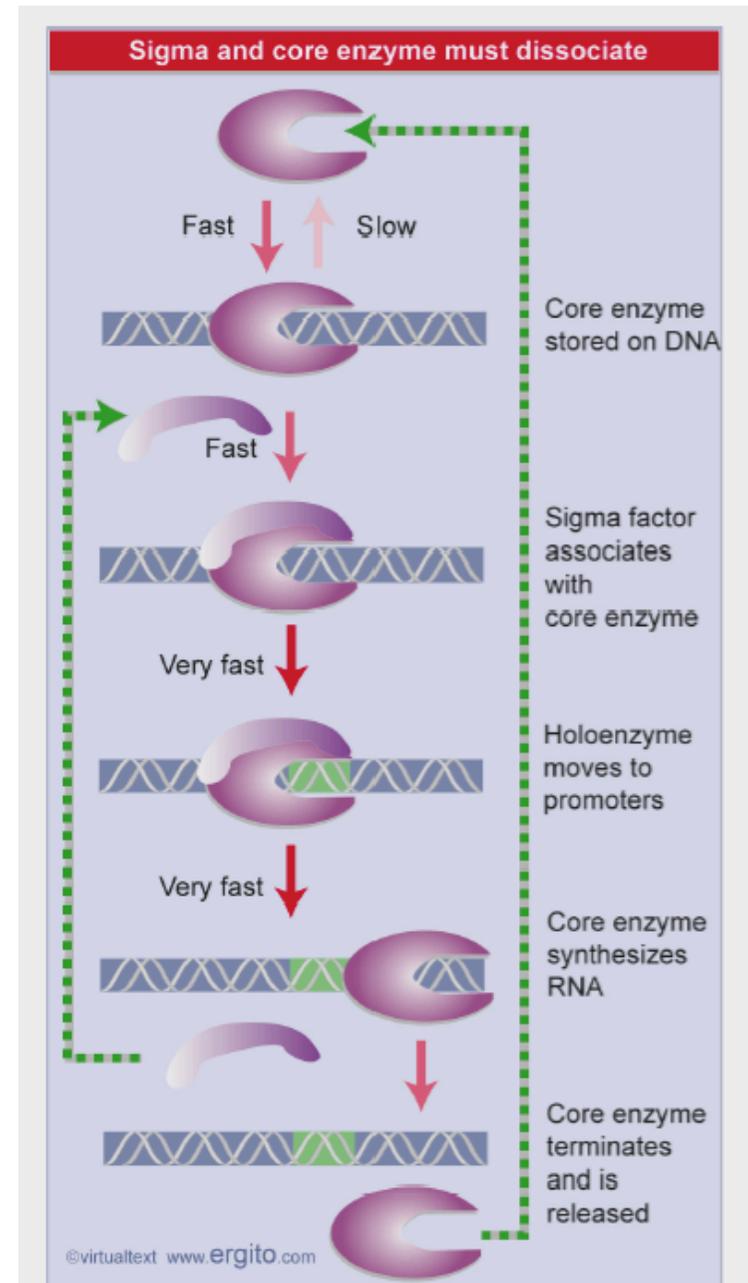
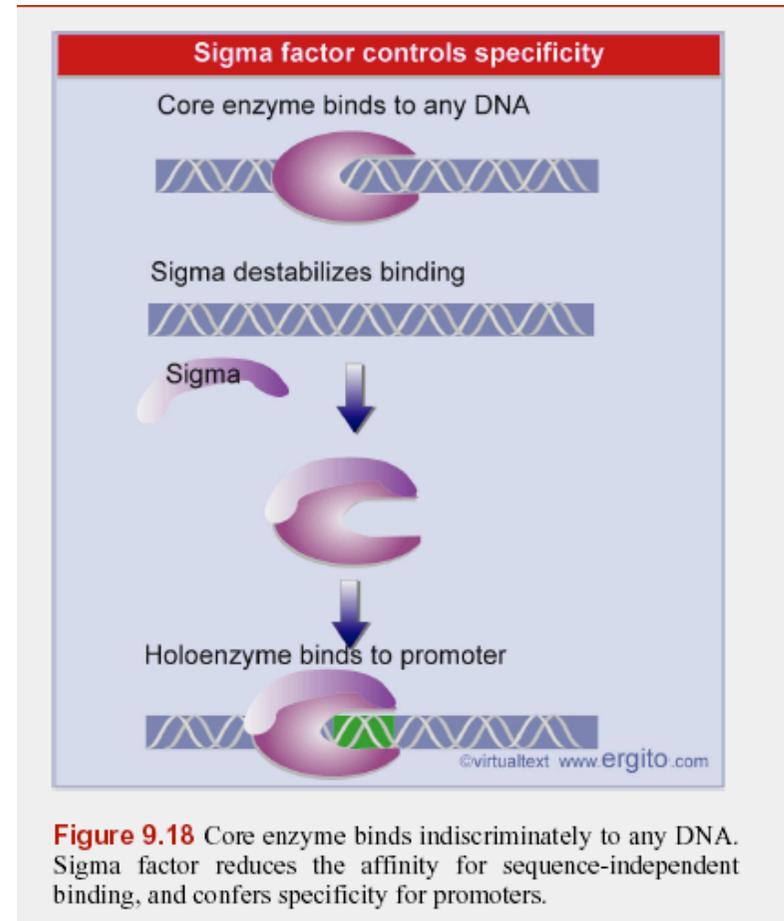


Figure 9.26 Sigma factor and core enzyme recycle at different points in transcription.

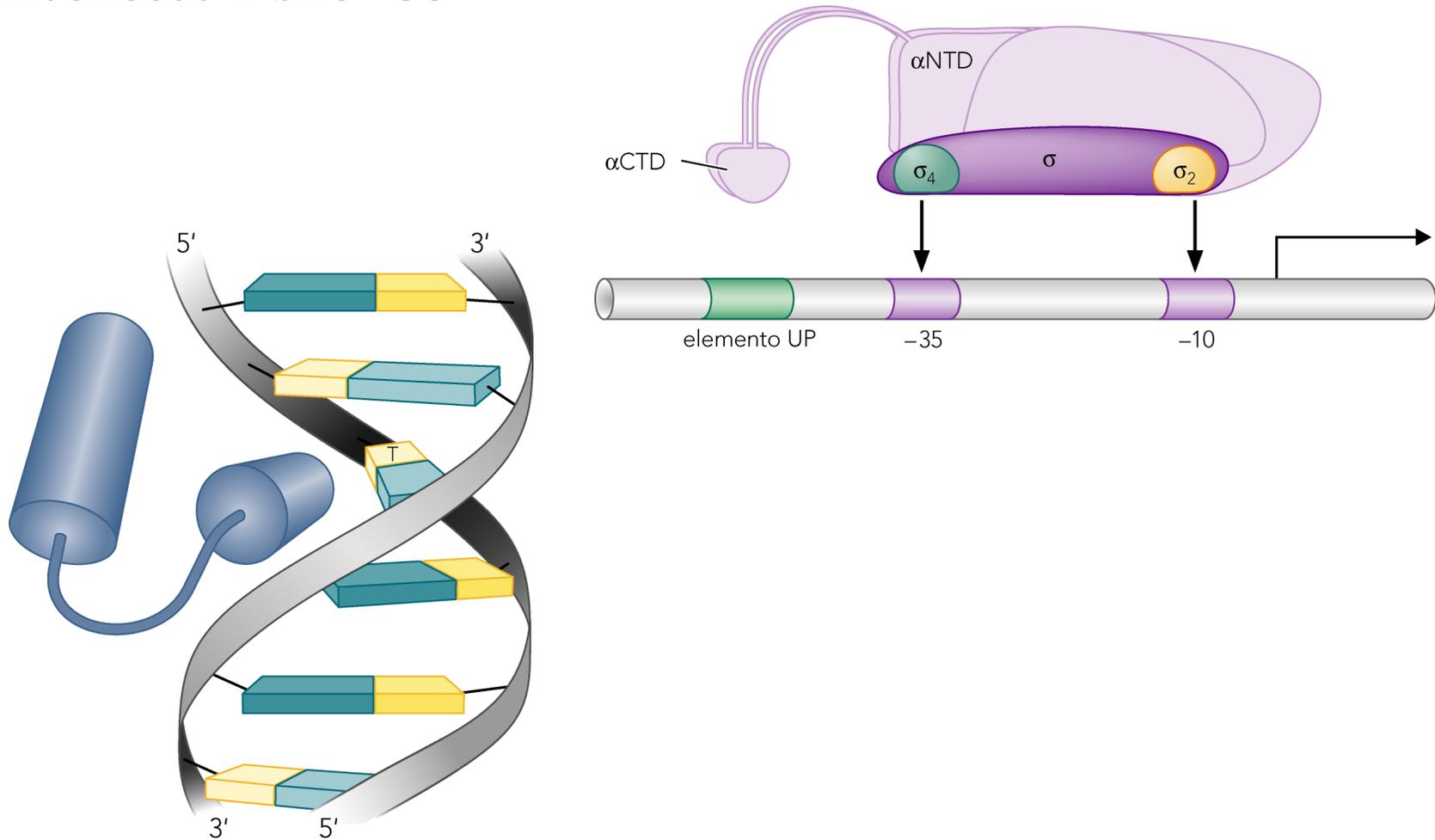
- *Il Core enzyme non distingue tra promotori e le altre sequenze del DNA.*
loose binding site.
- *L' holoenzyme ha una capacità molto più bassa nel riconoscere i loose binding sites, e questo gli dà la capacità di riconoscere siti di **legame specifici**.*
- Le costanti di legame sono tra $\sim 10^{12}$ e $\sim 10^6$.

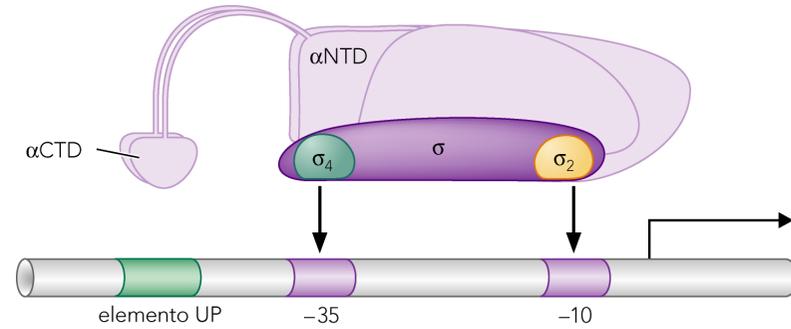
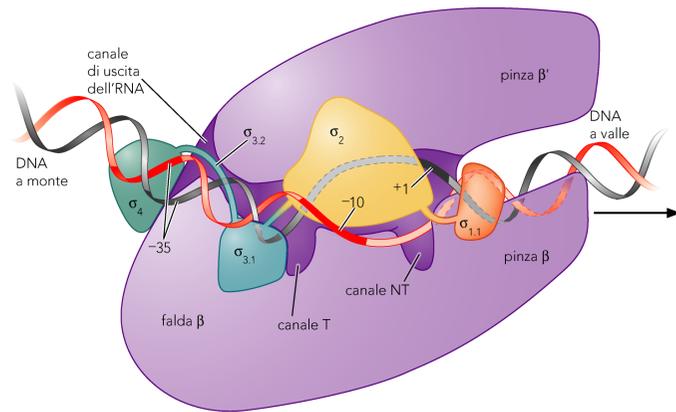
La forza di un promotore è collegata alla affinità di legame ed alla capacità di evadere dal promotore



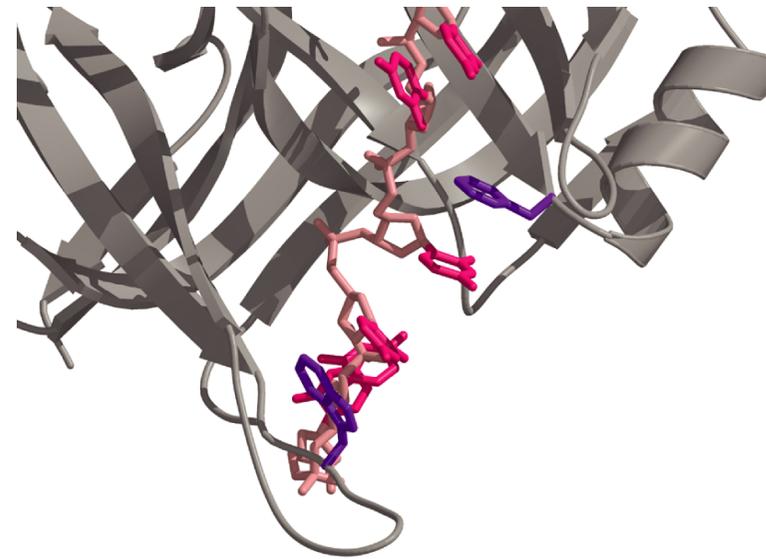
Legame al DNA

Il DNA binding domain del fattore **sigma** è helix-turn-helix che riconosce il **sito -35**

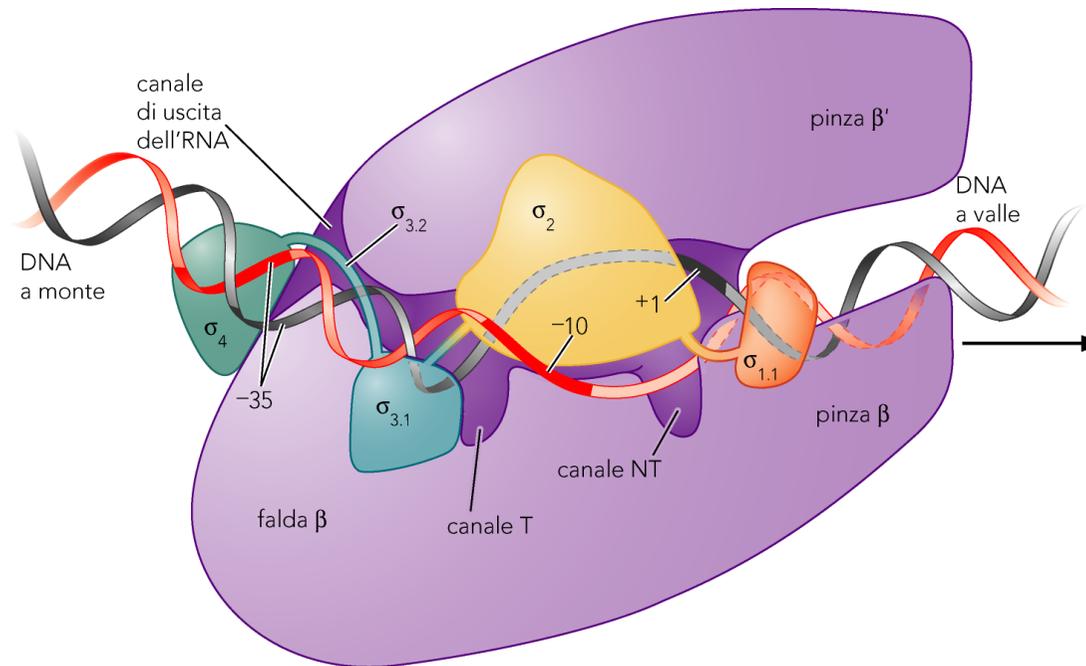




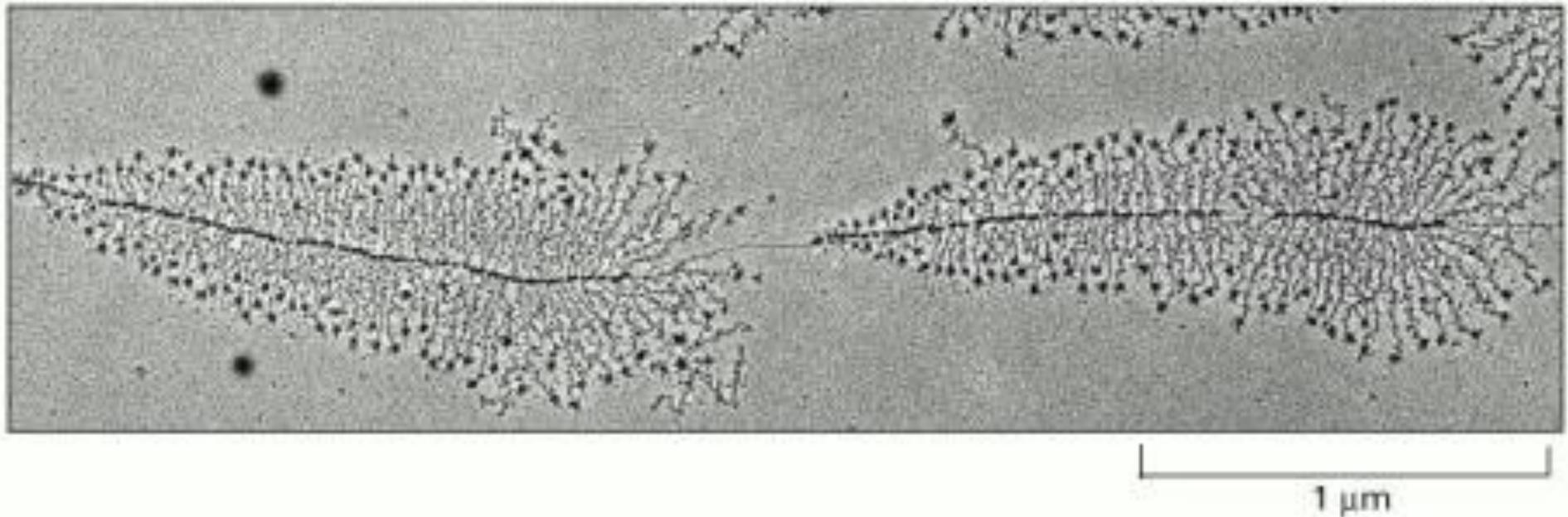
Il sito **-10** è riconosciuto dalla **subunità sigma** mediante un'**alfa elica**. Ha amino acidi aromatici che aiutano l'apertura del DNA



L'oloenzima RNA polimerasi batterica ha una struttura a chela



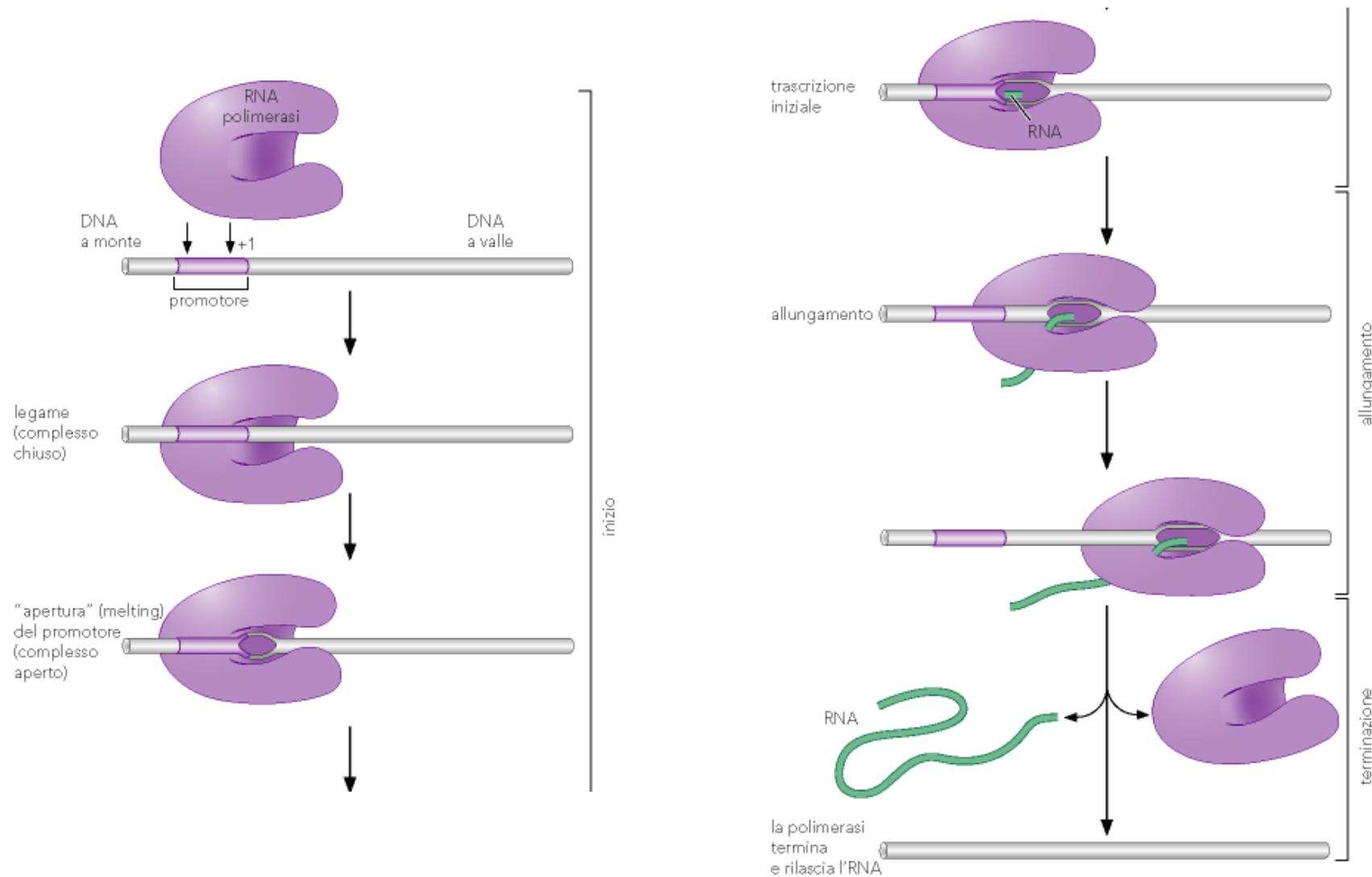
E. coli usa **7 fattori sigma alternativi** per rispondere ad alcuni cambiamenti ambientali: calore, mancanza di azoto, stress, UV, iperosmolarità etc.

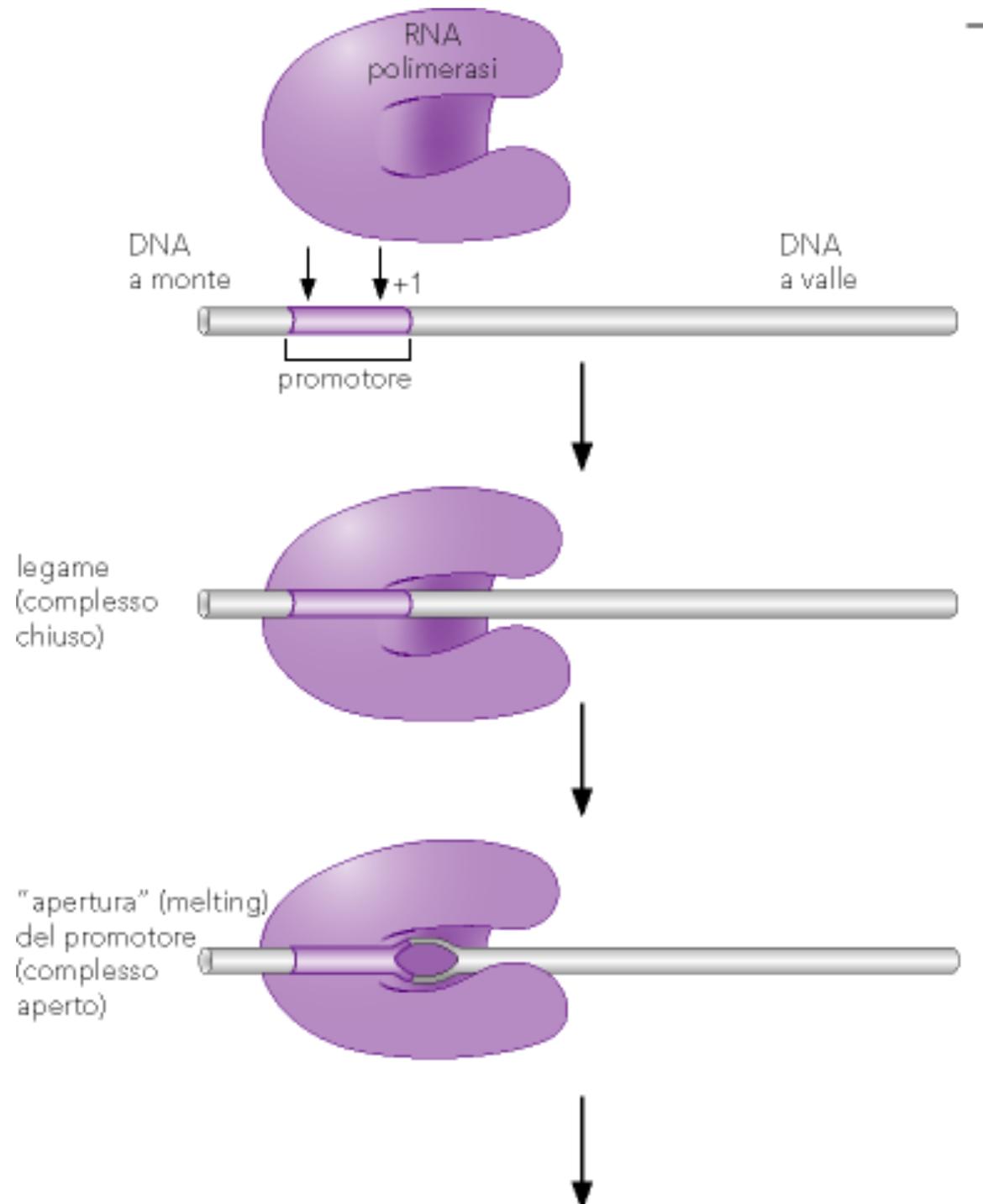


Trascrizione di due geni osservata al microscopio elettronico.

Sono visibili molte molecole di RNA polimerasi (punti lungo il DNA) che trascrivono simultaneamente due geni. Gli RNA prodotti sono visibili come filamenti sottili.

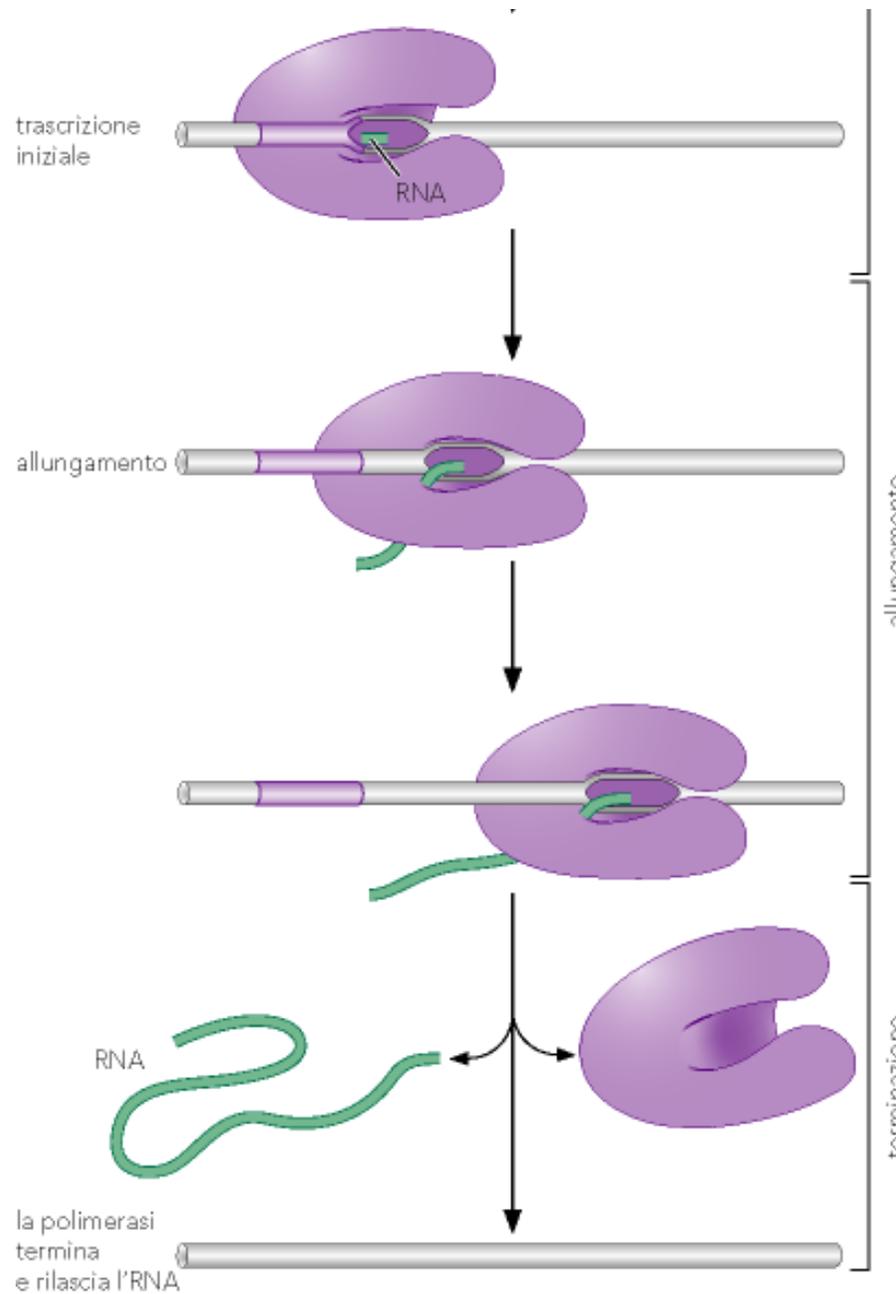
La trascrizione nei procarioti: 3 fasi





inizio

inizio



inizio

allungamento

terminazione

Differenze tra trascrizione e replicazione:

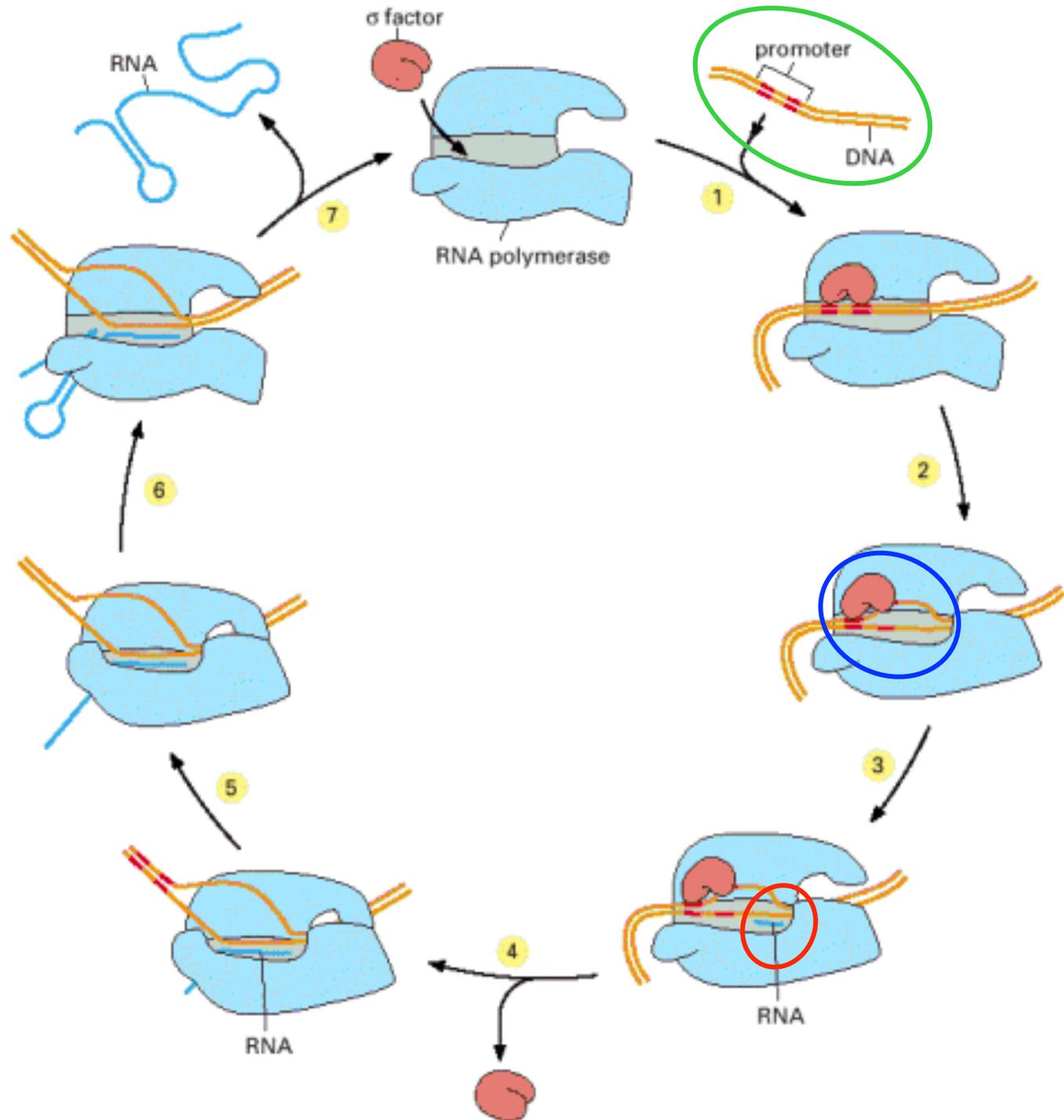
1. La nuova catena è costituita da **ribonucleotidi** anziché desossiribonucleotidi;
2. L'RNA polimerasi **non ha bisogno di un primer**;
3. L'RNA prodotto non rimane accoppiato alle basi dello stampo di DNA : l'enzima **stacca l'RNA** a pochi nucleotidi di distanza dal punto di aggiunta dei NTP;
4. La trascrizione, sebbene molto accurata (10^{-4}), è **meno precisa** della replicazione (10^{-7}).

Il ciclo di trascrizione dell'RNA polimerasi batterica

1. L'RNA polimerasi (core più fattore σ) lega il promotore (complesso chiuso)

2. L'RNA polimerasi apre il DNA alla posizione dove deve iniziare la trascrizione (complesso aperto)

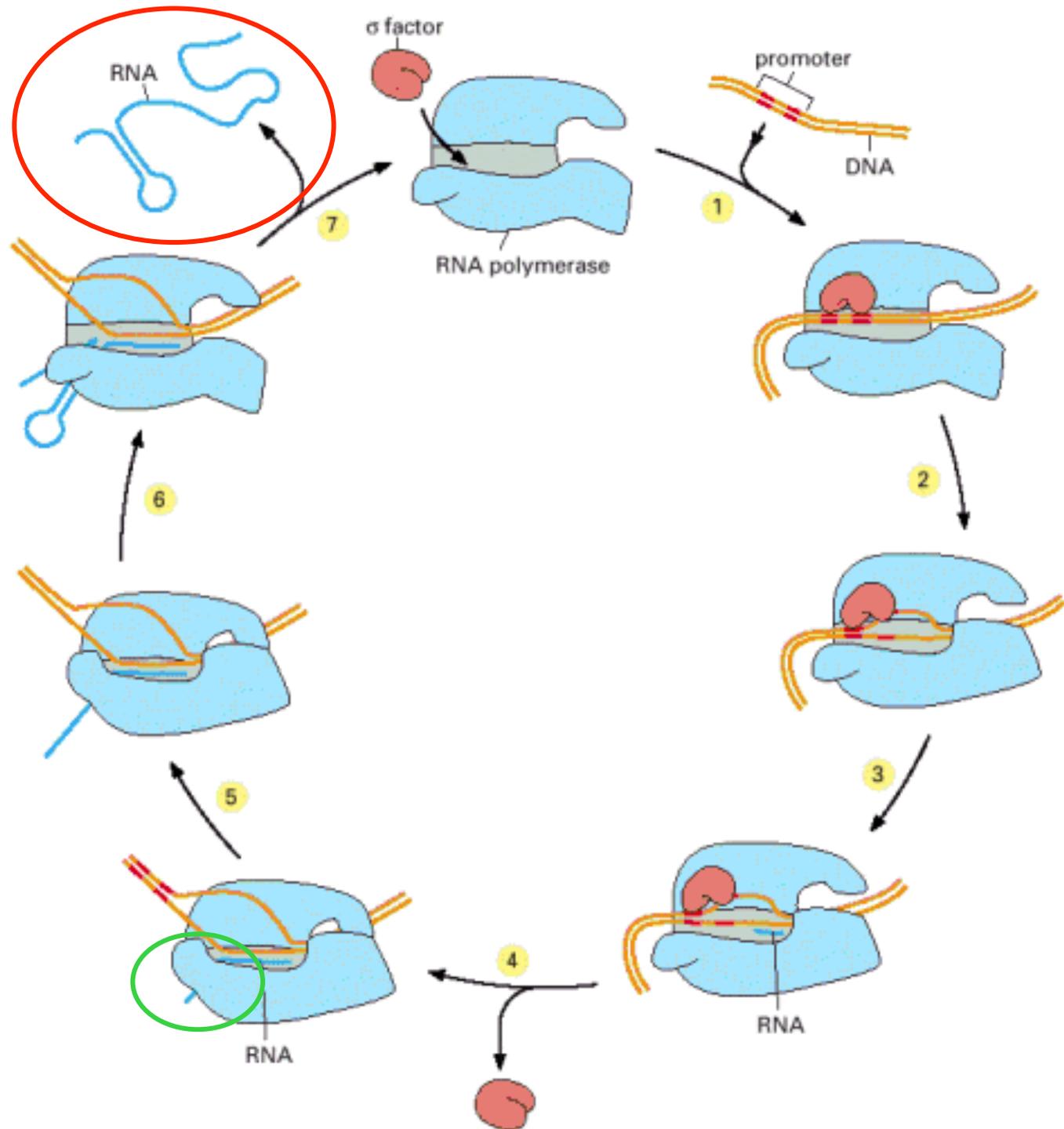
3. Inizia la trascrizione



4. La polimerasi subisce un cambio conformazionale ed entra in fase di allungamento e si muove verso valle.

5. Allungamento del trascritto

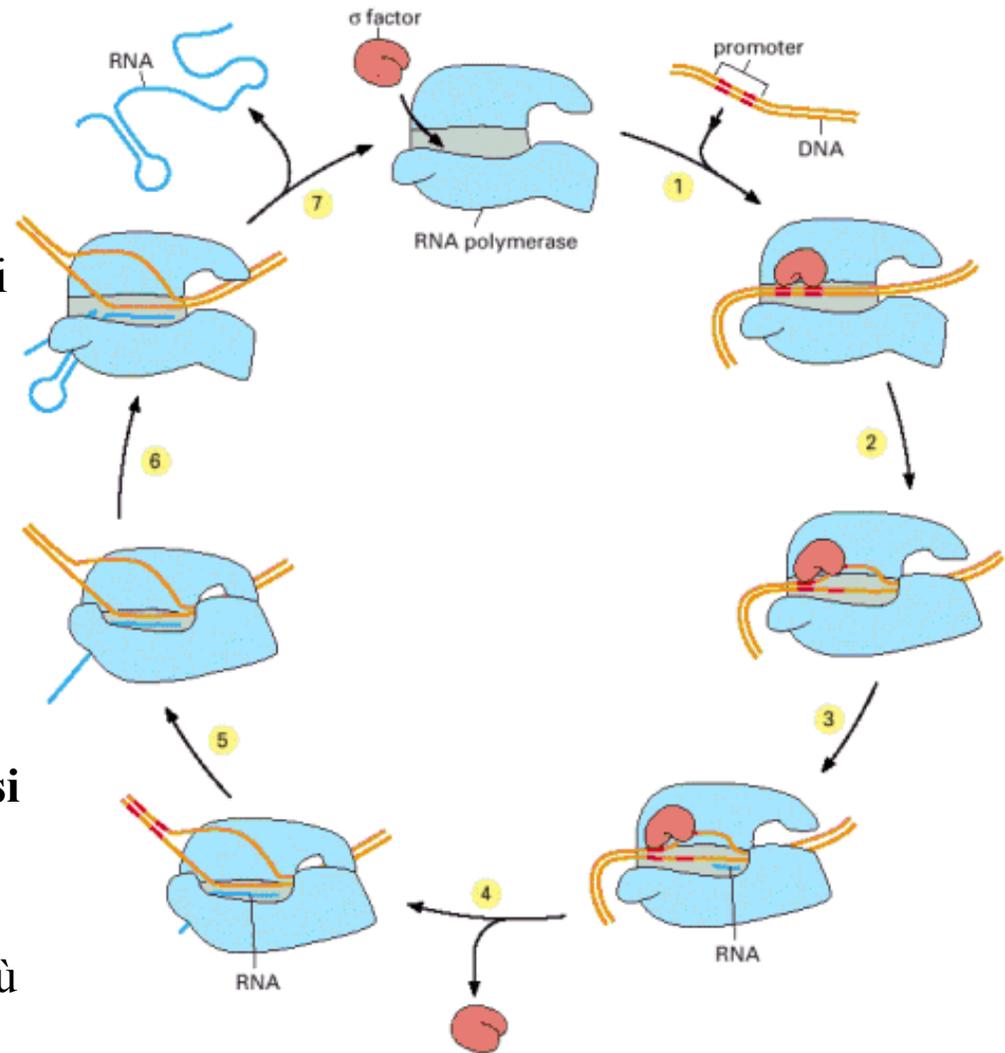
6. La polimerasi si stacca dal DNA e rilascia l'RNA quando incontra un segnale di terminazione.



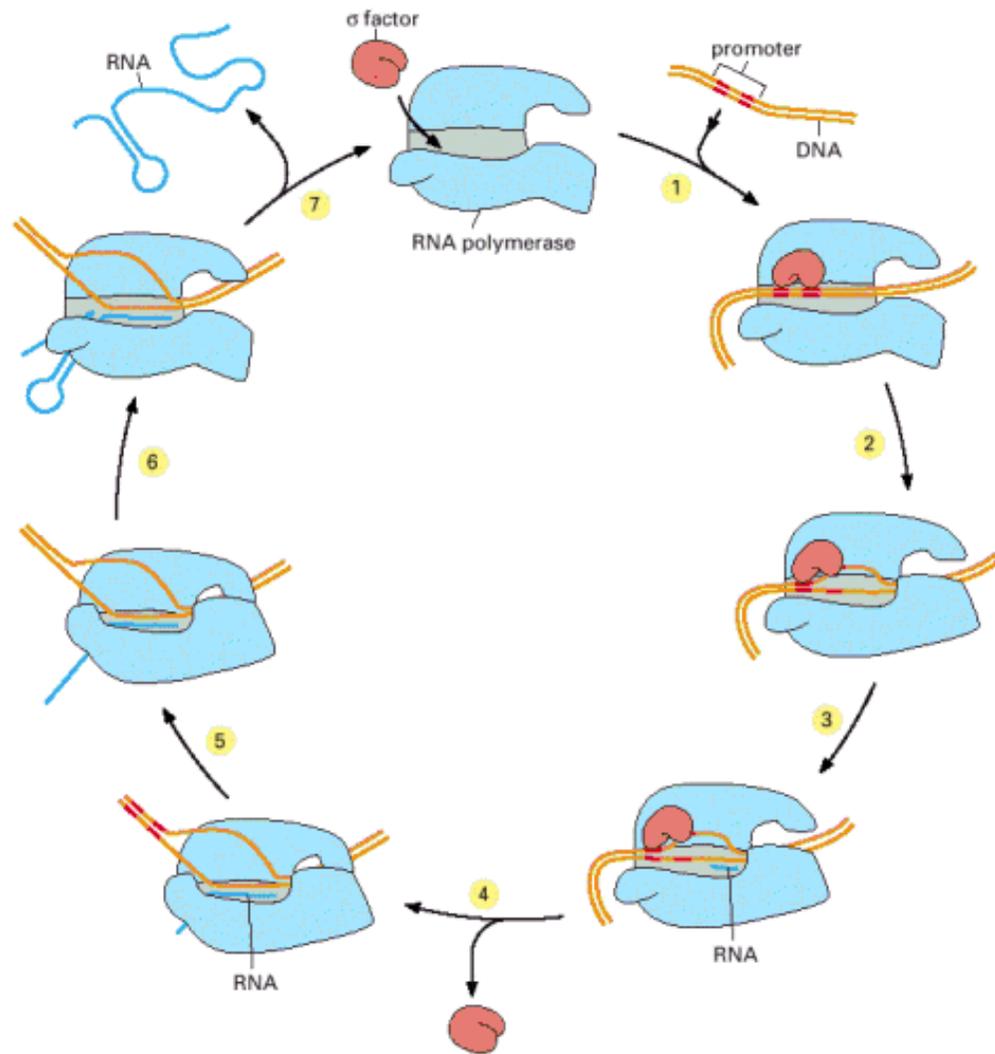
Dopo che l'RNA polimerasi si è **legata fortemente** al DNA nel promotore, **apre la doppia elica** per esporre una fila di nucleotidi su ciascun filamento (*Step 2*).

Con il DNA aperto, uno dei due filamenti di DNA aperti funziona da stampo per l'appaiamento di basi con i **ribonucleotidi** entranti, due dei quali sono uniti dalla polimerasi per iniziare la catena di RNA.

Dopo che i **primi 10 nt** di RNA sono stati sintetizzati (**clearance del promotore**), il **fattore σ** rilassa il legame alla polimerasi (**si dissocia**). Durante questo processo la polimerasi va incontro a cambiamenti strutturali che le permettono di muoversi più rapidamente, e trascrivere senza il fattore σ (*Step 4*).



L'allungamento dell'RNA continua (ad una velocità di circa 50 nt/sec) fino a che la polimerasi incontra un secondo segnale nel DNA, il **terminatore**, dove la polimerasi stalla e rilascia sia il filamento di DNA stampo che il trascritto di RNA (*Step 7*).



Prokariotic gene

1200 aa

3600 nt

1 min to transcribe (60 nt/s)

Dystrophin

DNA = $2,5 \times 10^6$ bp (1 mm)

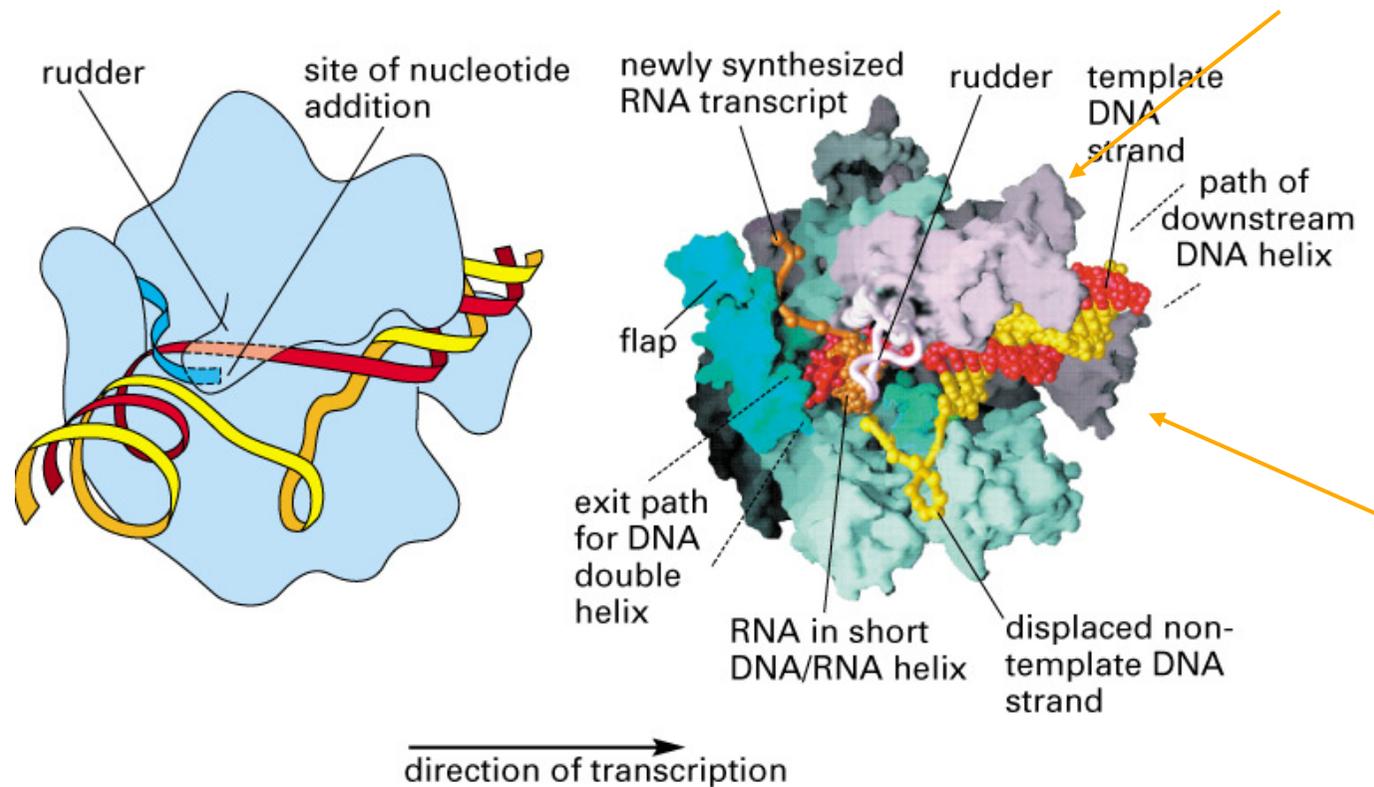
Largest gene ever known

11,5 hours to transcribe (60 nt/s)

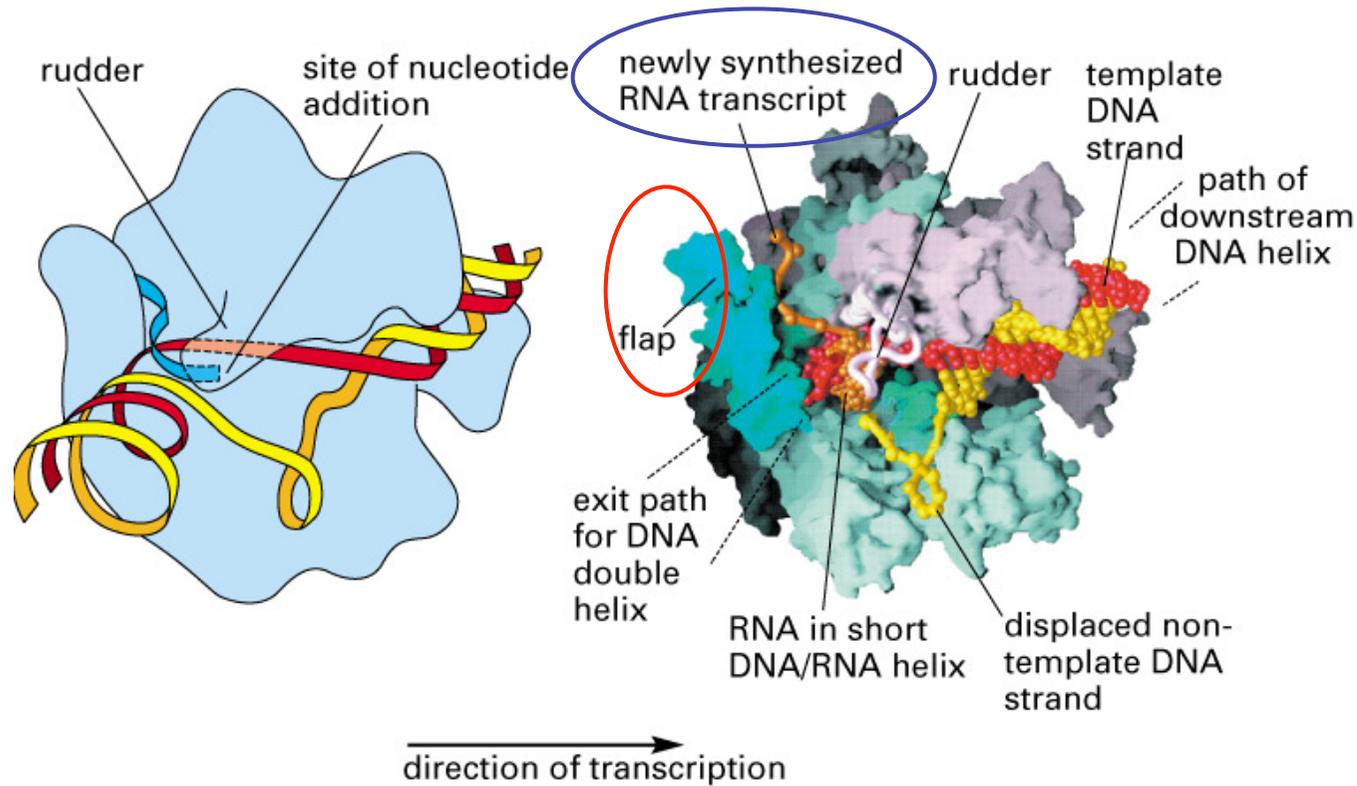
mRNA= 14 Kb

protein= 427 KDa

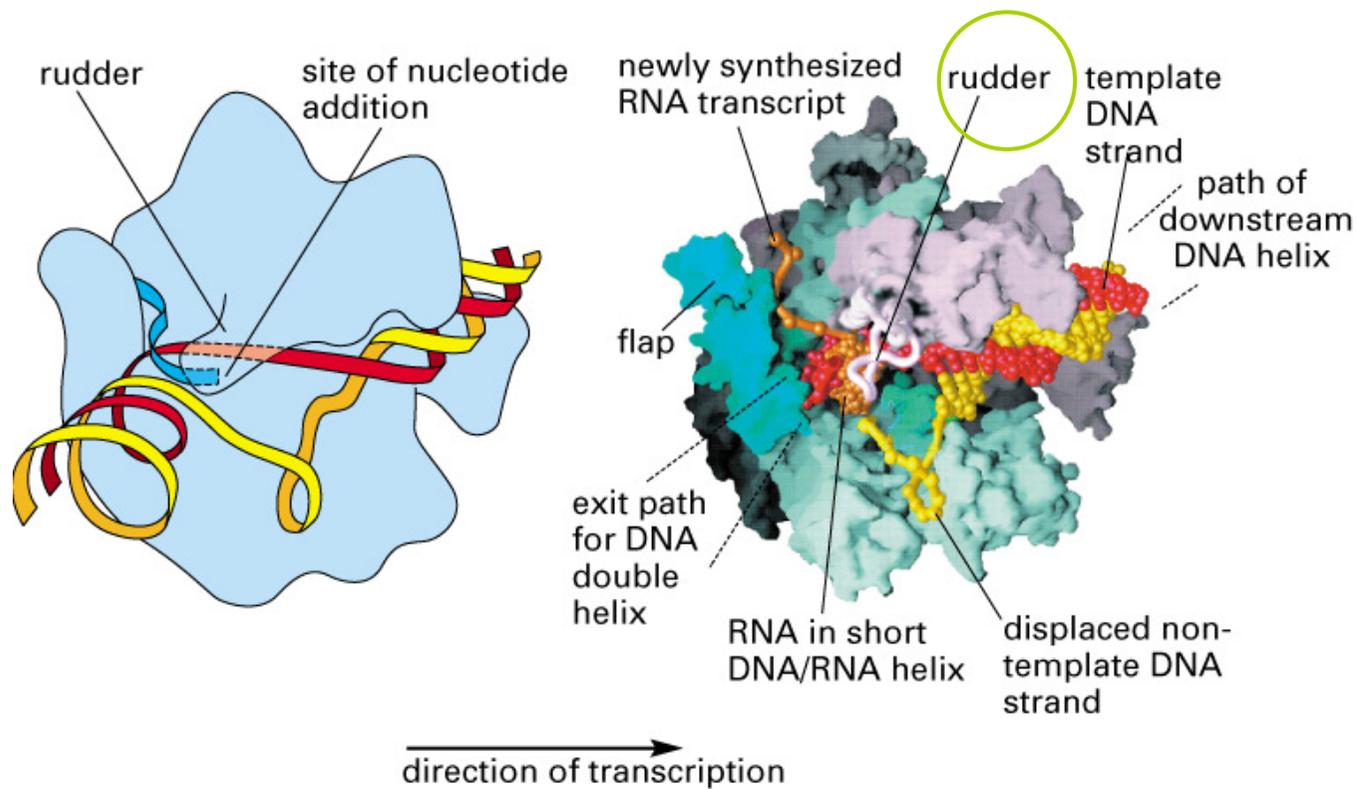
Quando il fattore σ ha posizionato la polimerasi sul promotore ed il DNA è stato aperto e portato nel sito attivo, le **due pinze** si chiudono sul DNA (complesso aperto).



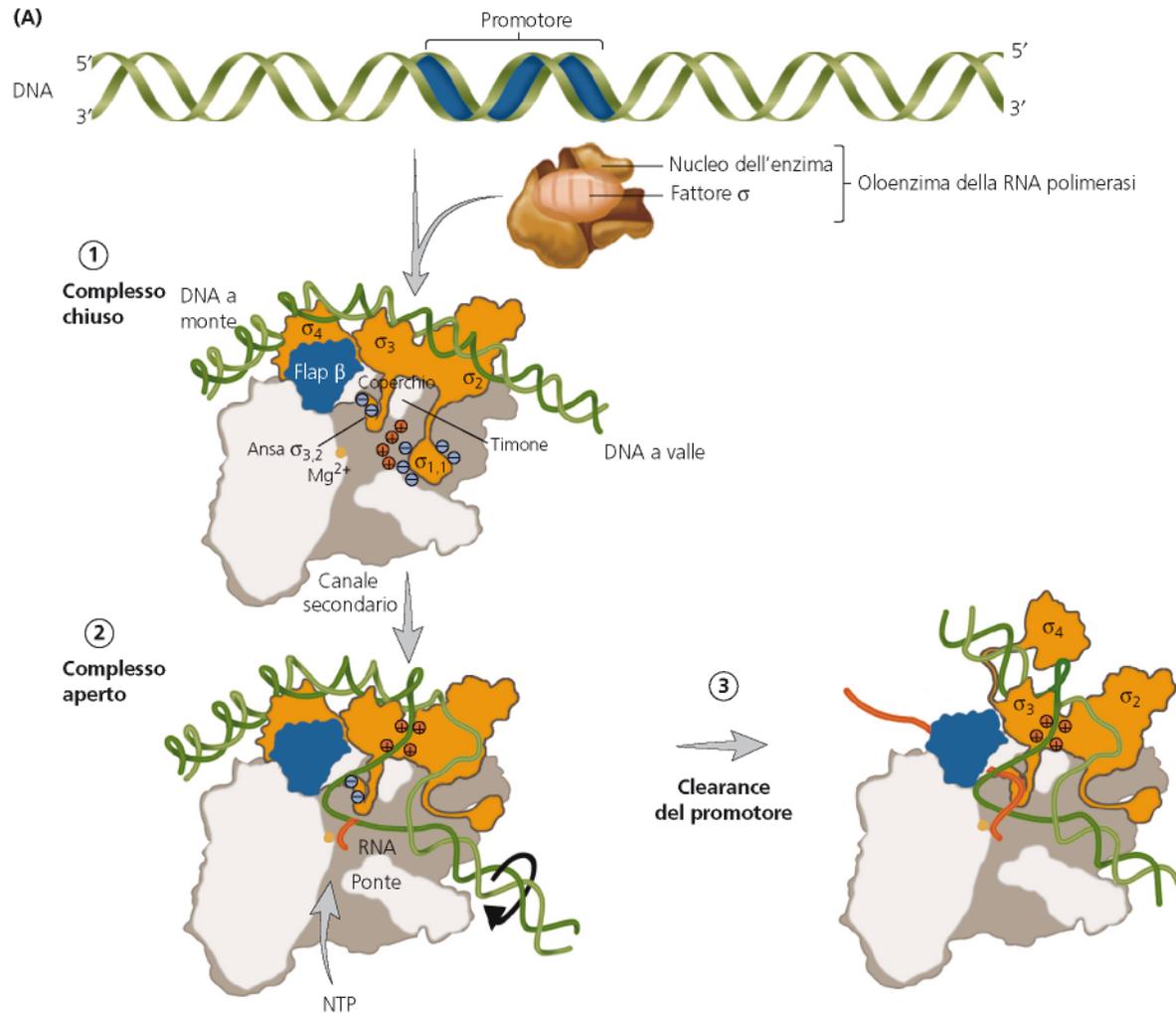
Quando i primi 10 nt sono stati trascritti (clearance del promotore), il rilassamento del fattore σ permette ad una falda (**flap**) di chiudersi a formare un canale attraverso il quale l'**RNA neofornato** esce dalla polimerasi.

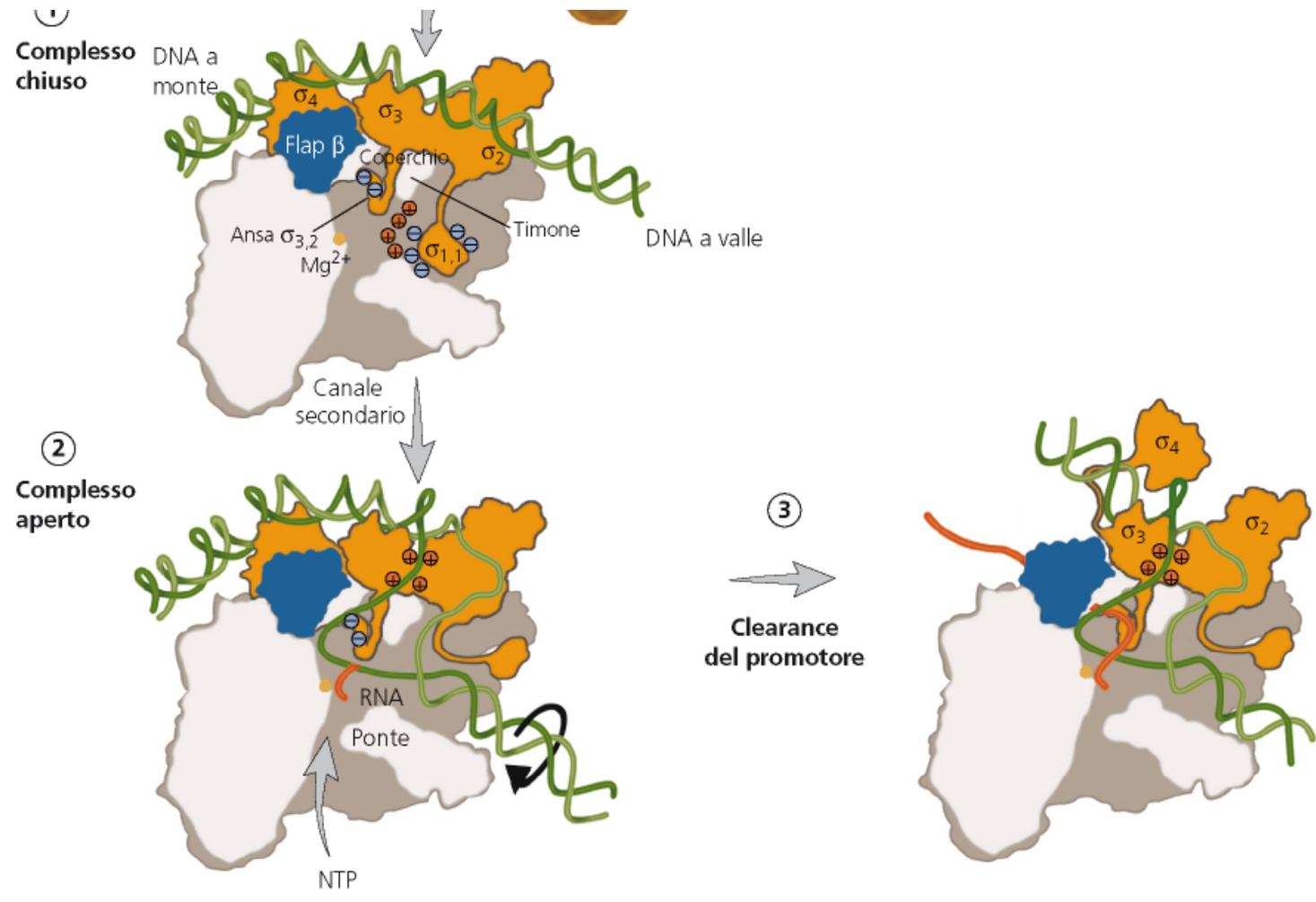


Quando la polimerasi procede nella fase di allungamento, un timone (**rudder**) separa continuamente l'ibrido RNA/DNA.



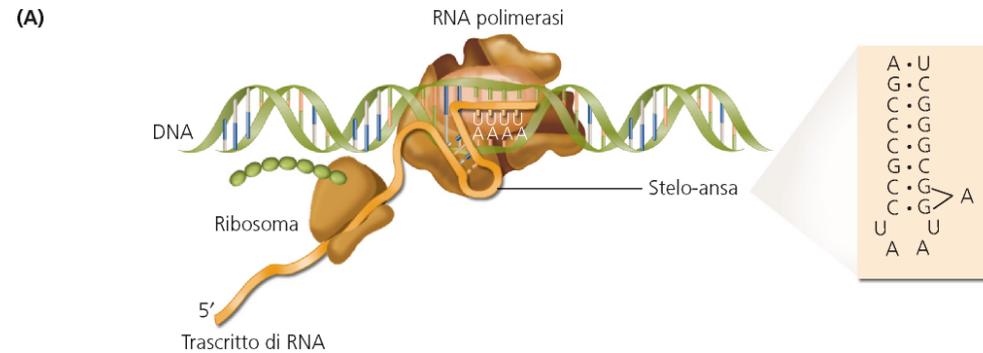
Cambiamenti conformazionali durante i passaggi dell'inizio della trascrizione



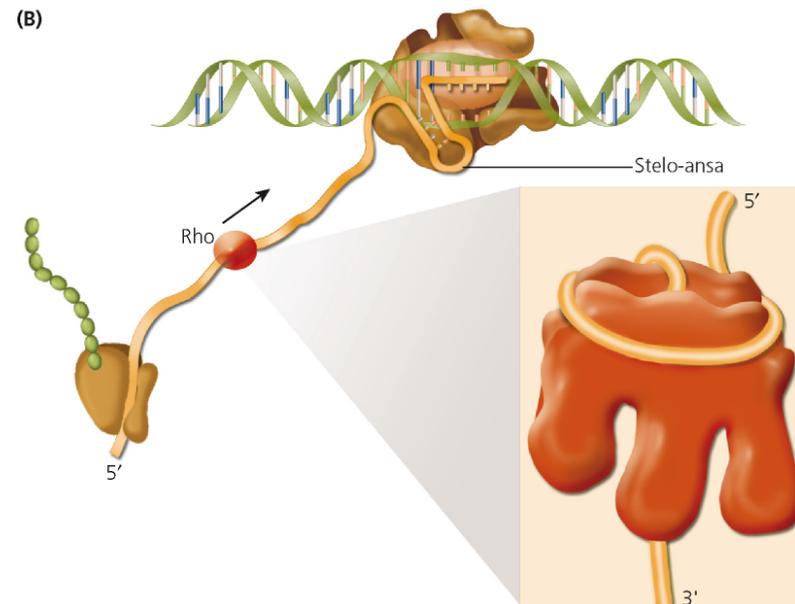


La terminazione della trascrizione nei batteri: come fanno dei segnali di terminazione nel DNA a fermare la trascrizione?

Terminazione rho-indipendente

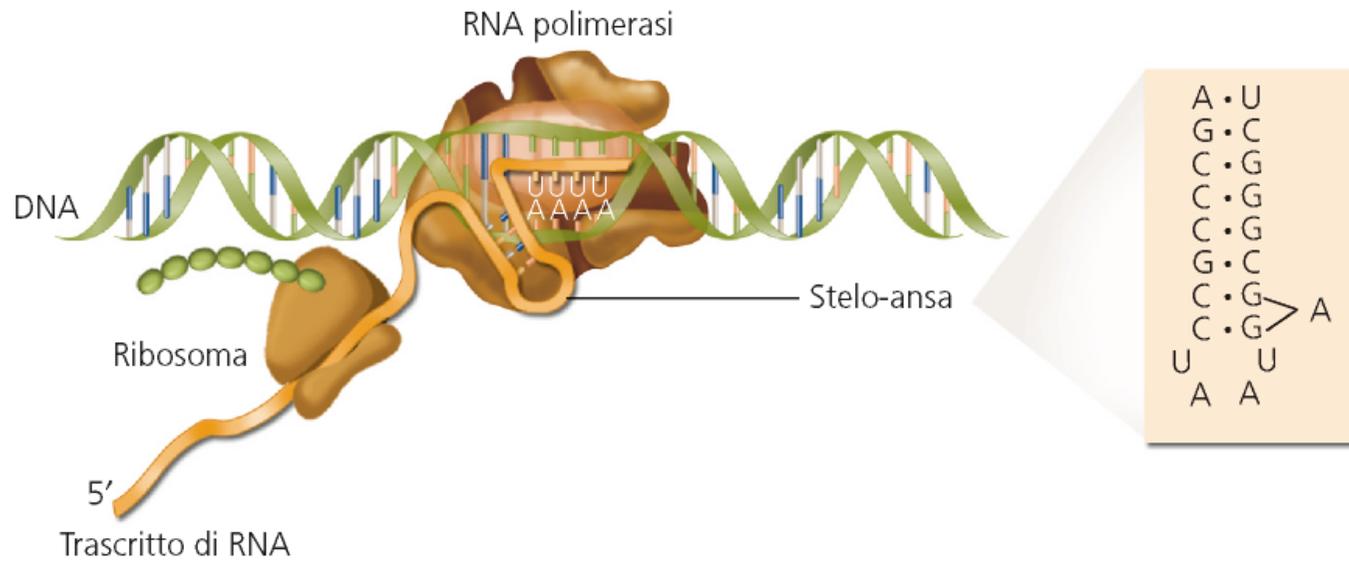


Terminazione rho-dipendente

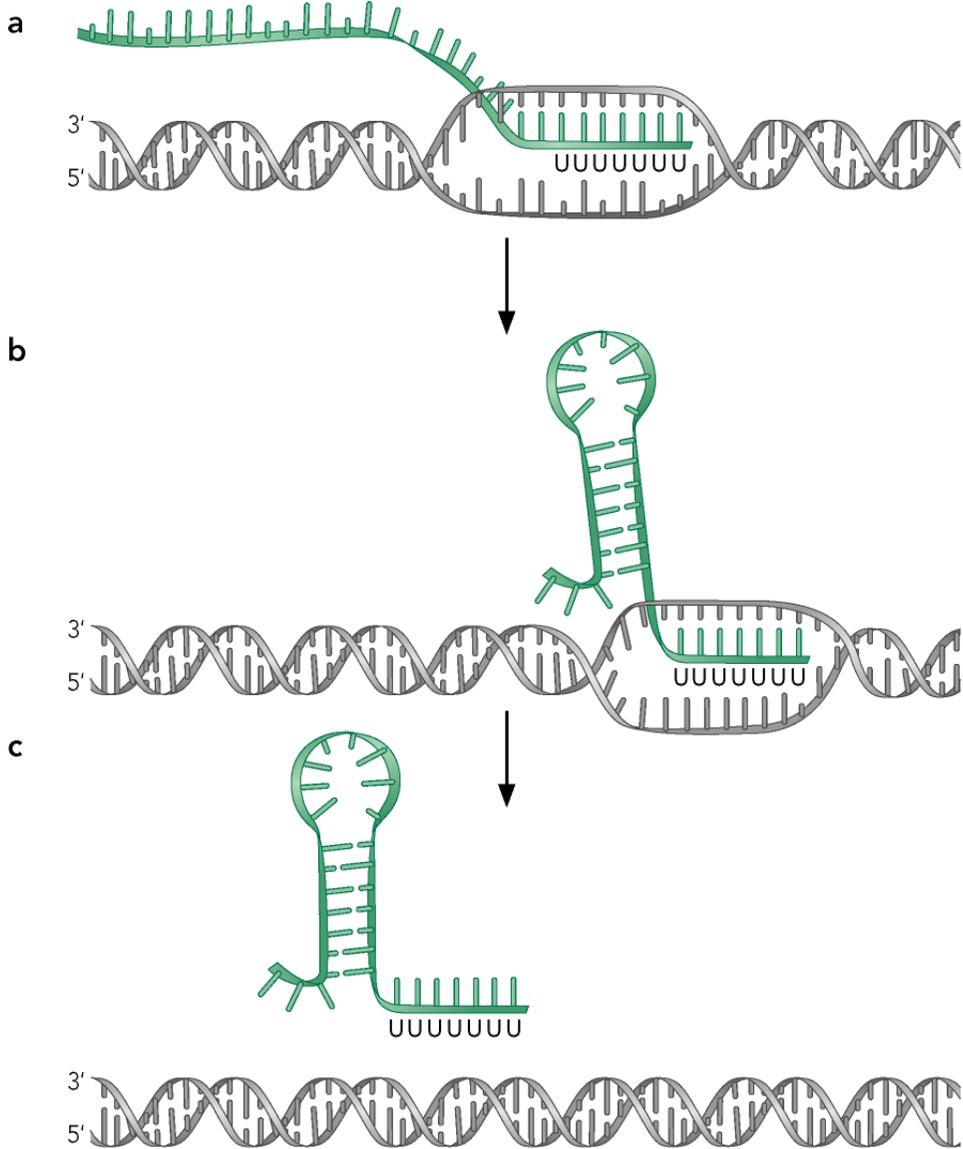


Terminazione rho-indipendente

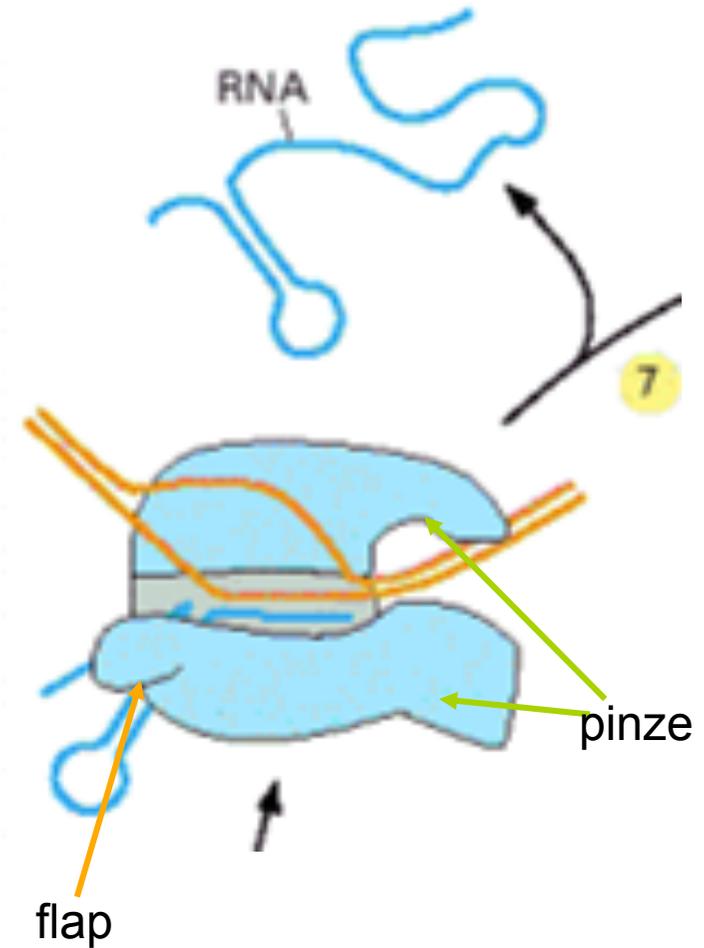
(A)



Terminazione Rho-indipendente

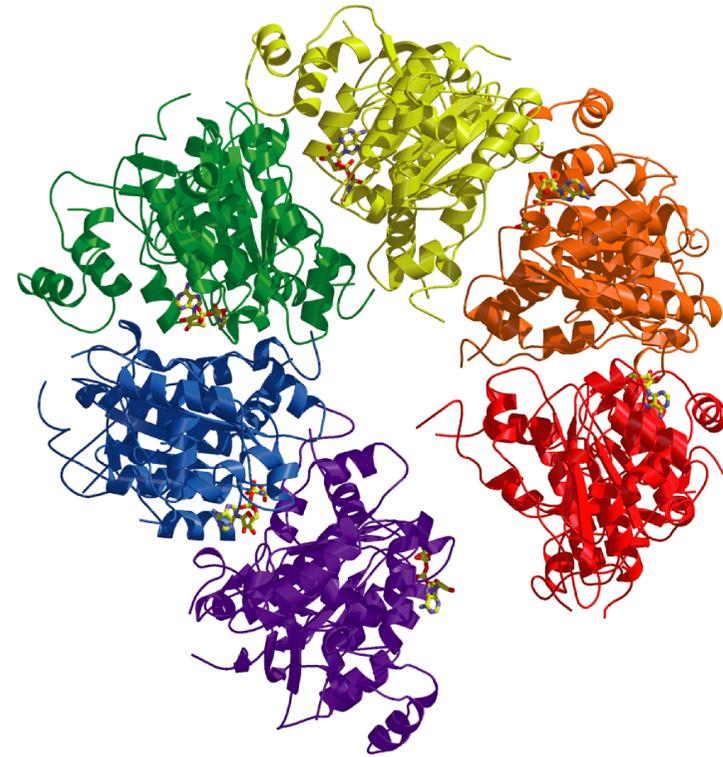
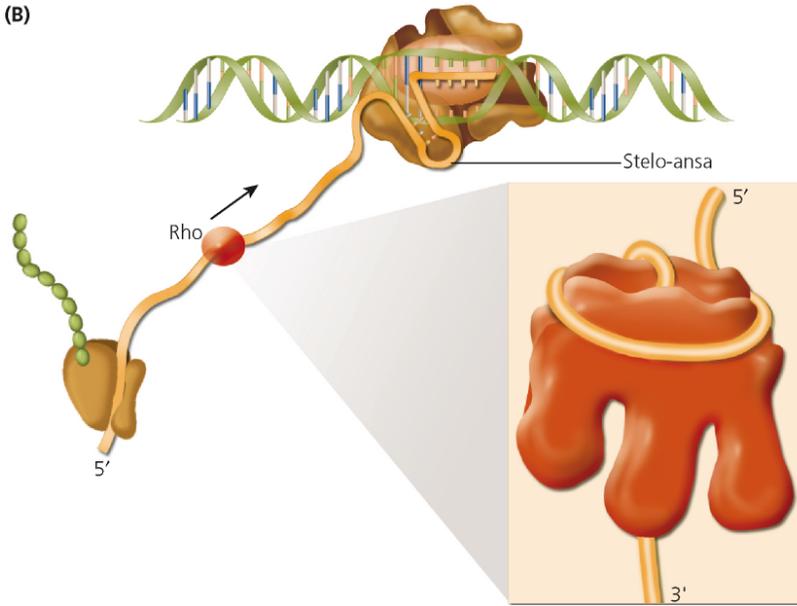


Una sequenza palindromica che trascritta in RNA si ripiega in una forcina, seguita da una stringa di U. Quando la polimerasi copia il terminatore, la forcina forza il **flap** sull'RNA polimerasi, lo apre a lascia uscire l'RNA dal canale. Allo stesso tempo l'ibrido DNA/RNA nel sito attivo, che è tenuto insieme da appaiamenti U-A base pairs (più deboli di G-C), non ha forza sufficiente a tenere in situ l'RNA, che si dissocia, causando il rilascio della polimerasi dal DNA, forse forzando l'apertura delle **pinze**.



Terminazione rho-dipendente

(B)



Rho factor

- Il fattore Rho è una proteina terminatore che si lega al RNA nascente si muove fino a una **sequenza che è ricca in C e povera di G** che precede il sito di terminazione.
- È ~275 kD **esamero di Rho** subunità identiche, della famiglia delle elicasi ATP-dipendenti che funzionano passando l'acido nucleico nel foro dell'esamero.
- I terminatori Rho-dipendenti sono la metà dei terminatori di *E. coli*.

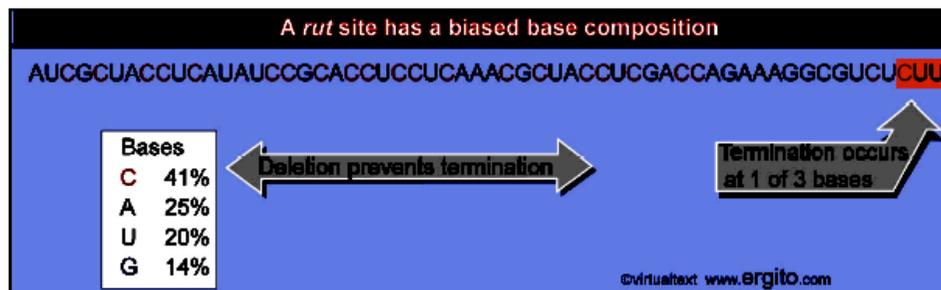


Figure 9.48 A rho-dependent terminator has a sequence rich in C and poor in G preceding the actual site(s) of termination. The sequence is shown in the form of the RNA. It represents the 3' end of the RNA.

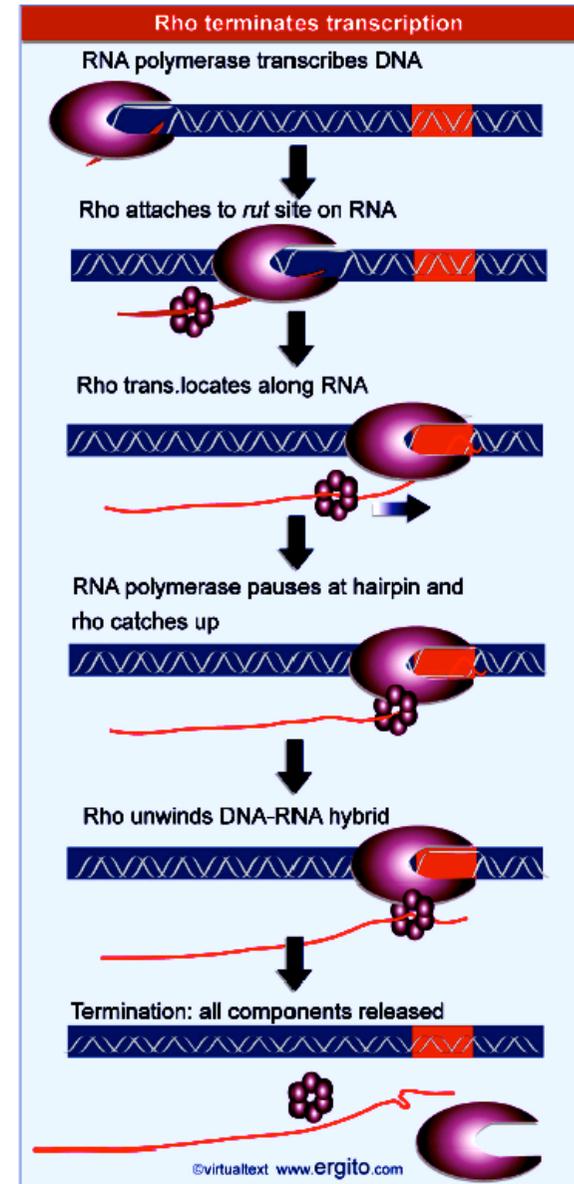
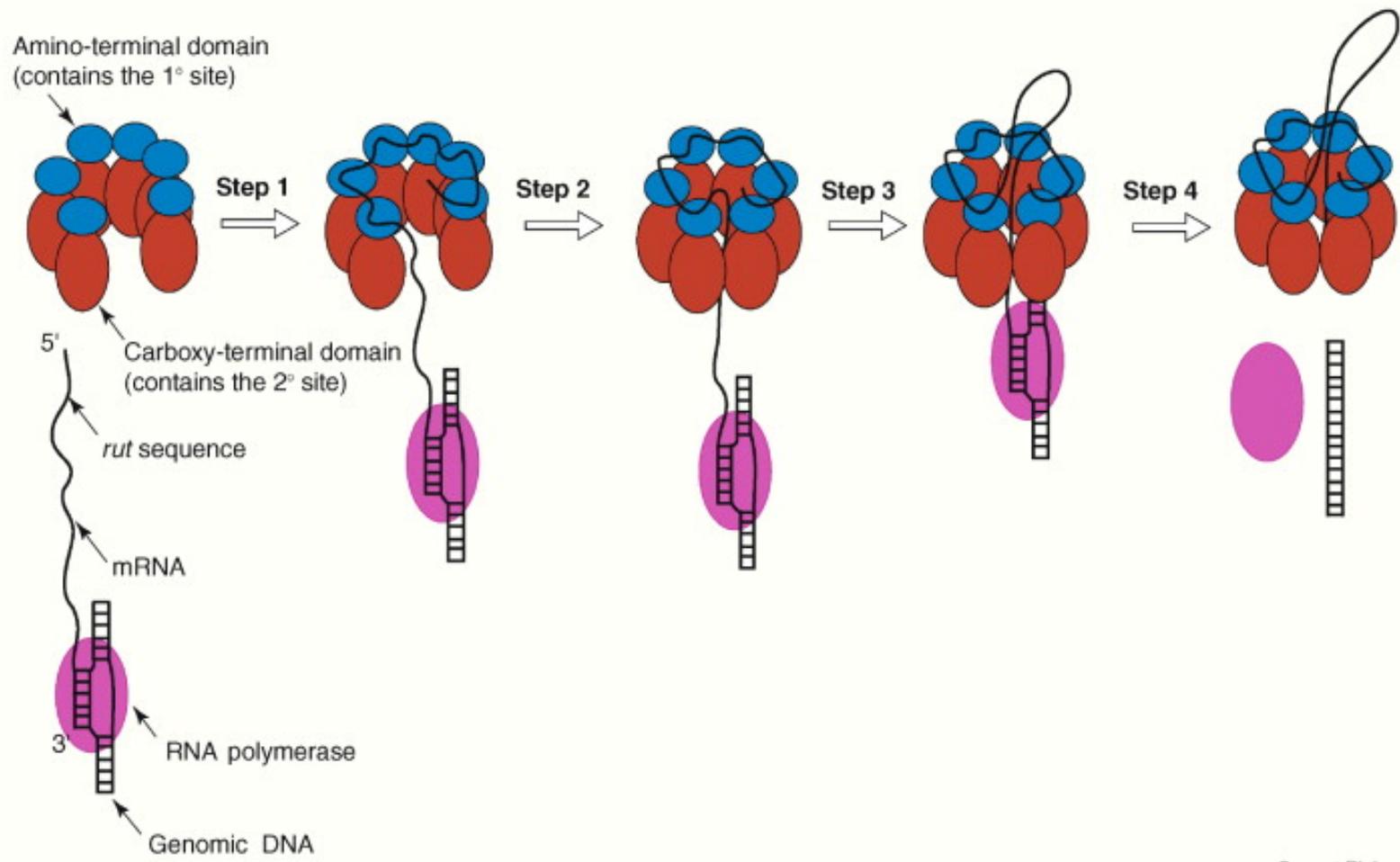


Figure 9.49 Rho factor pursues RNA polymerase along the RNA and can cause termination when it catches the enzyme pausing at a rho-dependent terminator.



Current Biology

Current Biology Volume 13, Issue 18 2003 R714 - R716

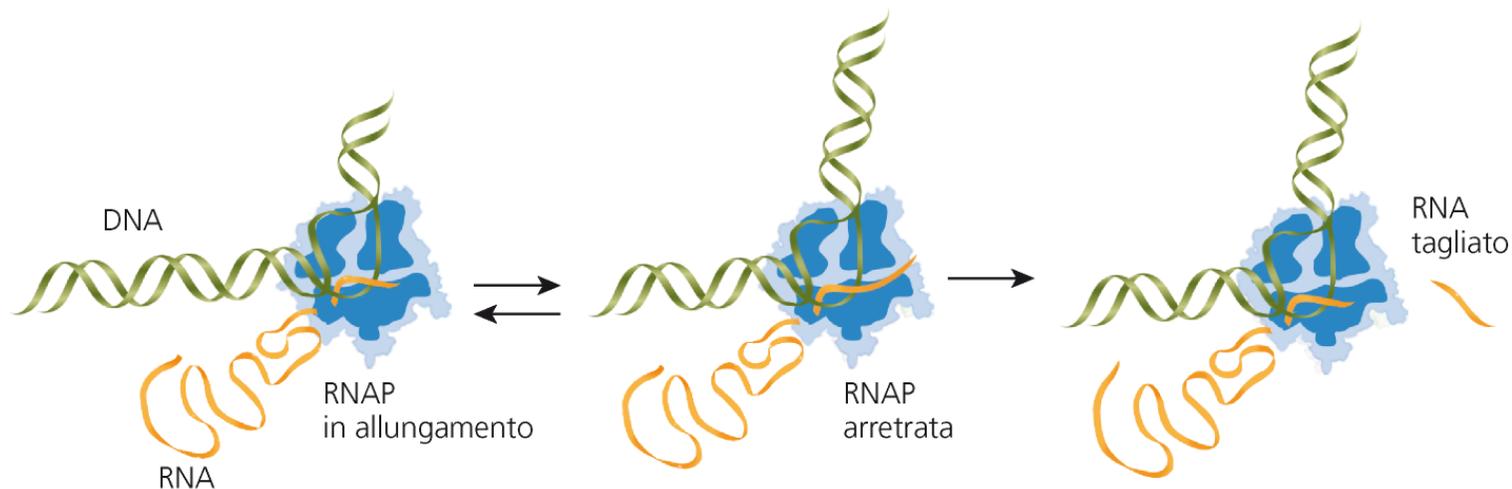
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.047>

La RNA polimerasi in allungamento è una macchina che simultaneamente sintetizza e **corregge le bozze di RNA**.

Sebbene l'attività di correzione delle bozze non sia così importante come per il DNA, l'RNA polimerasi ha due funzioni specifiche di correzione:

-**Editing pirofosfolitico** (rimozione di un NTP inserito in maniera non corretta, tramite la reincorporazione di un P_{Pi});

- **Editing idrolitico**: la polimerasi torna indietro di qualche nucleotide (arretramento) e taglia l'RNA prodotto, per poi continuare la sintesi.

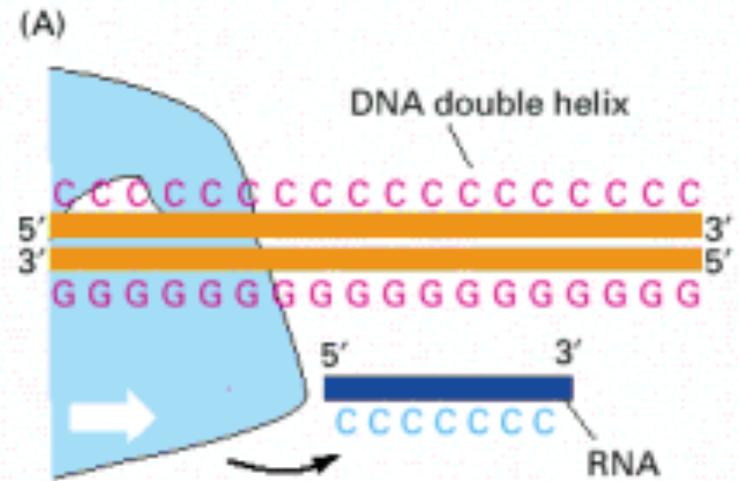


L'importanza dell'orientamento dell'RNA polimerasi.

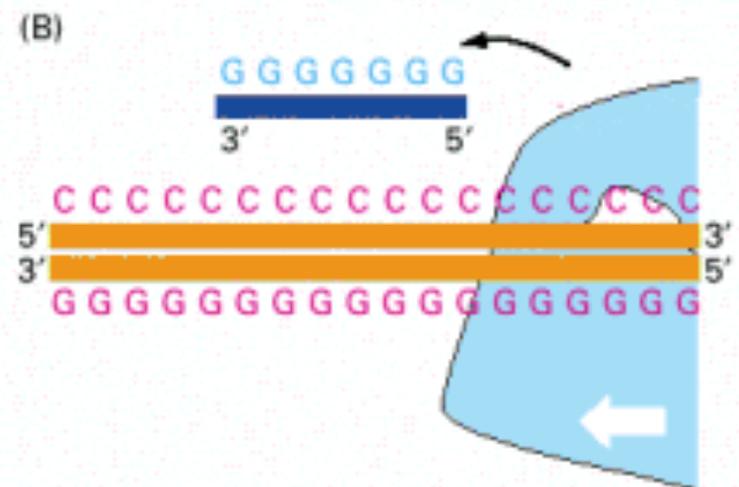
Il DNA stampo deve essere seguito in direzione 3' -5' (poiché l'RNA polimerasi sintetizza in direzione 5' - 3')

La direzione di movimento della RNA polimerasi determina quale dei due filamenti di DNA funziona da stampo per la sintesi di RNA, come mostrato in (A) e (B).

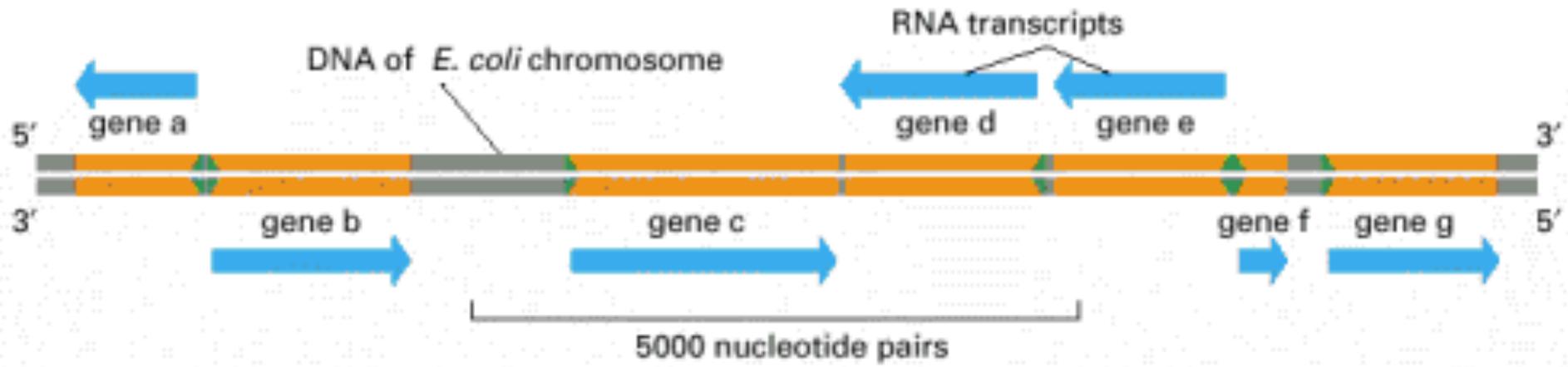
La direzione di avanzamento della polimerasi è determinata dall'orientamento del promotore.



an RNA polymerase that moves from left to right makes RNA by using the bottom strand as a template



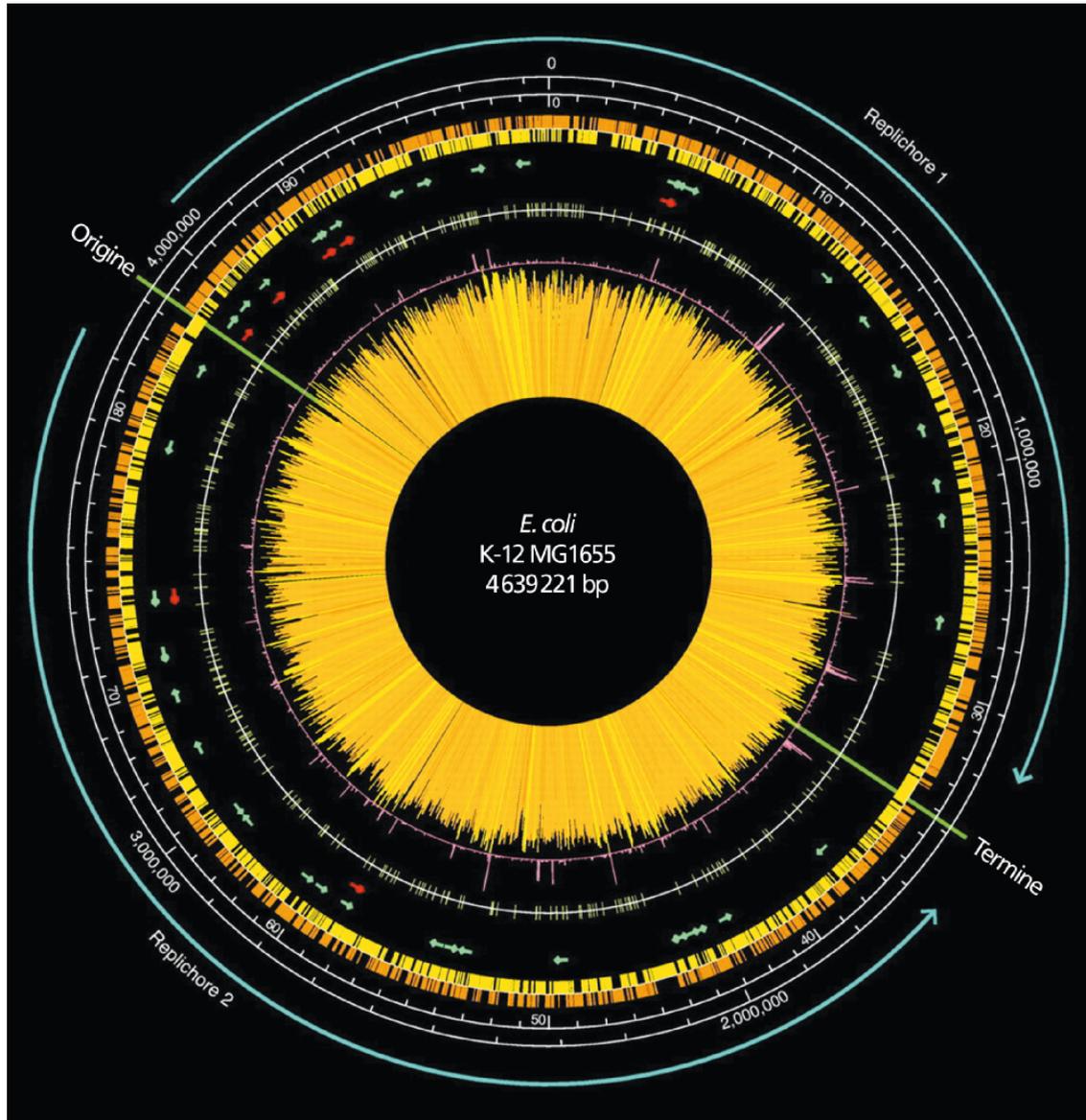
an RNA polymerase that moves from right to left makes RNA by using the top strand as a template



Alcuni geni utilizzano un filamento come stampo, altri geni utilizzano il filamento opposto. La direzione di trascrizione è determinata dal promotore all'inizio di ciascun gene (teste di freccia verdi).

I geni trascritti da sinistra a destra usano il filamento inferiore come stampo, quelli trascritti da destra a sinistra usano il filamento superiore.

La direzione della trascrizione intorno al genoma circolare di *E. coli*



I riquadri **arancioni** rappresentano i geni posti su un filamento, e quelli gialli sul filamento opposto. Le **frece rosse** rappresentano i geni per gli rRNA e le **frece verdi** per i tRNA.

Tensione superelica- DNA supercoiling

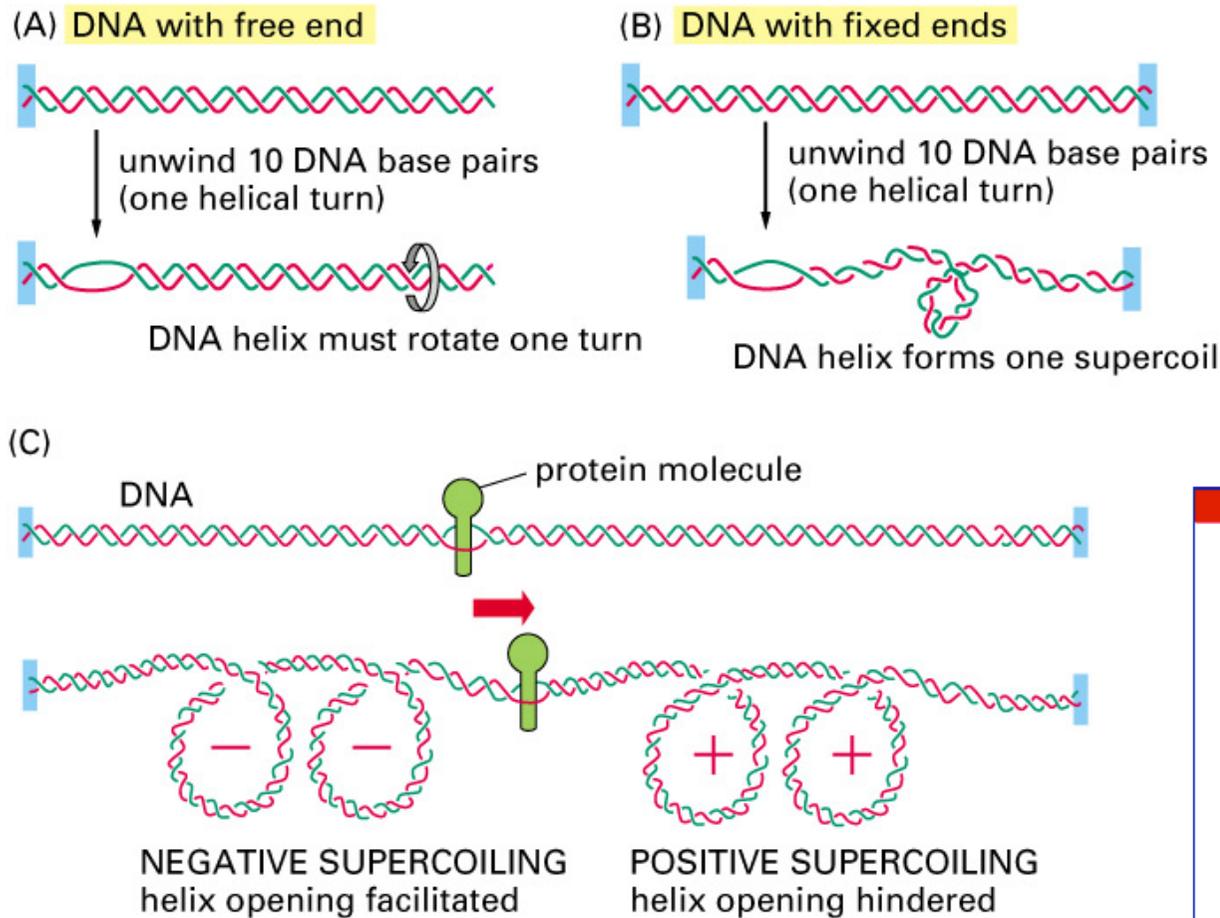


Figure 6-20. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

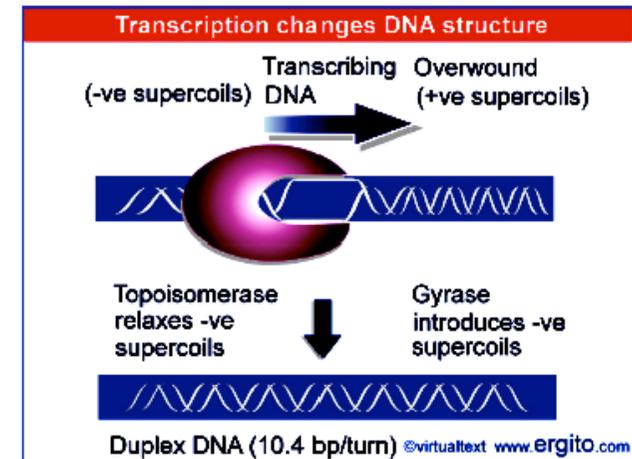


Figure 9.31 Transcription may generate more tightly wound (positively supercoiled) DNA ahead of RNA polymerase, while the DNA behind becomes less tightly wound (negatively supercoiled).