

# RNA e Trascrizione

Trascrizione nei procarioti

# RNA

L'espressione dell'informazione genetica contenuta nel DNA implica sempre la formazione di RNA

L' RNA ha il ruolo di **intermediario** nel convertire l'informazione genetica in proteina funzionale

Oltre alla **funzione informativa** l'RNA può avere altre funzioni:

catalitica

regolativa

**L' RNA HA UNA VERSATILITA' FUNZIONALE MOLTO MAGGIORE DEL DNA**

# COMPLESSI TRA RNA E PROTEINE PARTICELLE RIBONUCLEOPROTEICHE (RNP)

**L'RNA PUÒ SERVIRE DA IMPALCATURA:** l'ossatura sulla quale in modo ordinato la proteina si assembla, riconoscendo la sequenza primaria e/o i motivi strutturali secondari e terziari

**RNP CATALITICHE :** La proteina funziona da enzima ma è compito dell'RNA di indirizzarla o legarla al substrato (telomerasi)

oppure

**RNP CATALITICHE :** L'RNA è catalitico mentre la proteina funge da impalcatura (ribosoma, RNAsi P)

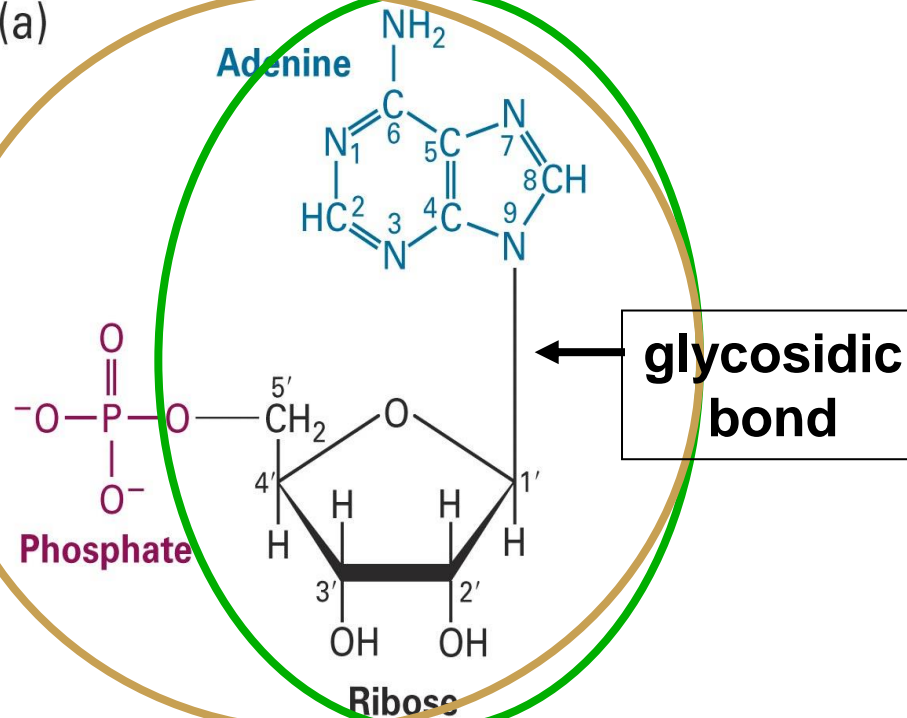
**RNA CATALITICO:** l'RNA può catalizzare reazioni chimiche che avvengono nella cellula (Ribozimi)

**L'RNA PUÒ ESSERE MATERIALE EREDITARIO**

# RNA vs. DNA

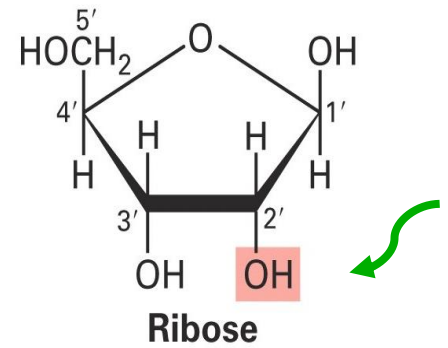
nucleoside

(a)

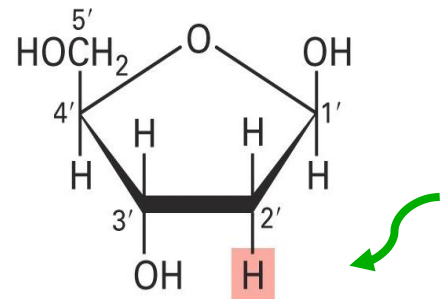


Adenosine 5'-monophosphate (AMP)

(b)



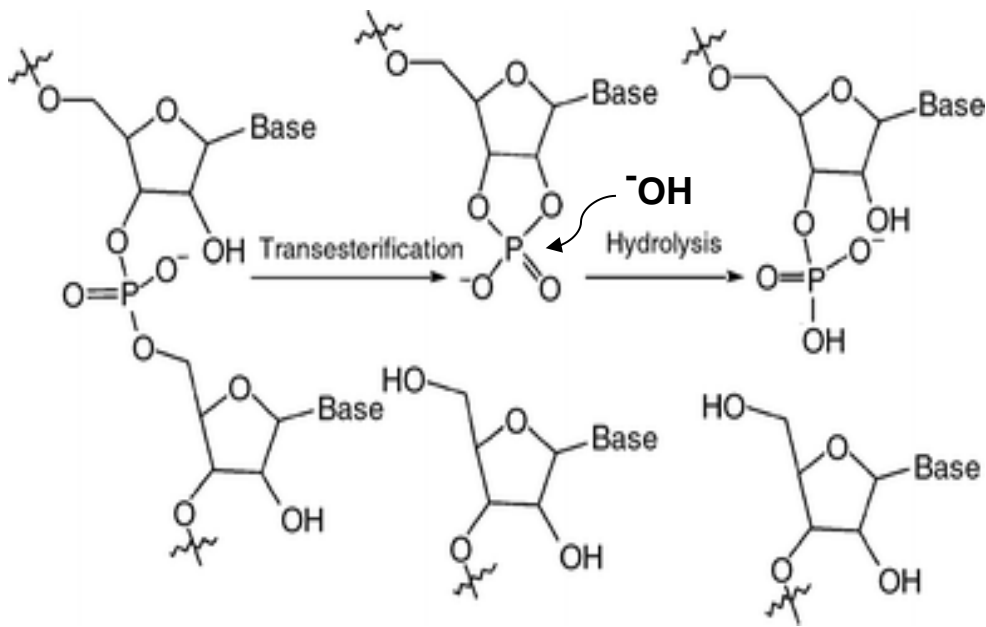
Ribose



2-Deoxyribose

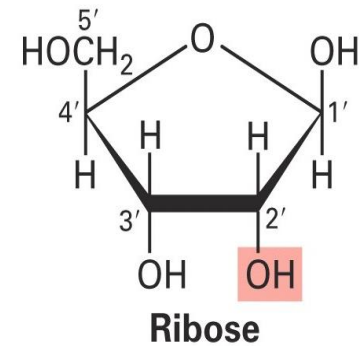
nucleotide

# RNA vs. DNA

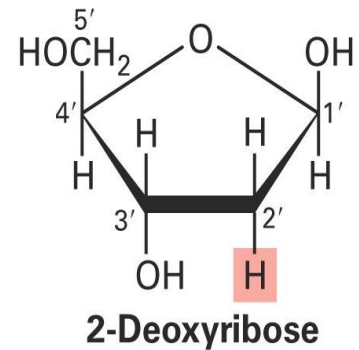


**Base-catalyzed RNA cleavage!**

(b)

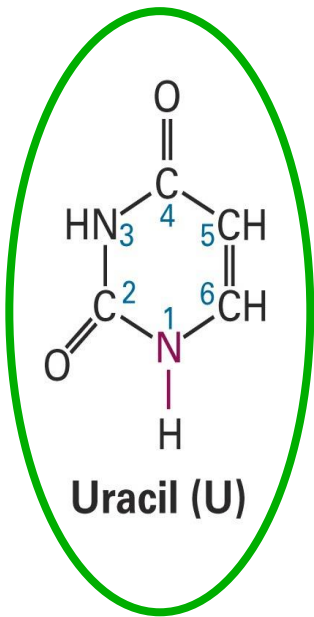


**Unstable backbone**



**Stable backbone**

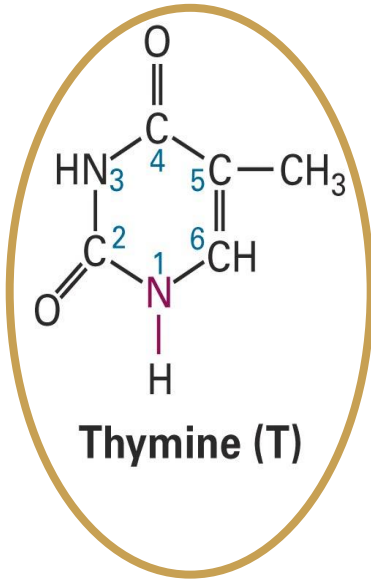
# Different bases in RNA and DNA



Uracil (U)

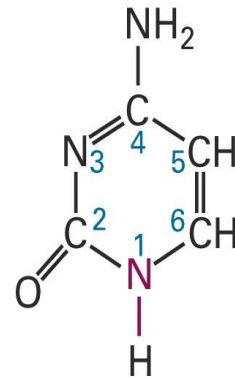
RNA  
only

## PYRIMIDINES

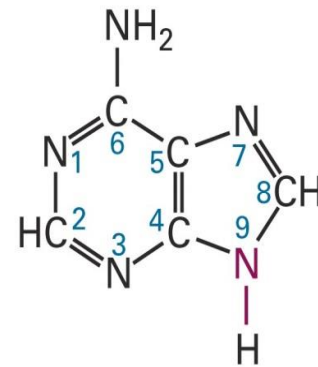


Thymine (T)

DNA  
only



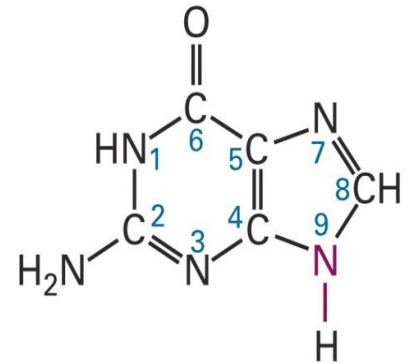
Cytosine (C)



Adenine (A)

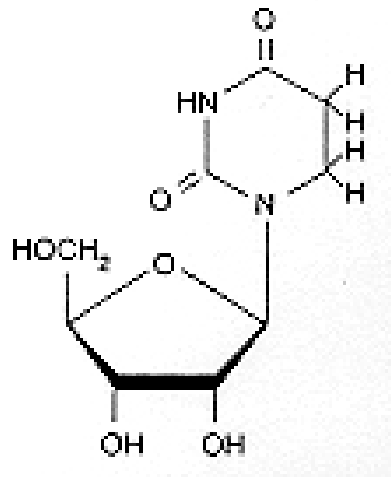
DNA and RNA

## PURINES

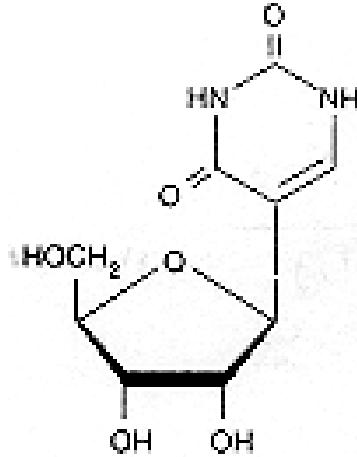


Guanine (G)

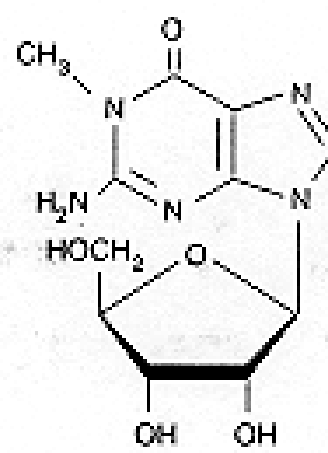
# Examples of modified bases found in RNA



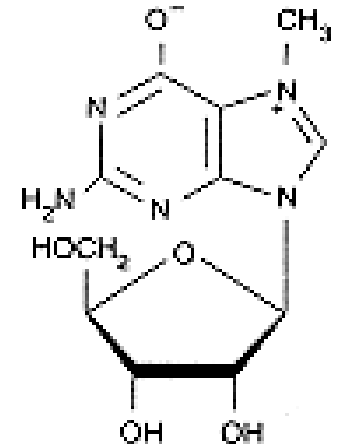
**Dihydrouridine**



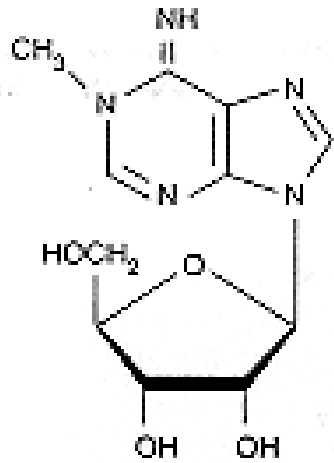
**Pseudouridine**



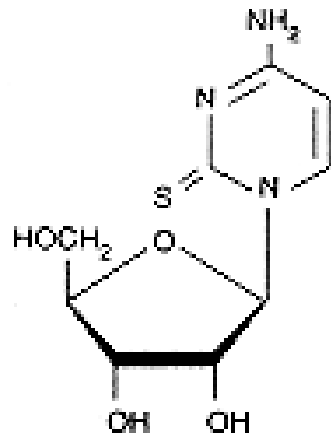
**1-methylguanosine**



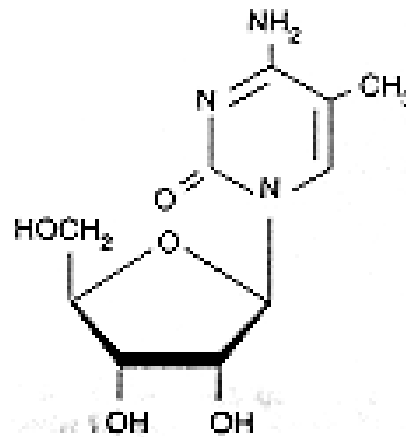
**7-methylguanosine**



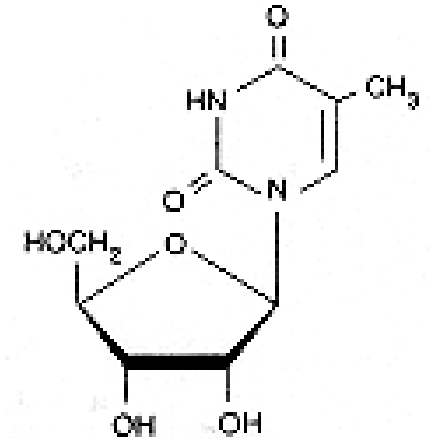
**1-methyladenosine**



**2-thiocytidine**



**5-methylcytidine**



**Ribothymine**

# Examples of RNA structural motifs

## Secondary structures

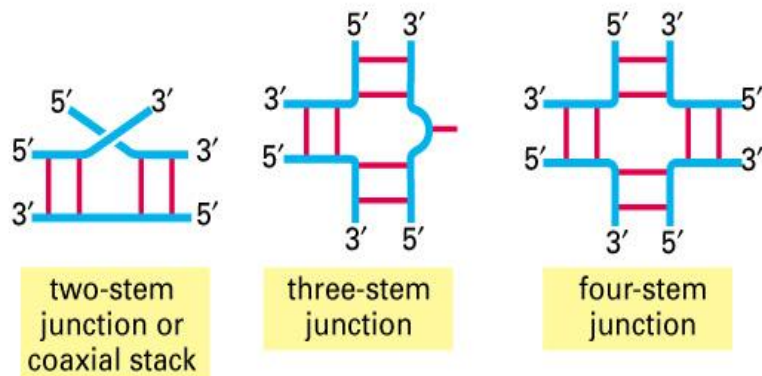
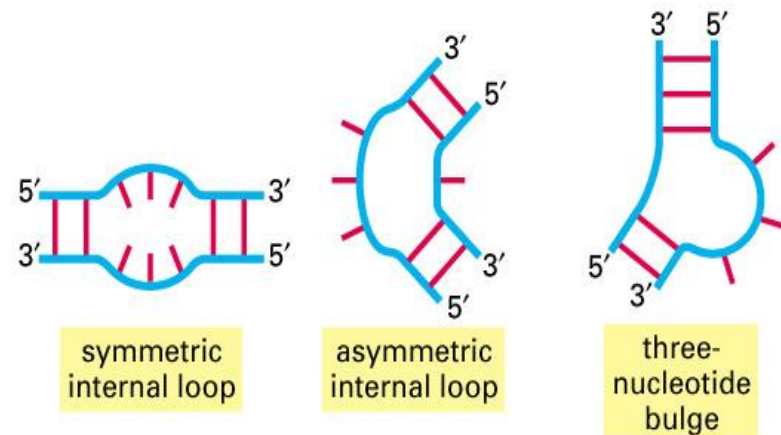
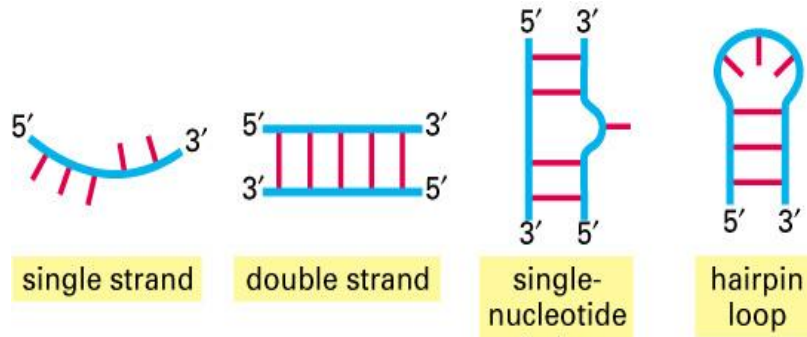


Figure 6-94. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Tertiary structures

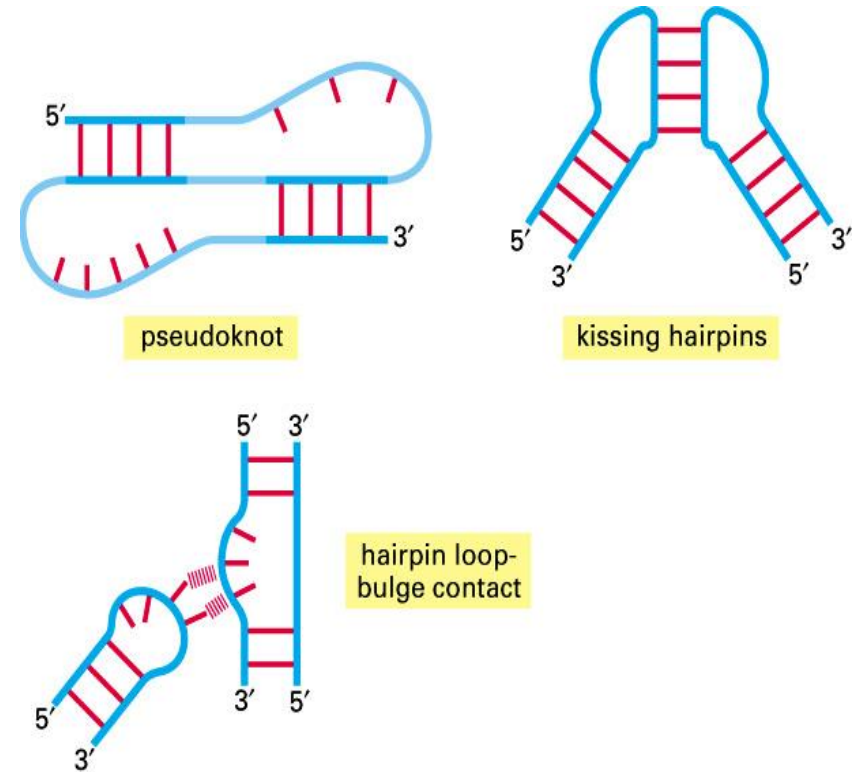
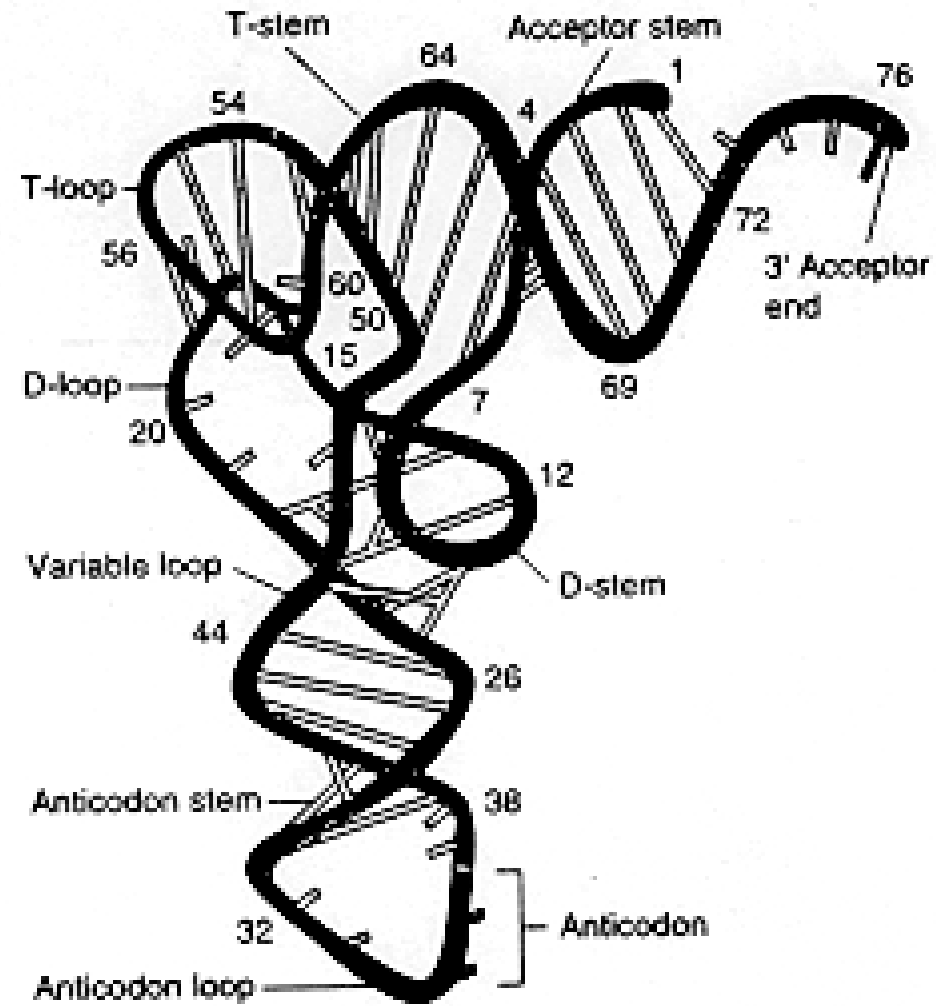
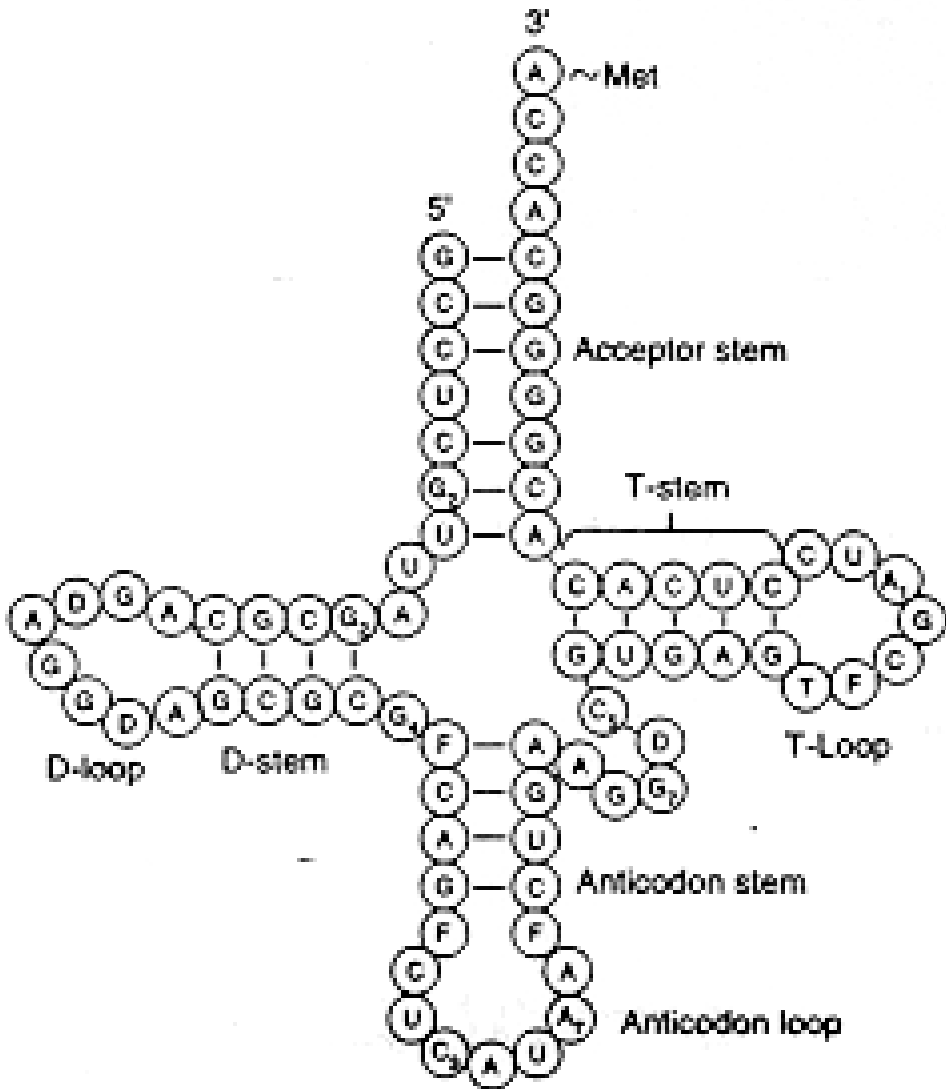


Figure 6-95. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Le regioni di **non complementarità** formano le **anse (loop)**  
 Le regioni **complementari** formano gli **steli (stem)**

# Secondary structure



# Tertiary structure

# CONFRONTO

## Replicazione

## Trascrizione

meccanismo chimico  
direzione di sintesi (5' > 3')  
uso di uno stampo

primer

/

coinvolge l'intero cromosoma

è selettiva

entrambe le due catene  
servono da stampo

solo una delle due catene  
serve da stampo

attività di correzione 3' > 5'

molto scarsa

velocità di polimerizzazione  
500-1000nt/sec

50nt/sec

# CATENA STAMPO E CATENA CODIFICANTE NEL DNA

Le due catene hanno funzioni differenti durante la trascrizione:

(5') CGCTATAGCGTTT (3')

Catena non-stampo (codificante) di DNA

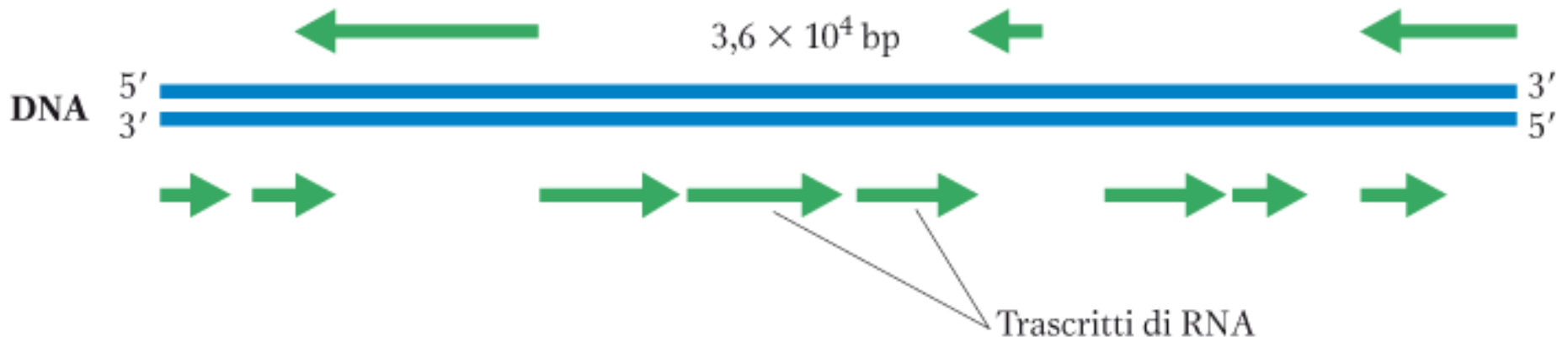
(3') GCGATATCGCAA (5')

Catena stampo di DNA

(5') CGCUAUAGCGUUU (3')

Trascritto di RNA

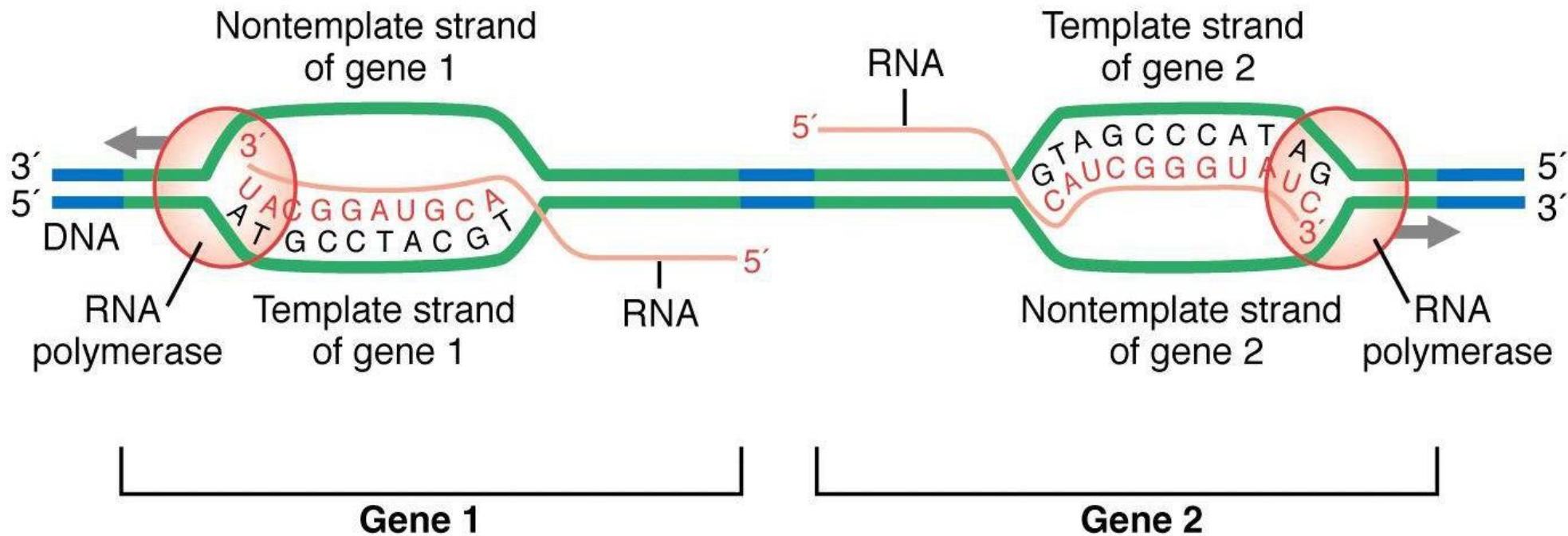
# IN OGNI CROMOSOMA, PER GENI DIFFERENTI POSSONO ESSERE USATE CATENE DIFFERENTI COME STAMPO



Nelson & Cox I principi di Biochimica di Lehninger- Zanichelli 6 ed.

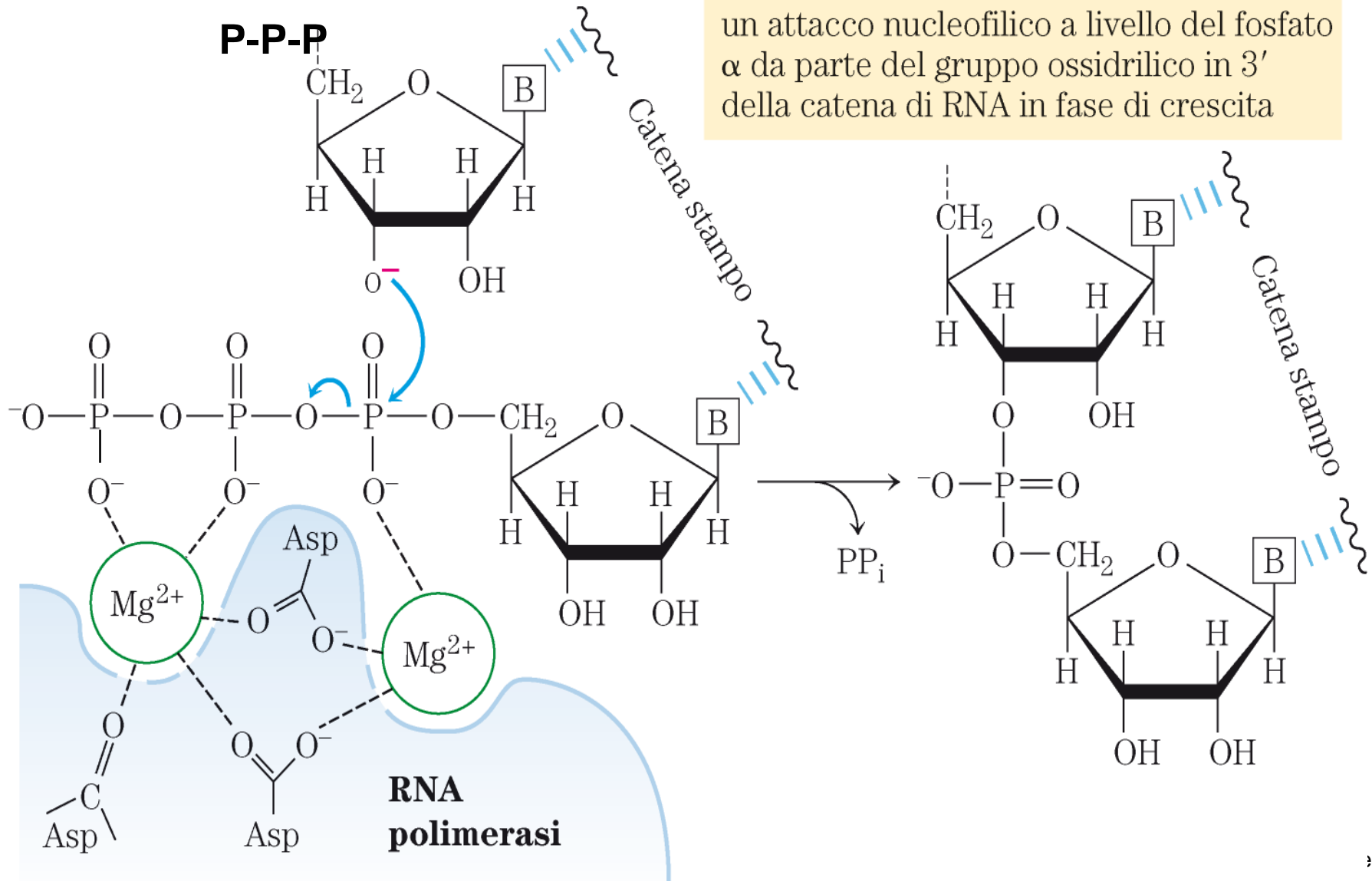
**Esempio: genoma di adenovirus**

Geni diversi posti sullo stesso cromosoma possono avere come “coding strand” filamenti diversi del DNA



# Sintesi dell'RNA dipendente da DNA

Il nucleoside trifosfato entrante subisce un attacco nucleofilo a livello del fosfato  $\alpha$  da parte del gruppo ossidrilico in 3' della catena di RNA in fase di crescita



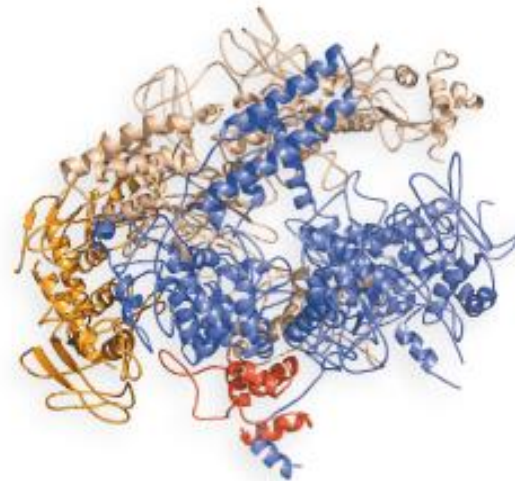
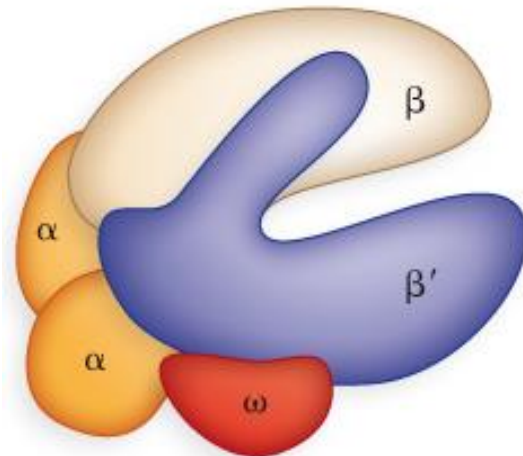
## Major classes of prokaryotic RNA

- ribosomal RNA (rRNA)
  - 16S (small ribosomal subunit)
  - 23S (large ribosomal subunit)
  - 5S (large ribosomal subunit)
- transfer RNA (tRNA)
- messenger RNA (mRNA)

There is just one bacterial RNA polymerase

# PROKARYOTIC RNA POLYMERASE STRUCTURE

<u>Subunit</u>	<u>Number</u>	<u>Role</u>
$\alpha$	2	binds sequences upstream the promoter
$\beta$ (Rifampicin target)	1	forms phosphodiester bonds
$\beta'$	1	binds DNA template
$\sigma$	1	recognizes promoter
$\omega$	1	?



# La sintesi dell'RNA avviene in tre fasi

1. L'RNA polimerasi **cerca i siti di inizio (promotori)** cui si lega. La trascrizione è selettiva

# INTERAZIONE DNA-RNA POLIMERASI di *E. coli* regione -70 e +30 pb

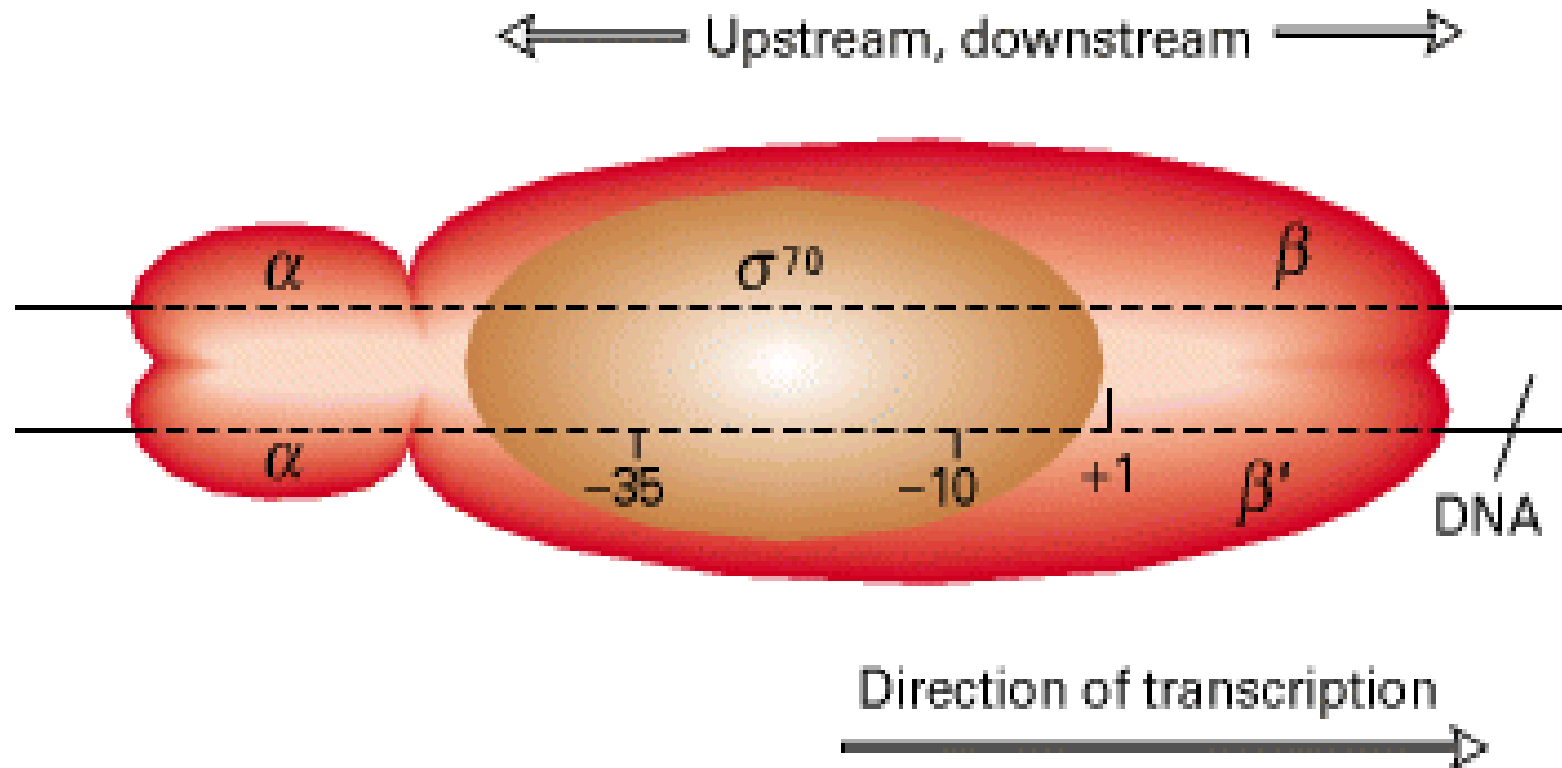
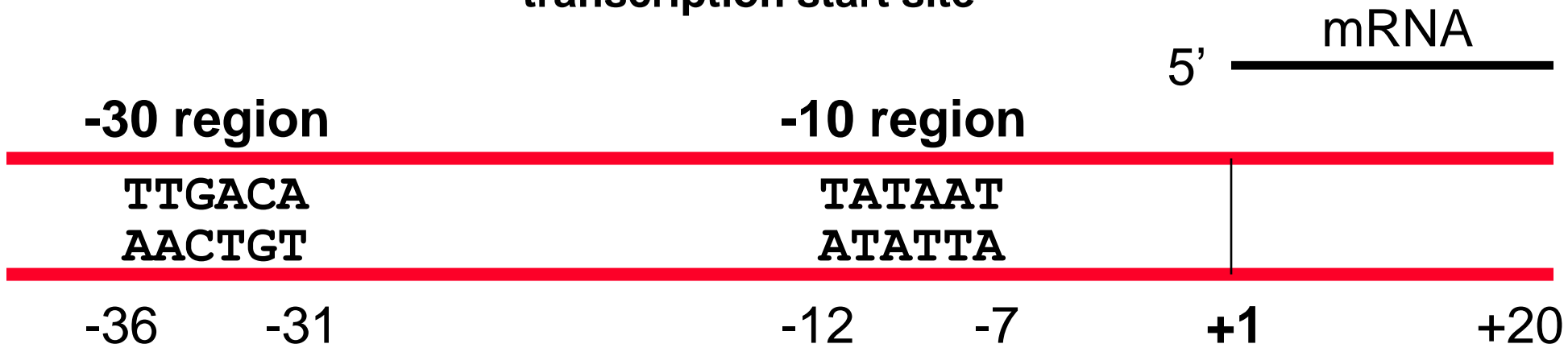
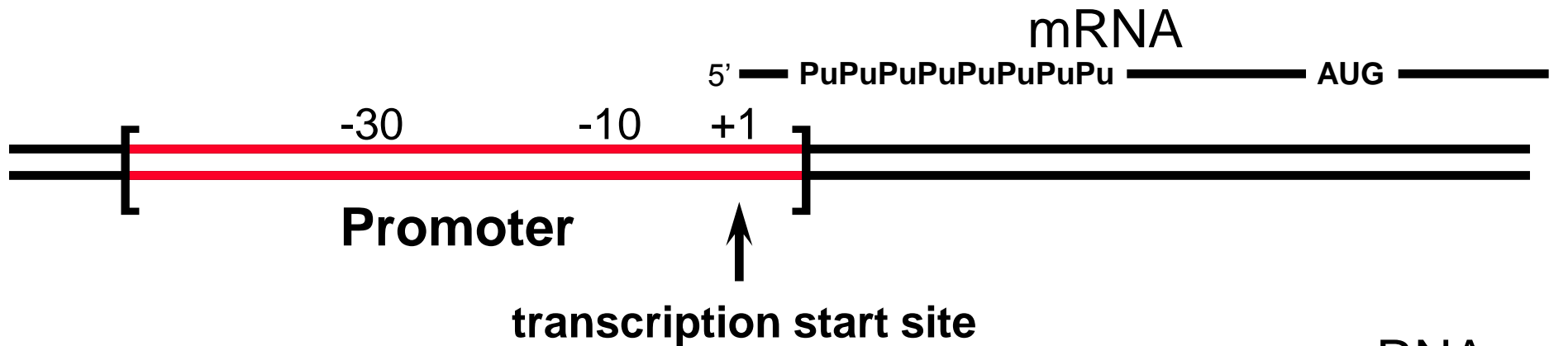


Figure 10-10. **Schematic representation of the major form of *E. coli* RNA polymerase bound to DNA.** By convention, the transcription-initiation site is generally numbered +1. Base pairs extending in the direction of transcription are said to be downstream of the start site; those extending in the opposite direction are upstream. The  $\sigma^{70}$  subunit binds to specific sequences near the 10 and 35 positions in the promoter. The  $\alpha$  subunits lie close to the DNA in the upstream direction. The  $\beta$  and  $\beta'$  subunits associate with the start site.

# PROMOTER STRUCTURE IN PROKARYOTES



**Pribnow box**

**TTGACA**      **TATAAT**

82 84 79 64 53 45%      79 95 44 59 51 96%

**consensus sequences**

# THE FUNCTION OF SIGMA FACTOR

- the **sigma** subunit of RNA polymerase is an “**initiation factor**”
- there are several **different sigma factors (n=7)** in E. coli that are specific for different sets of genes
- **sigma factor functions to ensure that RNA polymerase binds stably to DNA only at promoters**
- sigma **destablizes nonspecific binding** to non-promoter DNA
- sigma **stabilizes specific binding to promoter DNA**
- this accelerates the search for promoter DNA

$K_a$  ( $M^{-1}$ )

Any DNA  
(nonspecific)

Promoter DNA  
(specific)

Core

$2 \times 10^{11}$

Holo

$1 \times 10^7$

$10^{13}$  to  $10^{15}$

- promoters vary in “strength” by ~two orders of magnitude

## Differenti subunità sigma ( $\sigma$ ): sette subunità specifici per differenti set di geni

5' ~~~~~ <sup>-35</sup>TTGACA ~~~~~ <sup>-10</sup>TATAAT ~~~~~ 3'

Promotore comune

5' ~~~~~ TNNCNCNC TTGAA ~~~~~ CCCATNT ~~~~~ 3'

Promotore delle proteine dello shock da calore

5' ~~~~~ CTGGGNA ~~~~~ TTGCA ~~~~~ 3'

Promotore delle proteine della carenza di azoto

Berg J, Tymoczko JL, Stryer L. Biochimica- Zanichelli 6 ed

Il tipo di geni espressi dipende dalla disponibilità delle subunità  $\sigma$

# Regolazione della RNA polimerasi

La regolazione dell'inizio della trascrizione consiste nella **regolazione dell'interazione** della RNA polimerasi con il suo promotore

**i promotori differiscono in sequenza nucleotidica**



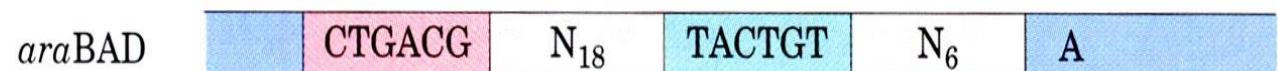
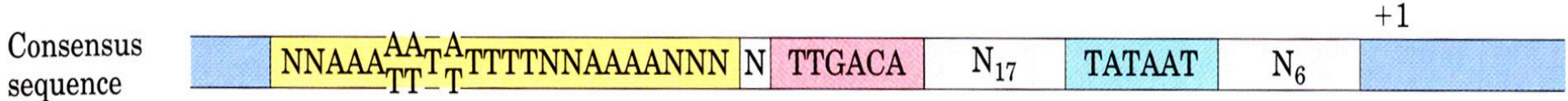
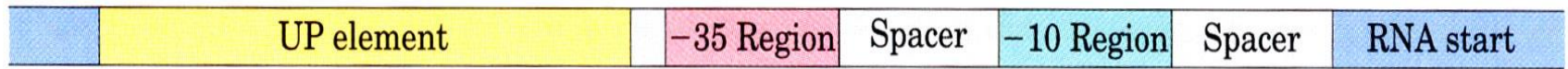
**affinità di legame della RNA polimerasi**



**frequenza di inizio della trascrizione**

**i promotori differiscono molto per la loro efficacia**

# Typical E.coli promoters recognized by an RNA polymerase holoenzyme containing $\sigma 70$



Nelson & Cox I principi di Biochimica di Lehninger- Zanichelli 6 ed.

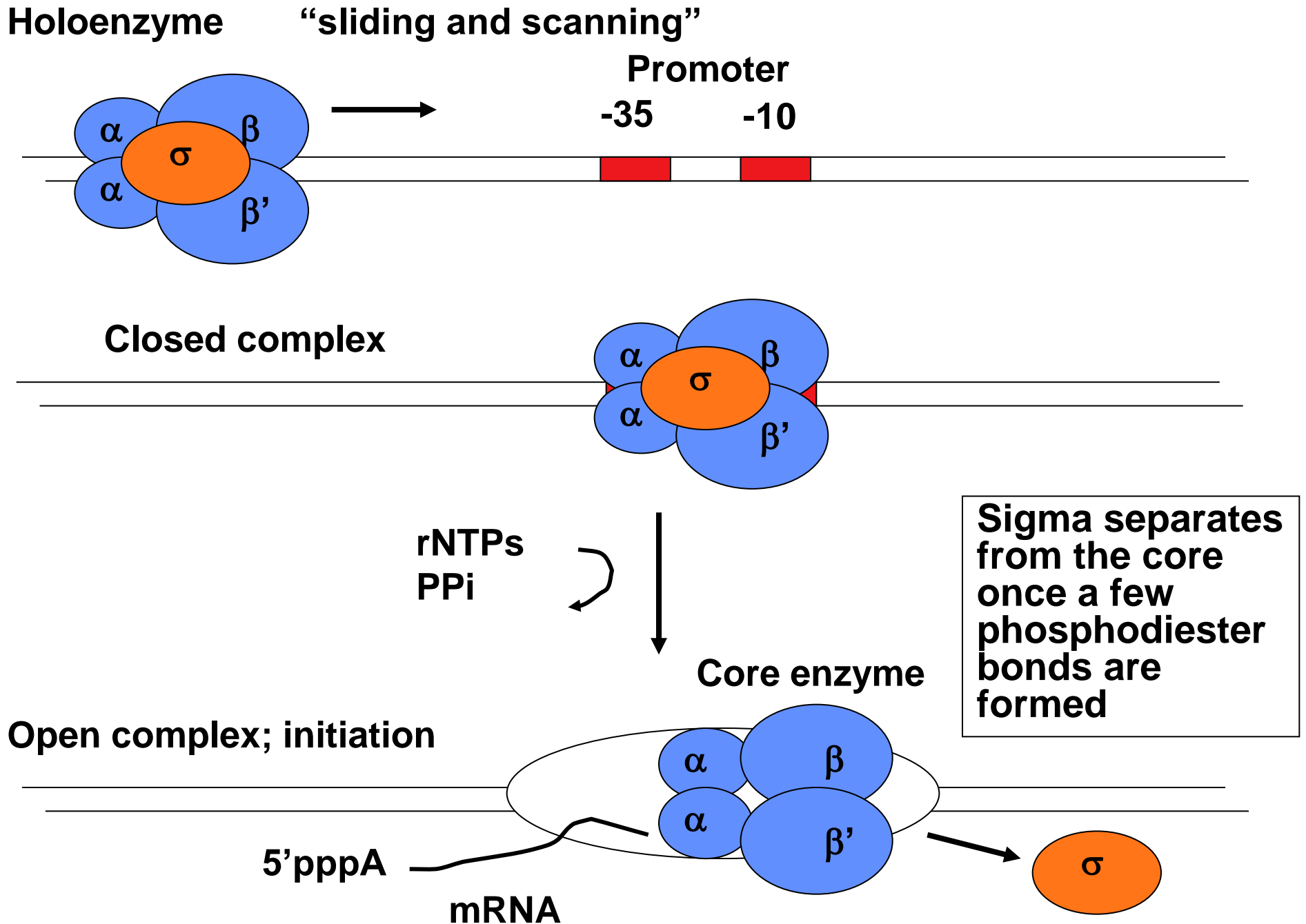
**Strong promoters:** close to consensus sequences and spacing  
**Weak promoters:** contain multiple substitutions at the -35 and -10 regions

# La sintesi dell'RNA avviene in tre fasi

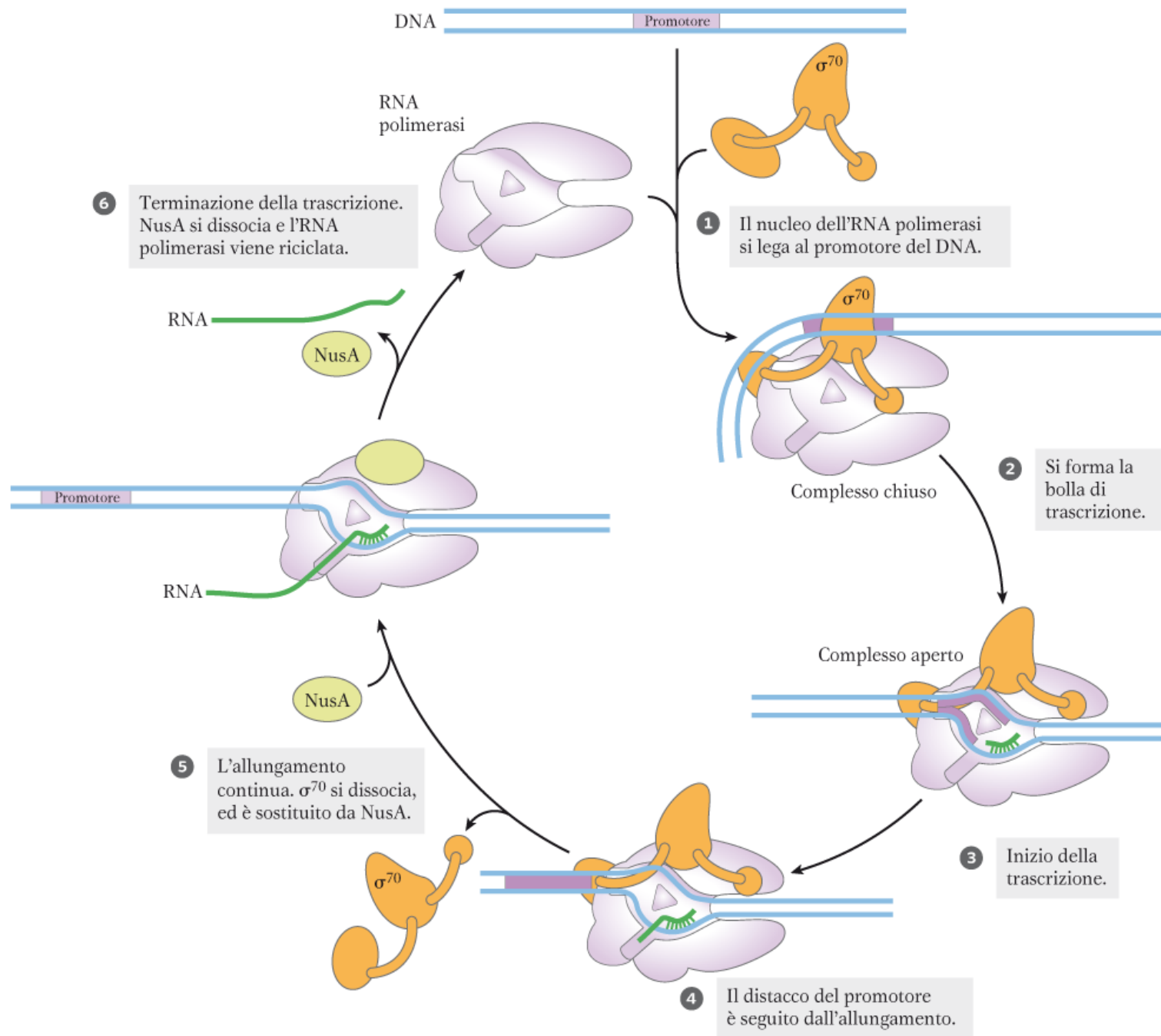
1. L'RNA polimerasi cerca i siti di inizio (promotori) cui si lega. La trascrizione è selettiva

2. L' RNA polimerasi svolge un piccolo tratto di DNA a doppia elica : **creazione dello stampo**

# Transcription initiation by prokaryotic RNA polymerase



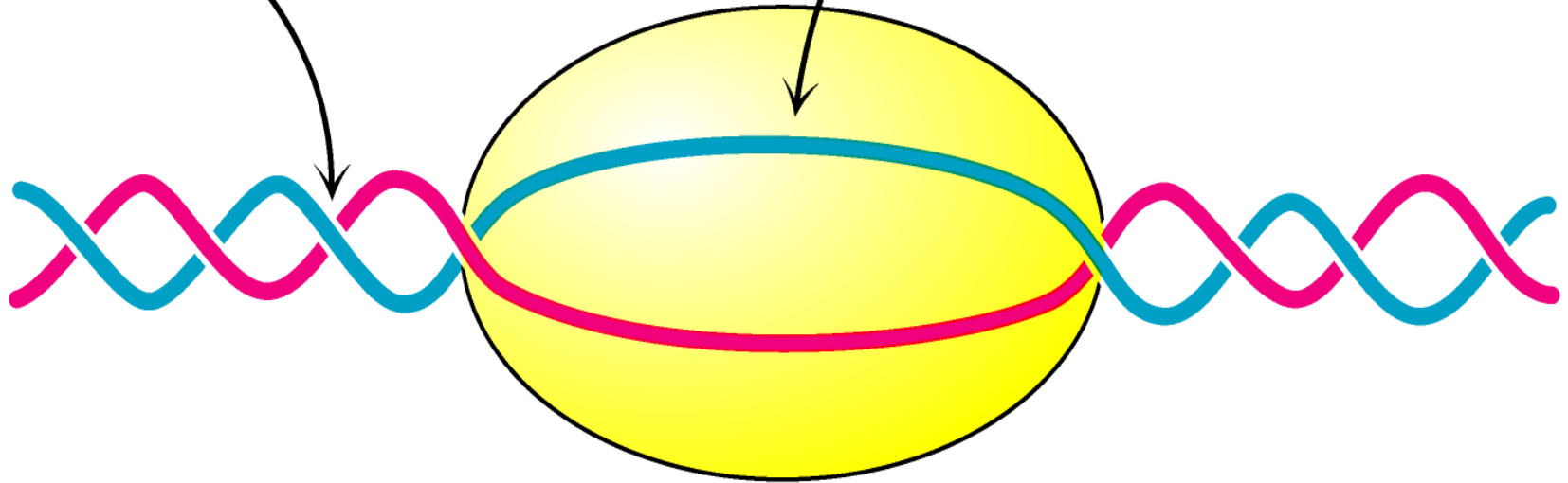
# INIZIO ED ALLUNGAMENTO DELLA TRASCRIZIONE IN E.coli



# INTERAZIONE RNA POLIMERASI-DNA

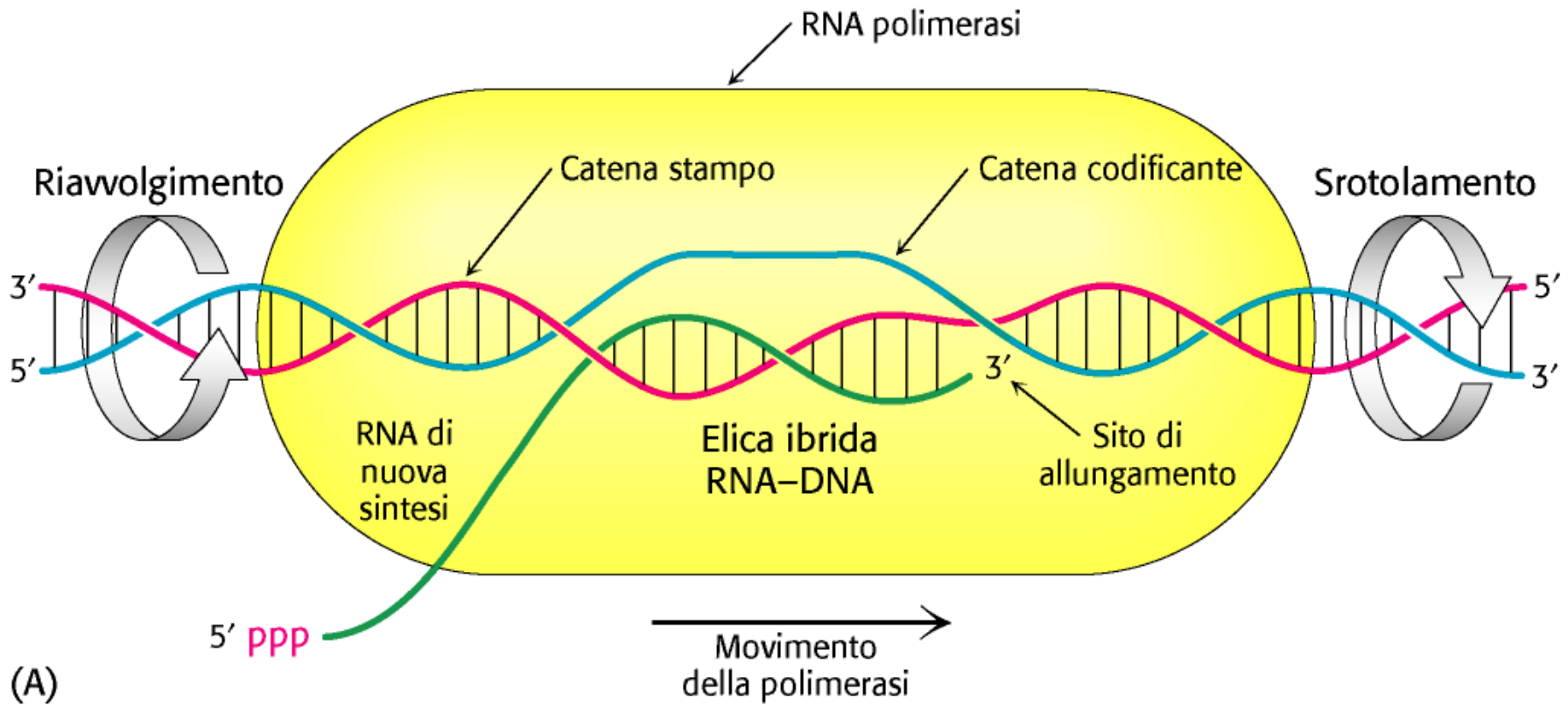
DNA a  
doppia elica

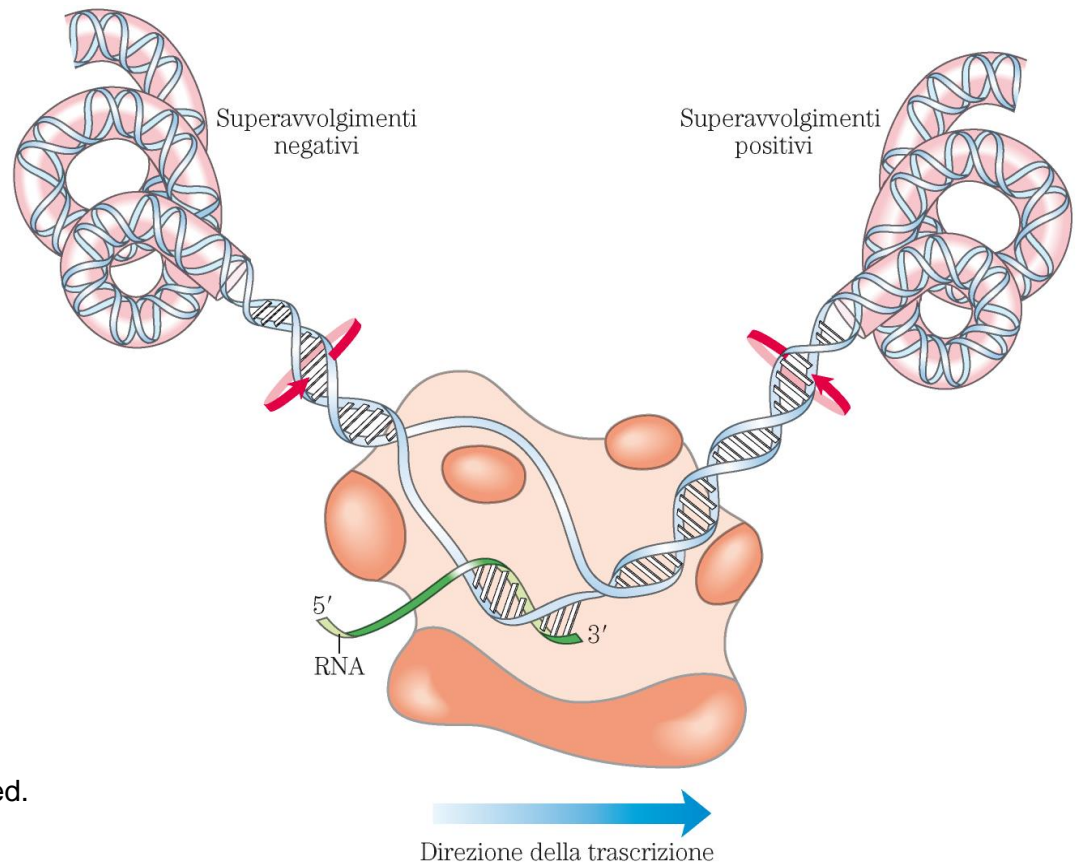
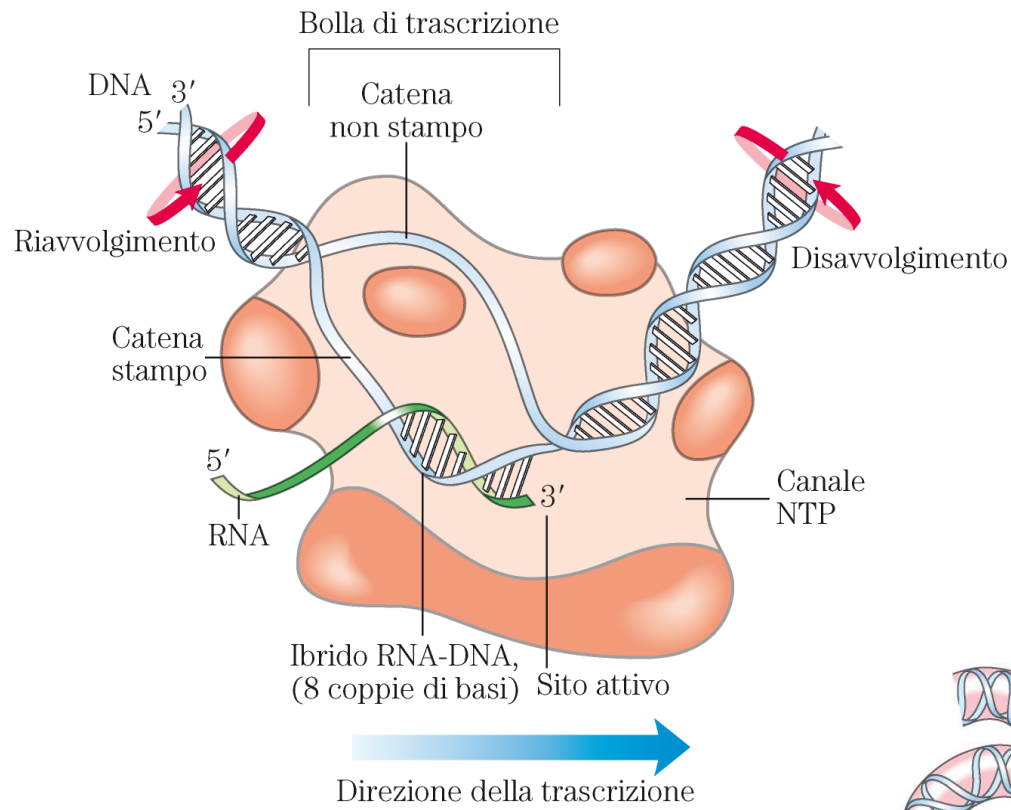
DNA srotolato  
(17 bp aperte)



RNA polimerasi

# Trascrizione





# La sintesi dell'RNA avviene in tre fasi

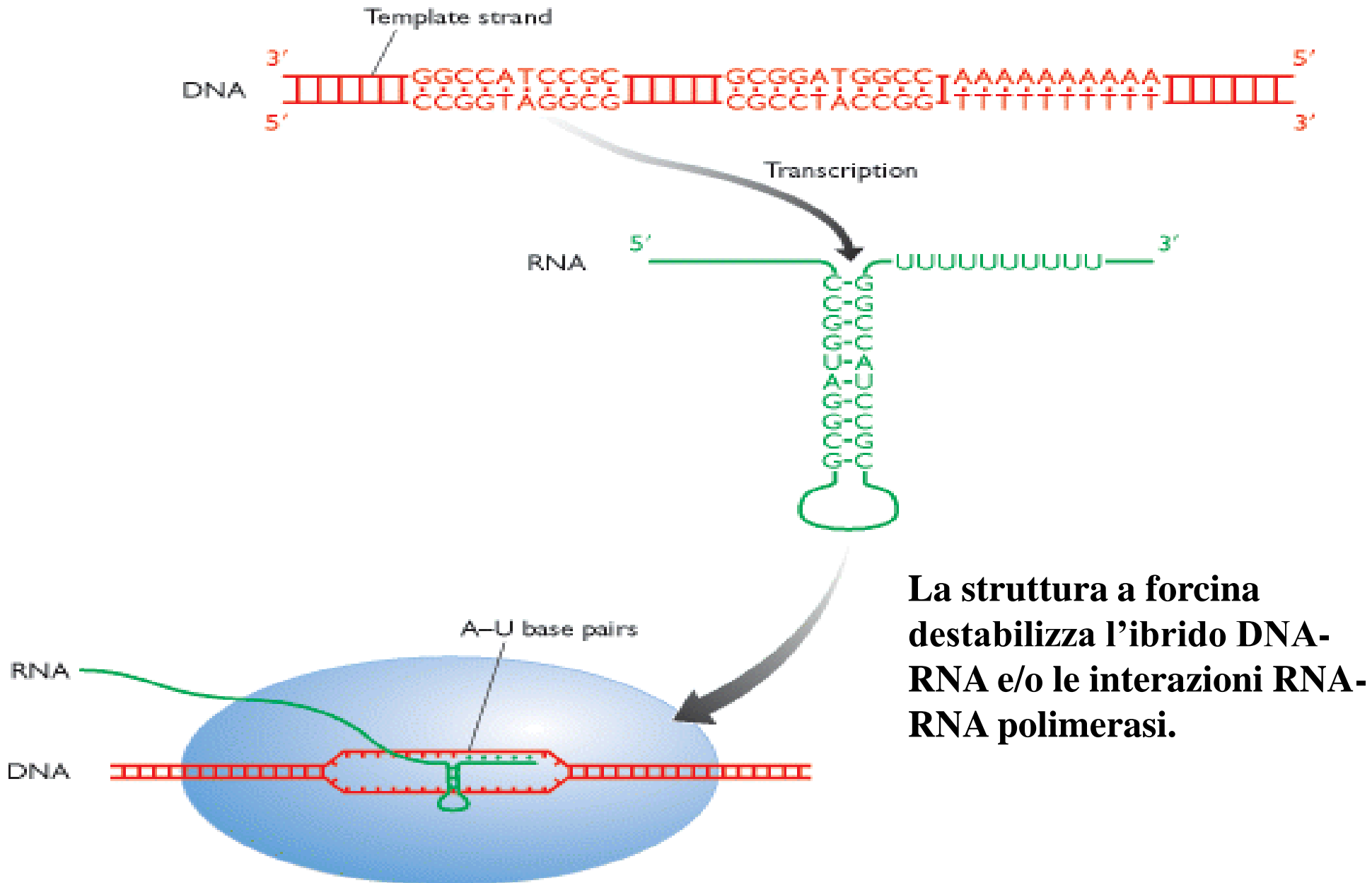
1. L'RNA polimerasi cerca i siti di inizio (promotori) cui si lega. La trascrizione è selettiva
2. L'RNA polimerasi svolge un piccolo tratto di DNA a doppia elica : creazione dello stampo
3. L'RNA polimerasi termina la trascrizione

# TERMINE DELLA TRASCRIZIONE

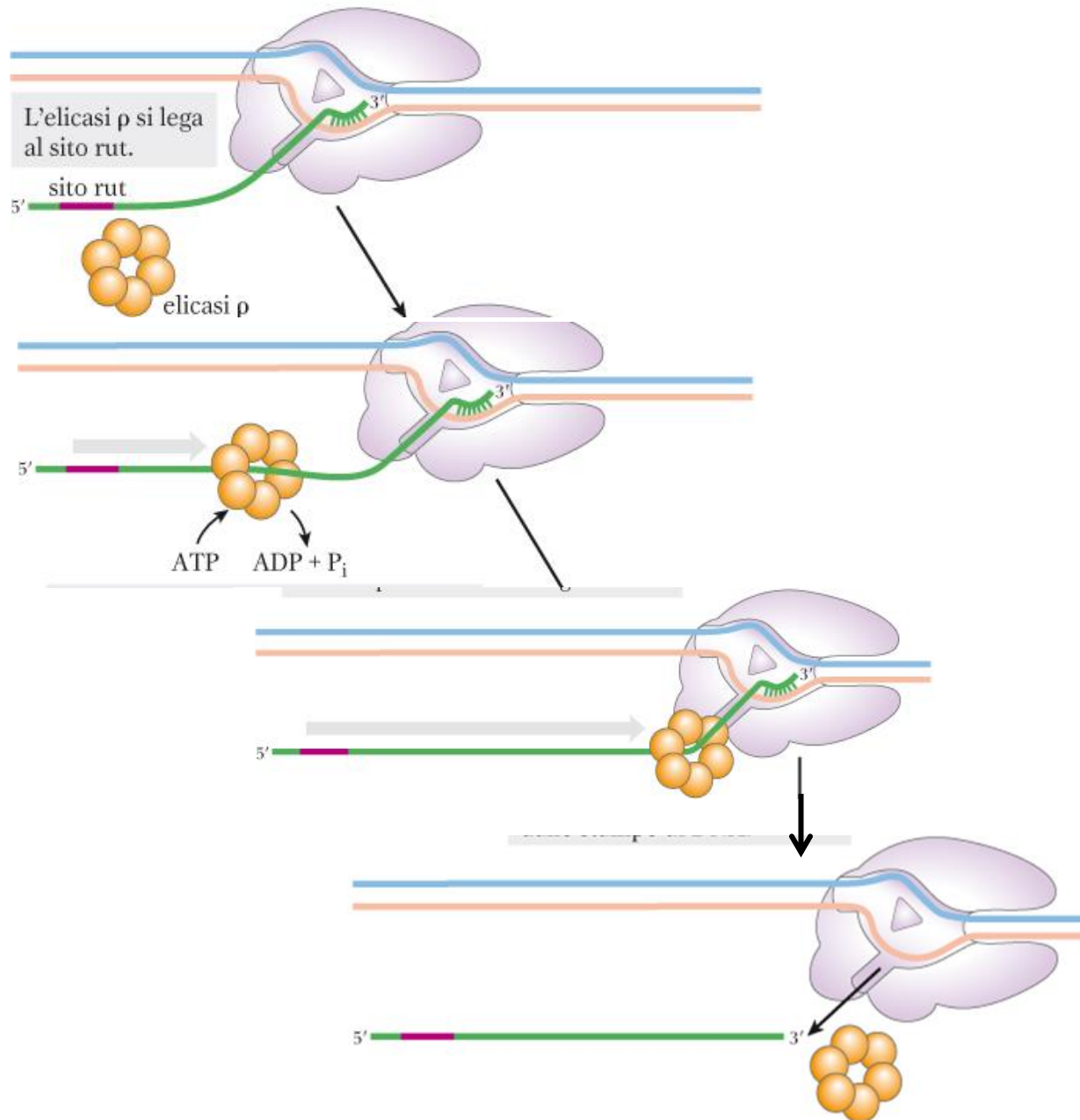
## 1) terminatore intrinseco, $\rho$ indipendente

- **Terminatore intrinseco:**
  - sul filamento stampo sequenza palindromica, seguita da una corta sequenza di A
- L'RNA trascritto forma una stabile struttura a forcina
- L'RNA contiene una coda poli-U

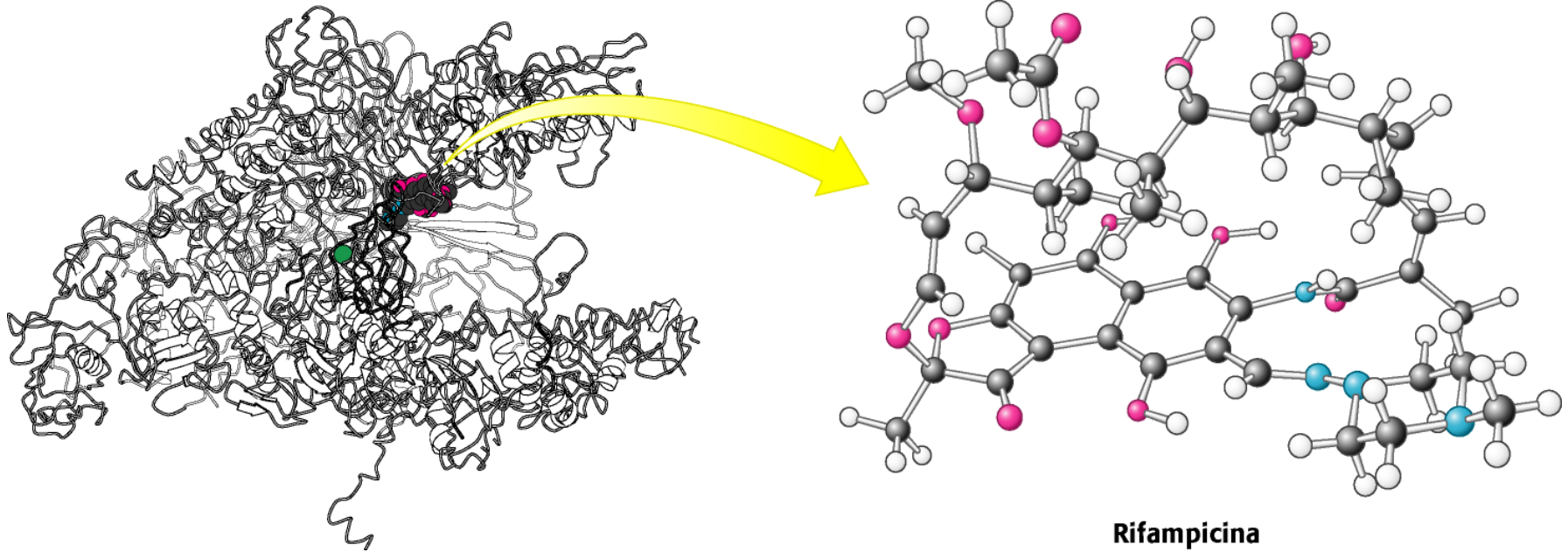
# Terminatore intrinseco



## 2) Terminazione $\rho$ dipendente



# Inibitori della trascrizione in Procarioti

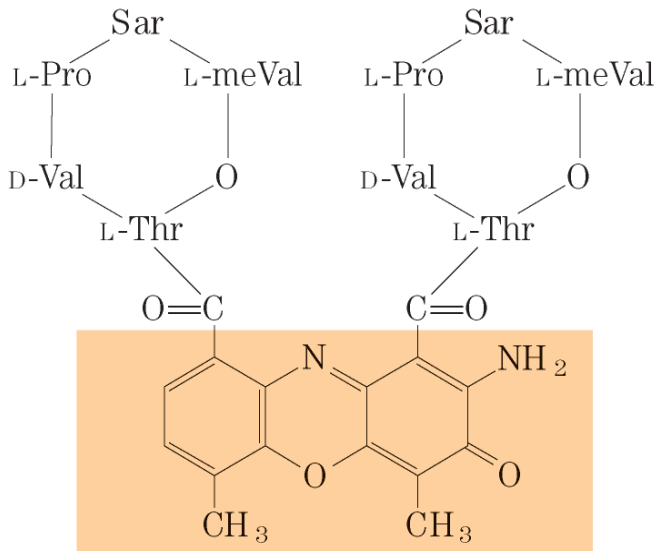


Berg J, Tymoczko JL, Stryer L. Biochimica- Zanichelli 6 ed

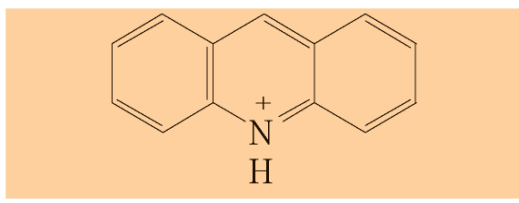
La **rifampicina** inibisce **l'inizio della trascrizione**: inibisce la formazione dei primi legami fosfodiesterici, **si lega alla subunità  $\beta$**  della RNA polimerasi batterica e blocca il canale attraverso il quale passa l'ibrido DNA-RNA.

-Trattamento della tubercolosi, lebbra e legionella

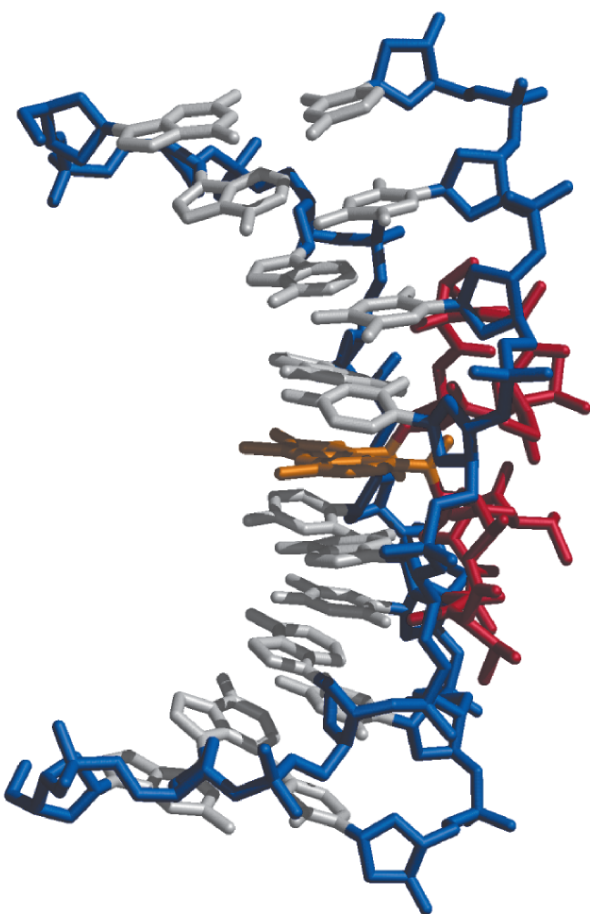
# Inibitori della trascrizione sia in Procarioti che Eucarioti



Actinomicina D



Acridina



(b)

**Sia l'actinomicina D che l'acridina sono intercalanti, che bloccano l'allungamento della catena da parte della RNA polimerasi**