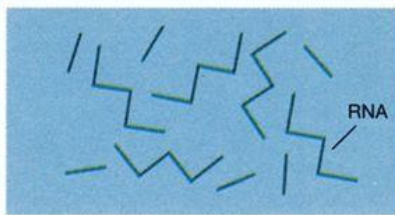
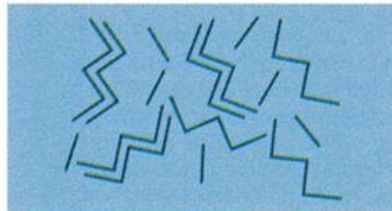


RNA

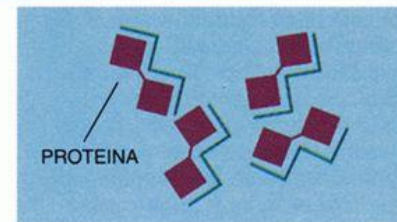
Il mondo a RNA



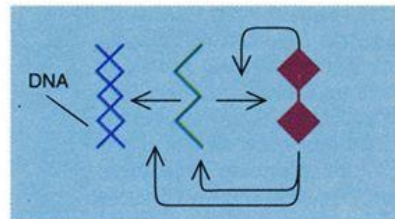
L'RNA si forma dal ribosio e da altri composti organici.



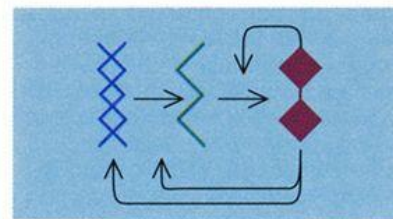
Evolvendo, le molecole di RNA «imparano» a replicarsi.



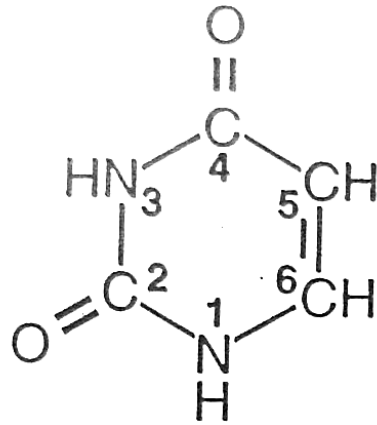
Le molecole di RNA iniziano a sintetizzare proteine che possono servire da catalizzatori.



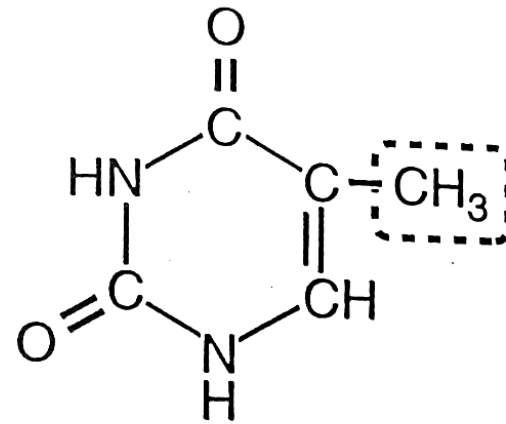
Le proteine, oltre ad aiutare l'RNA a replicarsi e a sintetizzare proteine con più efficienza, fanno sì che l'RNA costruisca versioni a doppio filamento di se stesso che poi evolveranno in DNA.



Il DNA si afferma: utilizza l'RNA per costruire proteine che, a loro volta, aiutano il DNA a produrre copie di se stesso e a trasferire l'informazione genetica all'RNA.

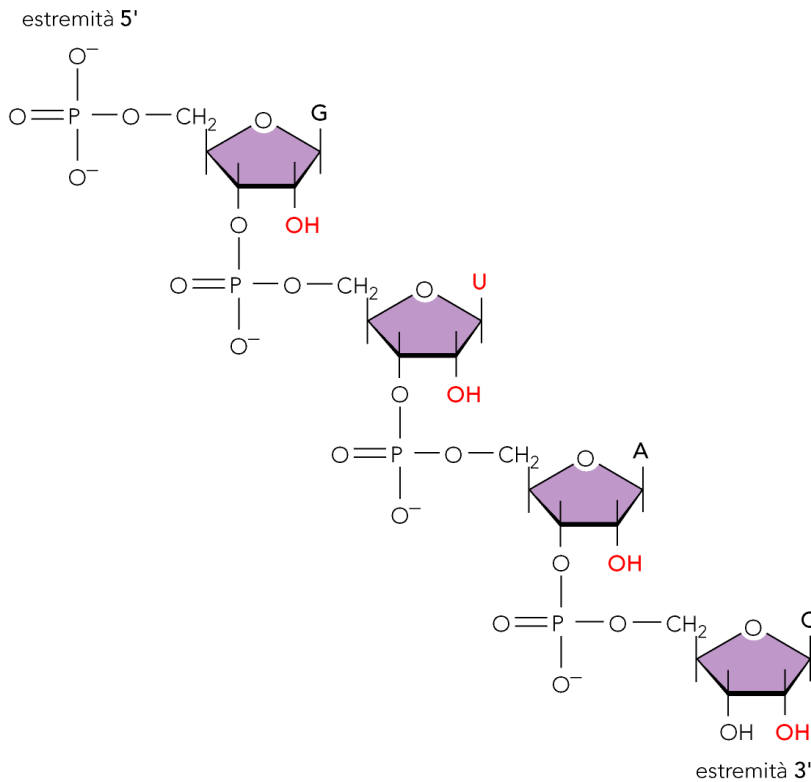


Uracil (U)
(in RNA)



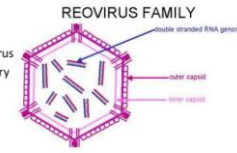
Thymine (T)
(in DNA)

Fig. 11.26. Comparison of the structures of uracil and thymine.



Virus Characteristics

- > Family: Reoviridae
- > Genus: Orthoreovirus
- > Icosahedral symmetry
- > Non enveloped
- > 10 ds RNA



Caratteristiche strutturali dell'RNA

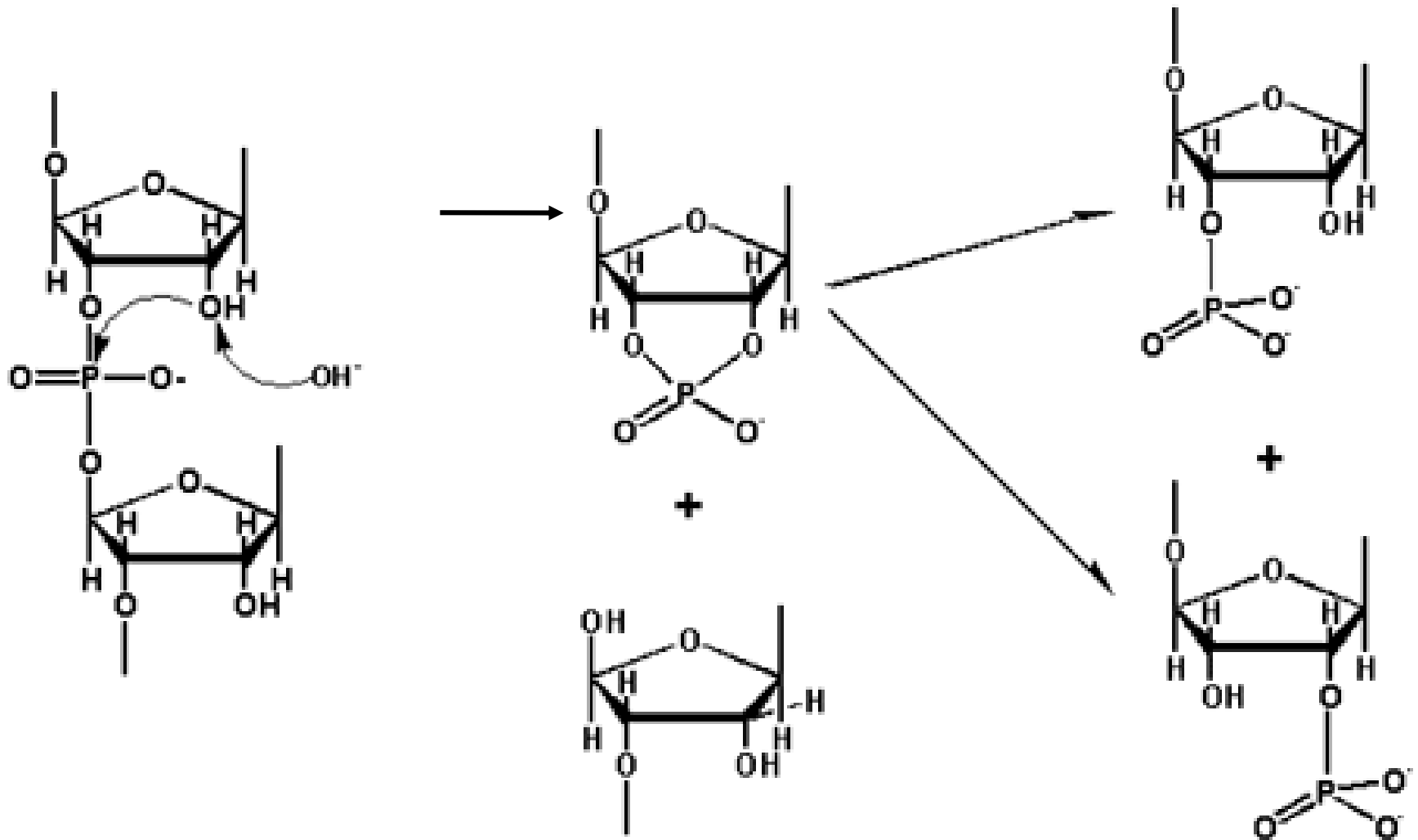
Le differenze con DNA sono date dal ribosio, dall'uracile e dal fatto che normalmente non è presente nelle cellule come doppia elica.

Solo in certi virus, dove è il materiale genetico, l'RNA può trovarsi in doppia elica.

Nelle cellule può comunque formare lunghe regioni a doppia elica autocomplementari.

Esistono diversi tipi di RNA, tutti a singolo filamento, aventi diverse funzioni:

mRNA: portatore del messaggio genetico (INTERMEDIARIO); **tRNA**: adattatore fra codoni su mRNA e amminoacidi (DI RACCORDO); **rRNA**: componente strutturale dei ribosomi (STRUTTURALE); **RNAi**: corte sequenze complementari a mRNA, funzioni regolative espressione genica (REGOLAZIONE); **ribozimi**: enzimi ad RNA, coinvolti in molteplici reazioni cellulari (es. telomerasi, rRNA 23S); altri RNA con funzioni speciali, coinvolti nella sintesi proteica (CATALISI).



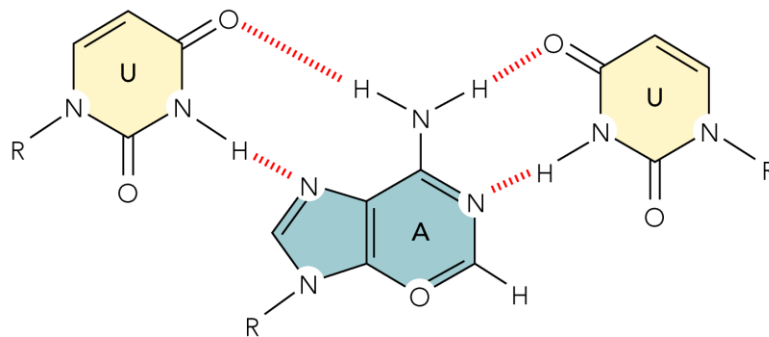
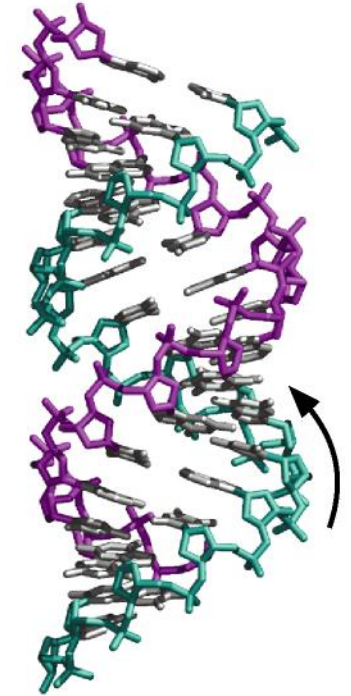
L'idrolisi alcalina dell'RNA è facilitata dalla presenza dell'ossidrile 2' del ribosio, che consente l'intermedio fosfodiesterico ciclico, impossibile nel caso del DNA.

strutture RNA

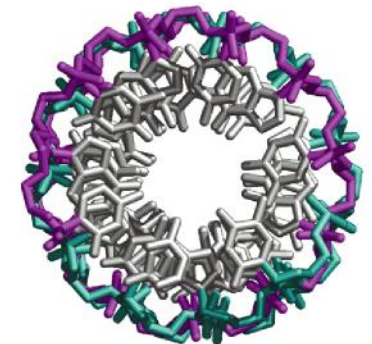
RNA a doppia elica può fare solo struttura A, per l'ingombro del 2'OH

Solco maggiore meno accessibile, quello minore più accessibile

Può formare complesse strutture secondarie



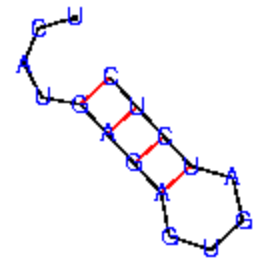
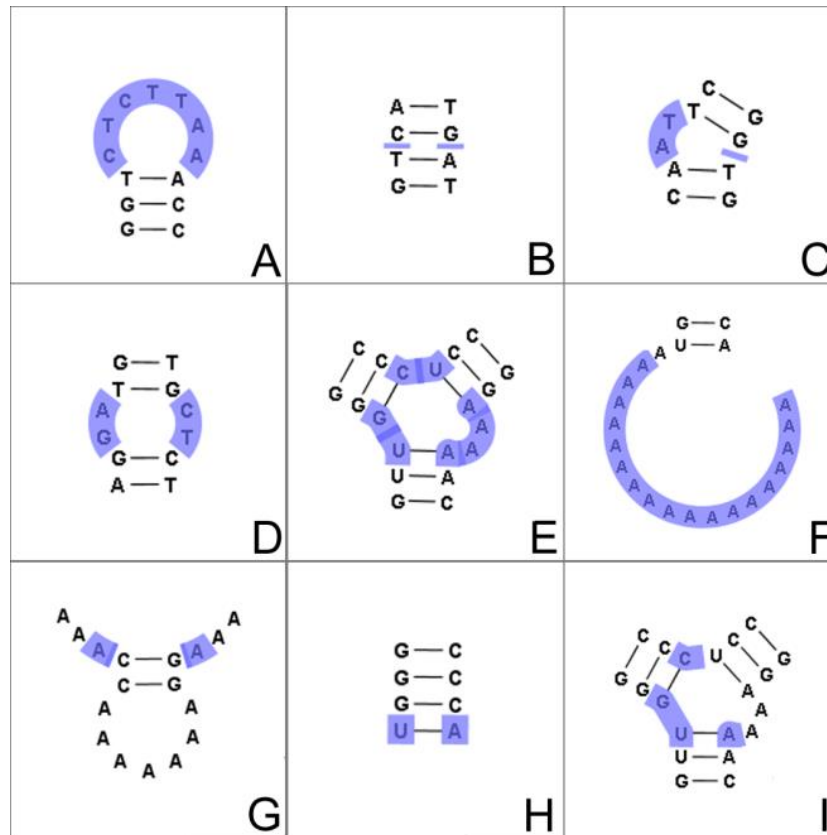
tripletta di basi U:A:U



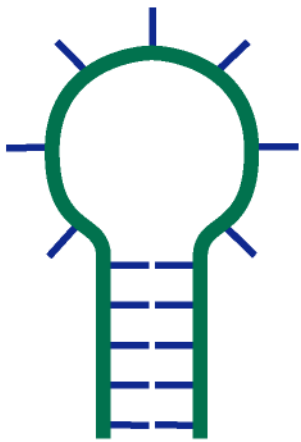
Quindi.....

Le doppie eliche di tipo A sono meno adatte ad interazioni sequenza-specifiche con le proteine, perché il solco maggiore è molto più stretto e profondo. Il solco minore è più accessibile ma meno informativo.

Strutture dell'RNA



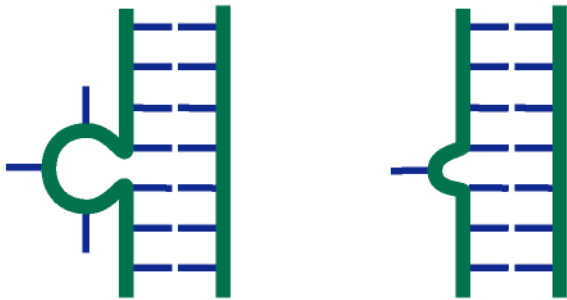
a



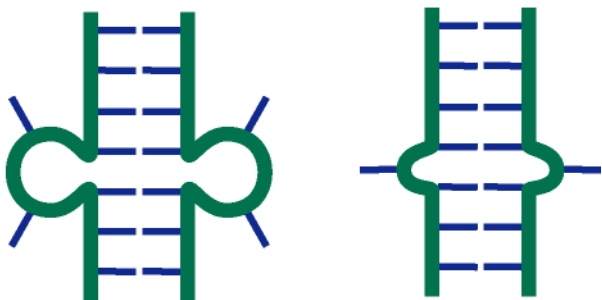
Diversi tipi di strutture di RNA a doppia elica

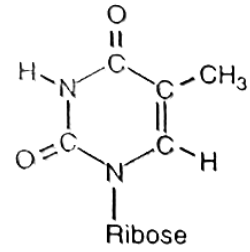
a) Forcina (hairpin); b) gemma (bulge); c) ansa (loop). Generalmente si formano fra segmenti complementari dello stesso filamento, talvolta anche fra due filamenti.

b

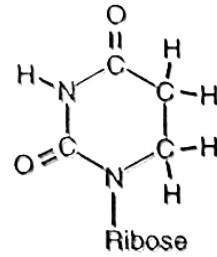


c

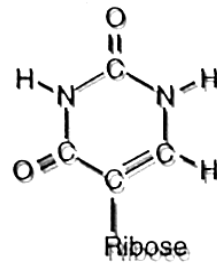




Ribothymidine (T)



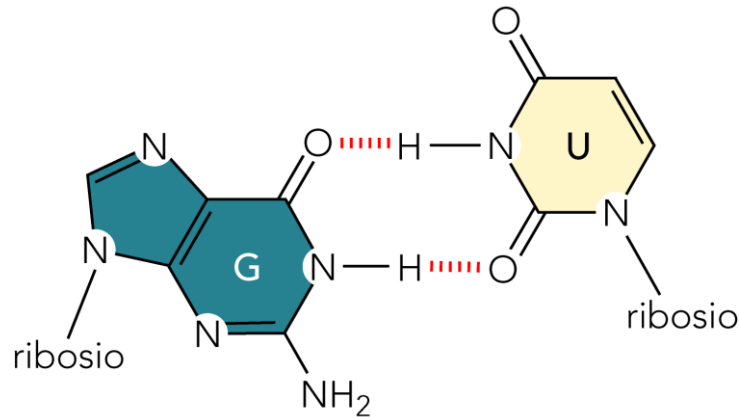
Dihydrouridine (D)



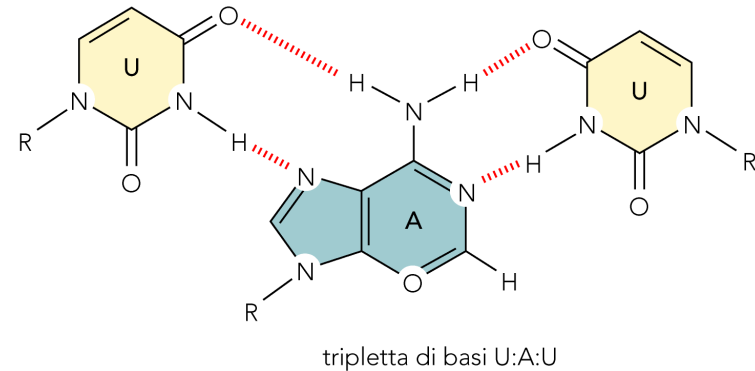
Pseudouridine (ψ)

Fig. 11.34. Three modified nucleosides found in most tRNAs.

L'RNA ha una maggior tendenza a formare accoppiamenti non canonici (diversi da quelli di W-C) rispetto al DNA



G e U possono accoppiarsi con una geometria diversa da quella prevista da W-C, favorendo la formazione di doppie eliche intramolecolari.

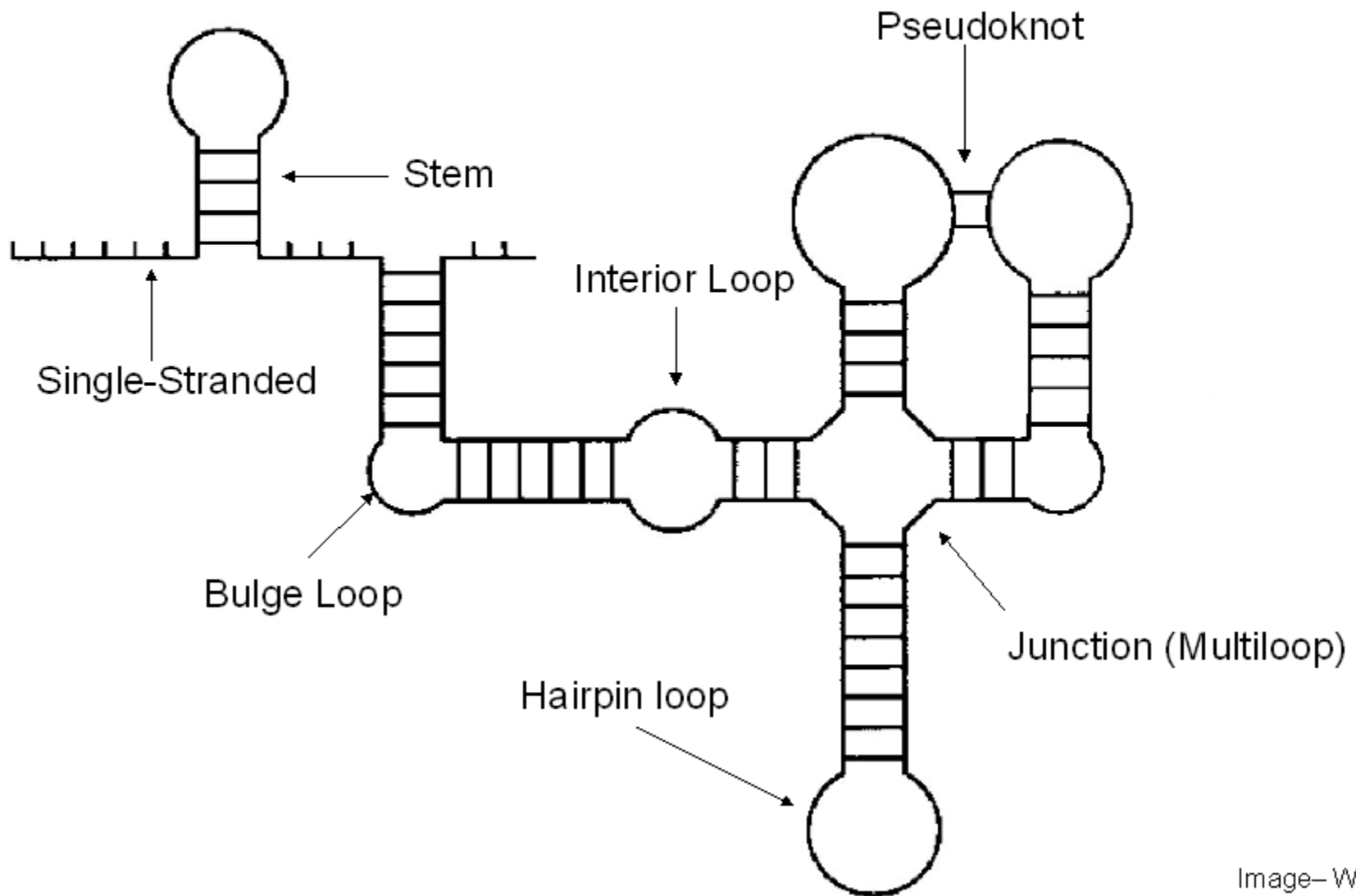


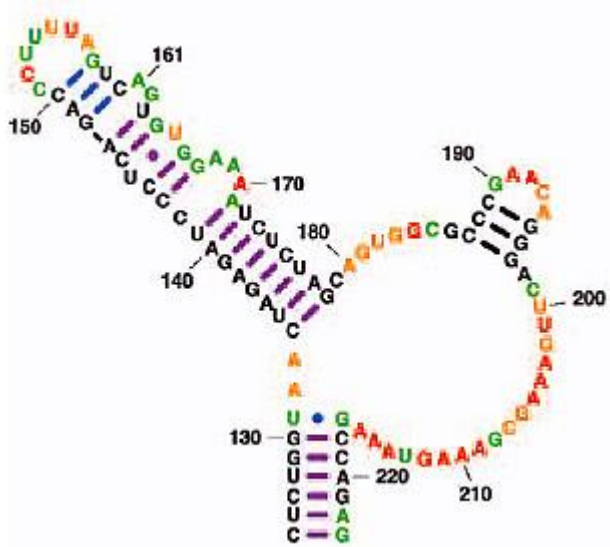
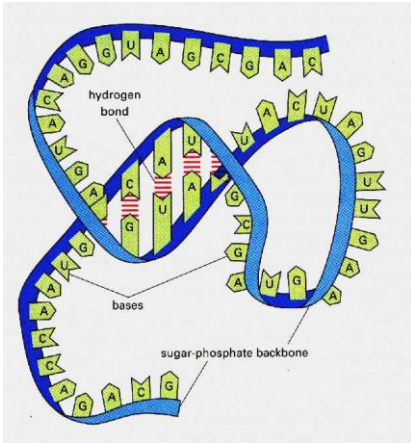
Formazione di strutture 3D complesse

L'RNA, essendo in grado di ripiegarsi su se stesso per rotazione attorno ai legami fosfodiesterici nei tratti non a doppia elica, forma strutture complesse, soprattutto in presenza di basi non convenzionali. Esempi: interazioni fra 3 basi, fra basi e impalcatura (tRNA), o con proteine che neutralizzano le cariche dei fosfati (ribosomi).

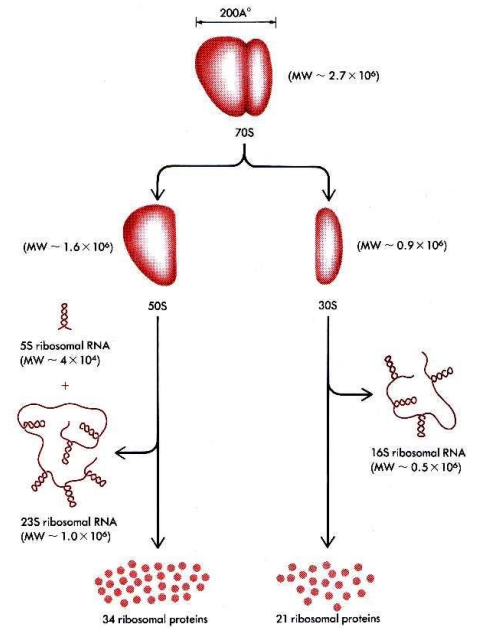
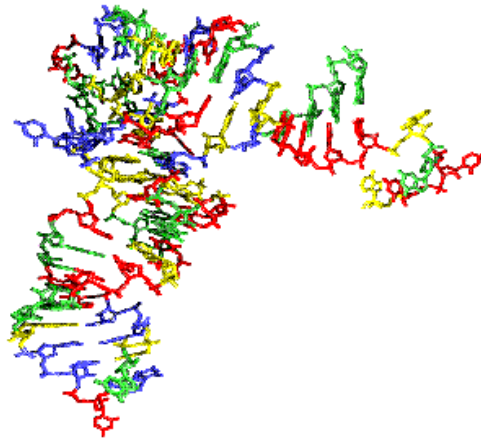
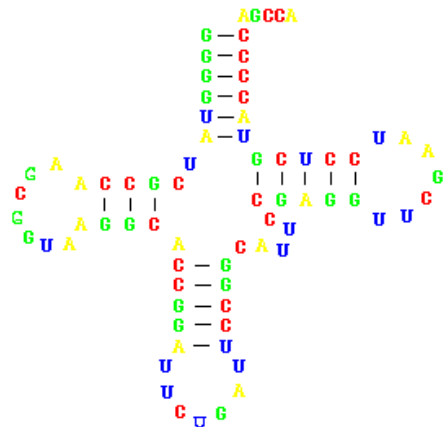
In laboratorio si possono sintetizzare molecole di RNA di una certa lunghezza con una certa sequenza o a sequenza casuale (ad es. con 4 basi si possono formare 4^{20} diversi 20mer!). Fra quest'ultime è possibile selezionare alcune sequenze che presentano particolari proprietà, ad es. affinità per certe piccole molecole (SELEX).

RNA Secondary Structure

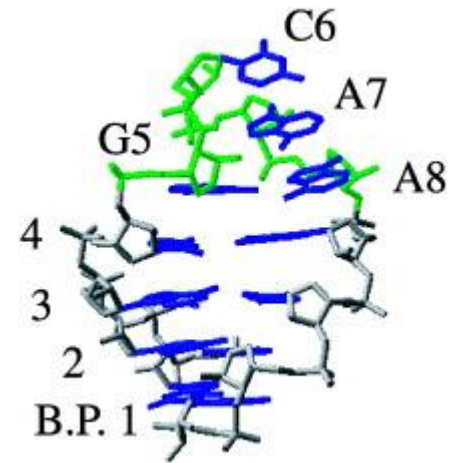
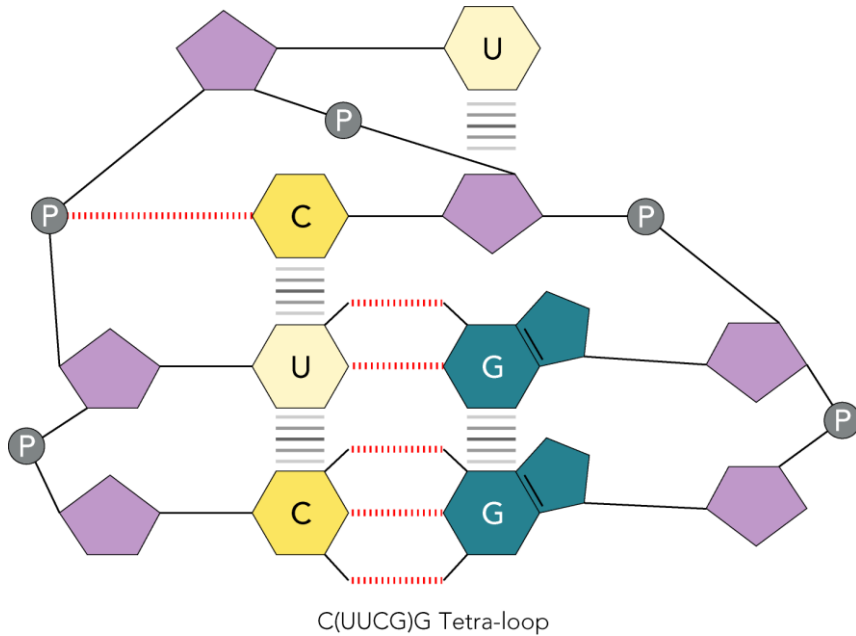




6666UATCGCCAAAGCGGUAAAGCCACCGGAUUCUGAUUCCGGCAUUCGAGGUCGAAUCCUCGUACCCCAAGCCA



Tetra-loop



A volte la stabilità delle strutture a doppia elica dell'RNA è molto > del previsto. Ciò dipende dalle proprietà speciali dei loop, come nel caso di 4 loop di sequenza UUCG, in grado di impilarsi fra loro in un certo modo.

Differenze tra le strutture secondarie e terziarie: alcuni esempi

Secondary structures

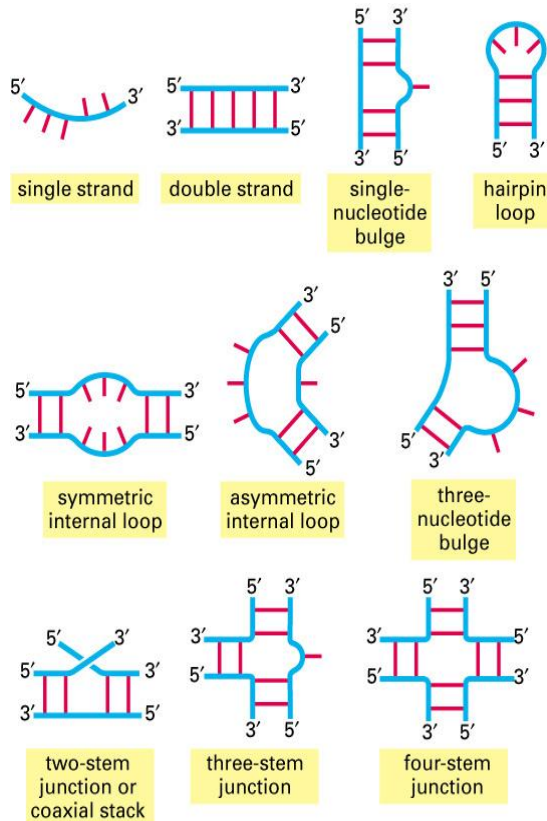


Figure 6-94. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Tertiary structures

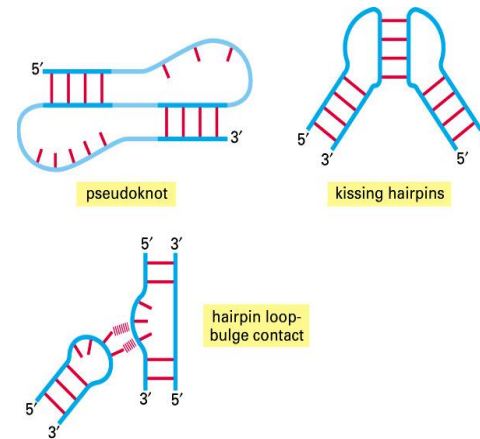


Figure 6-95. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

A. RNA structural motifs



Watson-Crick (WC)



kissing-loop



loop-receptor (LR)

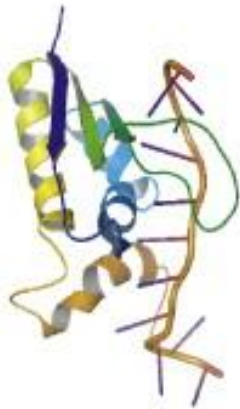


three-way junction



pseudoknot

B. RNP interacting motifs



ssRNA



dsRNA



stem-loop

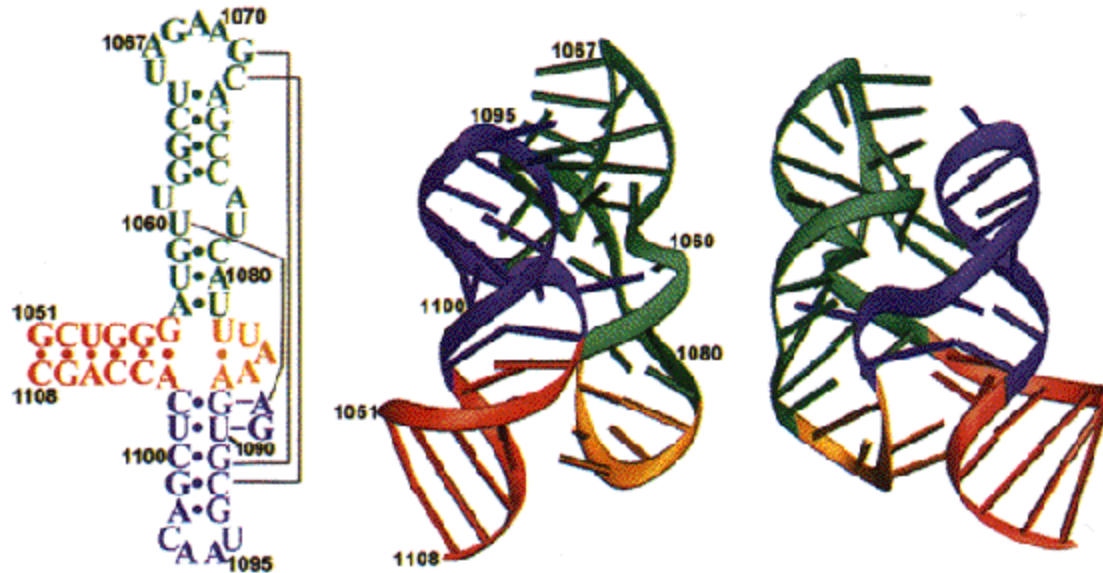


internal-loop



kink-turn

A 3D structure: Four-helix junction by base triples. L11 protein binding site in 23S RNA



Le triplete sono stabilizzate da cationi bivalenti

Alla fine degli anni 1960 alcuni studiosi proposero che alcune molecole di RNA potessero svolgere attività catalitica in virtù della loro complessità strutturale.

Solo nel 1970 fu isolata e caratterizzata la prima molecola di RNA con attività catalitica: faceva autocatalisi con saldatura dei frammenti prodotti.



Thomas Czech

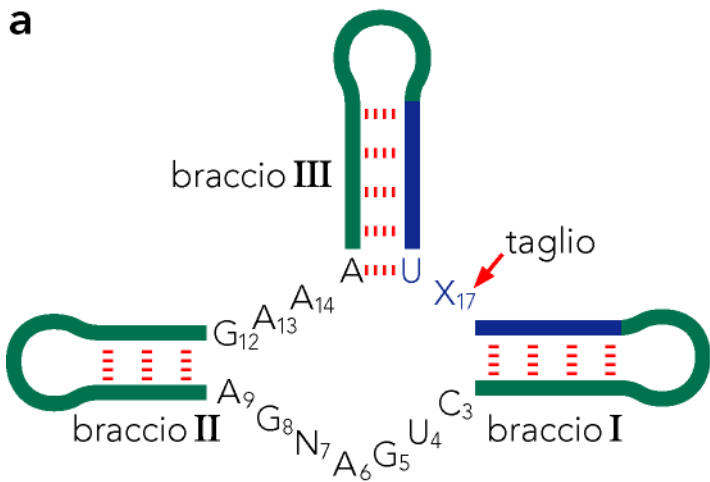


Sidney Altman

Ribozymes

RNA molecules that act as enzymes are called ribozymes.

This property of some RNAs was discovered by **Sidney Altman** and **Thomas Czech**, who were awarded the **Nobel Prize in Chemistry in 1989.**

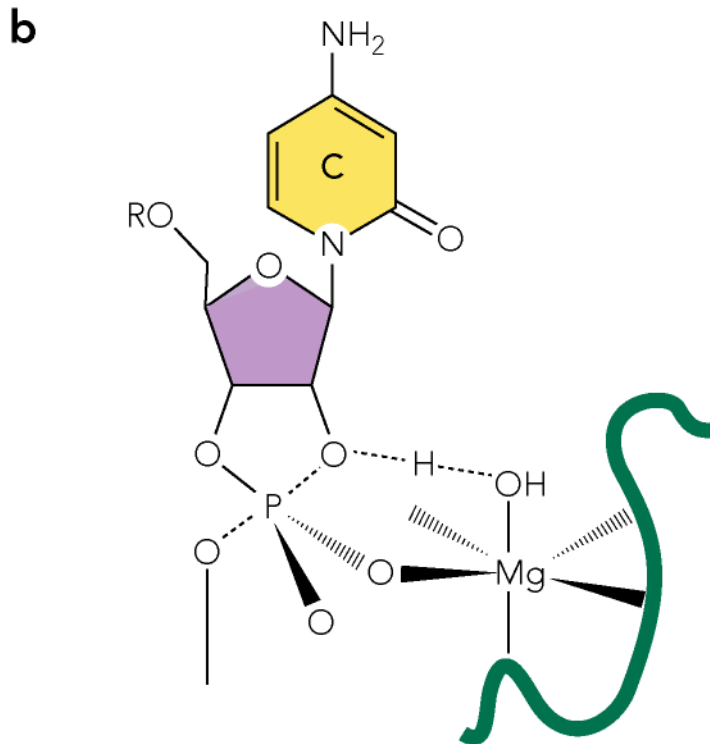


I ribozimi

Alcune molecole di RNA sono in grado di assumere particolari strutture 3D capaci di legare substrati e con attività catalitica, simile a quella degli enzimi proteici.

Uno dei primi ribozimi scoperti è la **RNasi P**, coinvolta nella formazione dei tRNA, un complesso di proteine, che legano i precursori, e un RNA, con attività catalitica. L'RNA è in grado di tagliare i substrati anche in assenza di proteine, se sono presenti **ioni positivi** che neutralizzano i fosfati negativi.

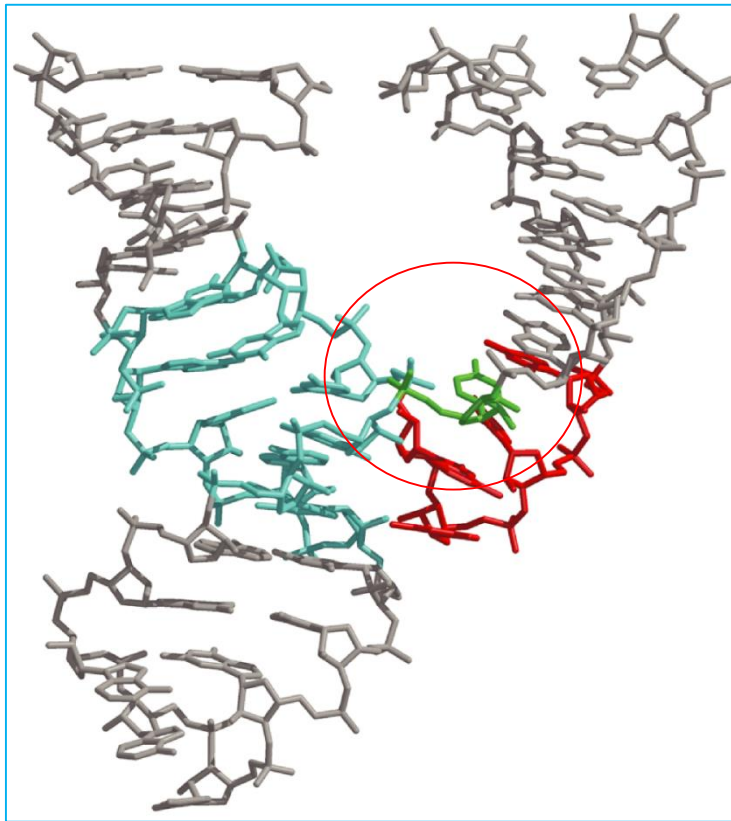
Altri ribozimi possono catalizzare **reazioni di trans-esterificazione**, necessarie per la rimozione degli introni dai precursori di mRNA, tRNA e rRNA (splicing).



Un ribozima particolare è quello **a testa di martello (hammerhead)**, con struttura II formata da 3 bracci e una zona non appaiata sede dell'attività catalitica (figura).

L'hammerhead ha attività di RNasi, è presente nei viroidi, agenti infettivi delle cellule vegetali, che si propagano per auto-idrolisi di un precursore più lungo, favorita da tratti di RNA vicini al punto di taglio: con l'aiuto di uno ione **Mg²⁺** il **2'-OH** viene **deprotonato**, quindi fa un **attacco nucleofilo sul fosfato 3'** con formazione di un fosfato ciclico 2'-3' e successiva rottura del legame fosfoesterico 3'-5'.

L'hammerhead non è un vero enzima perché effettua un solo taglio, ma può essere immaginato come composto da due parti, l'enzima vero e proprio e il substrato.

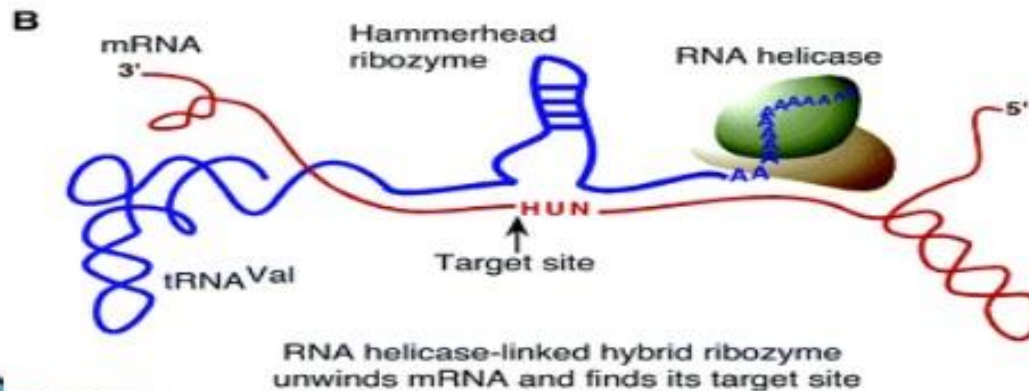
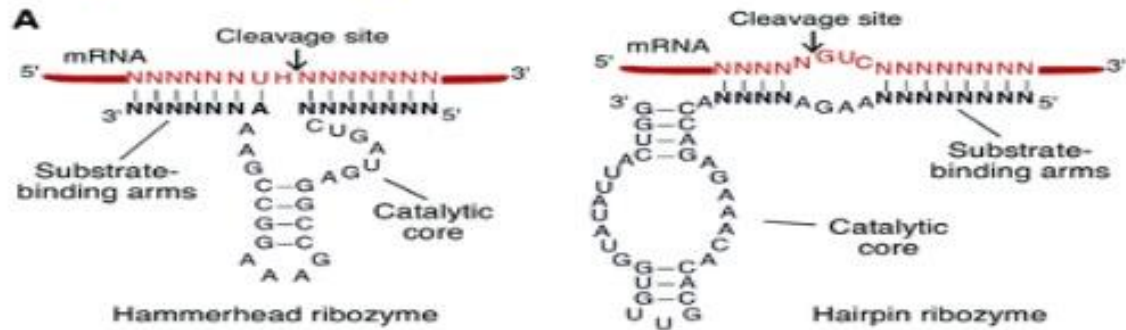


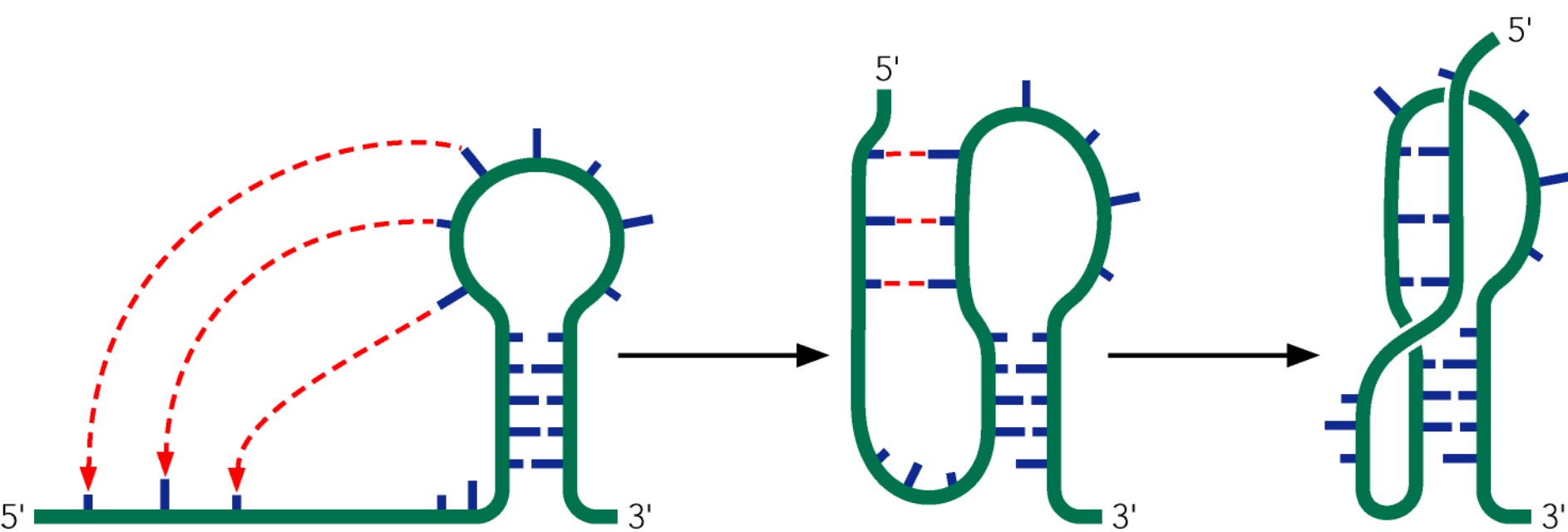
Struttura 3D del ribozima hammerhead

La forma assomiglia a quella di una forcella, **in verde il sito di taglio.**

La scoperta dei ribozimi ha rivoluzionato la visione dell'evoluzione biologica: la vita primordiale sarebbe stata basata sull'RNA, che funzionava sia da materiale genetico che enzimatico. A favore di questa ipotesi è il fatto che la peptidil transferasi, il componente ribosomiale responsabile della formazione dei legami peptidici nella sintesi proteica, è una molecola di RNA. I ribozimi sarebbero pertanto una reliquia di questo mondo di enzimi ad RNA.

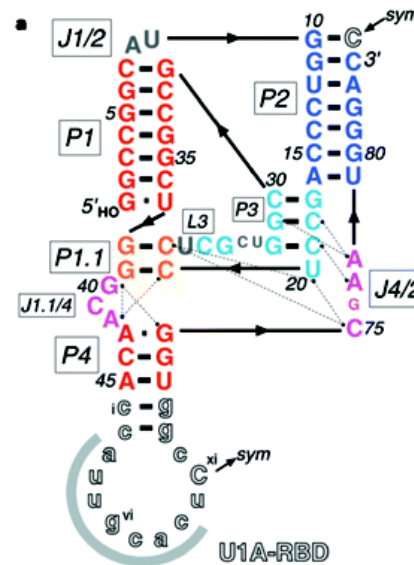
Design of ribozymes





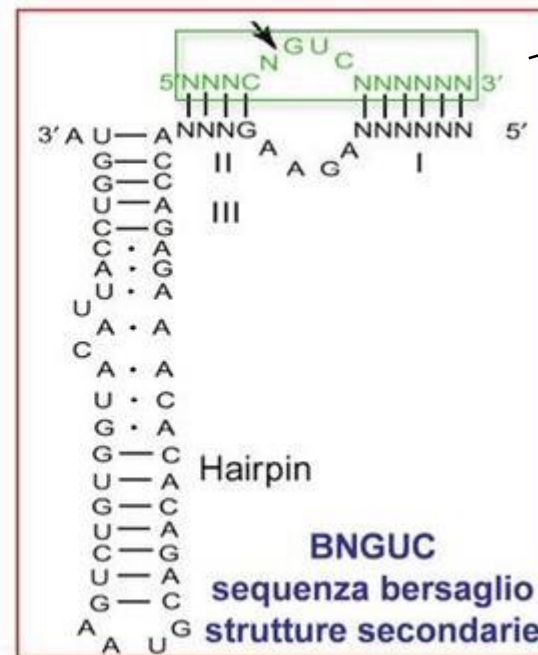
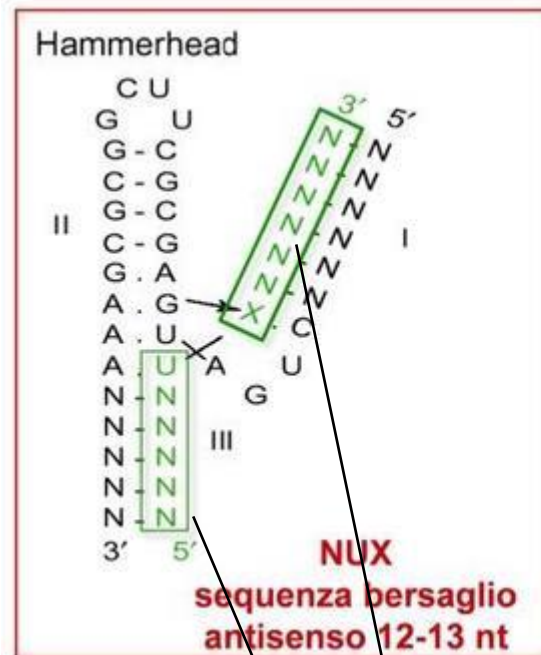
Pseudo-nodi

Si formano per appaiamento di basi fra sequenze complementari non contigue



HDV ribozyme forms a double pseudoknot

I Ribozimi possono essere progettati per degradare specifici mRNA



Appaiamento con mRNA bersaglio

Appaiamento con mRNA bersaglio

Ribozymes in clinical trials

- **ANGIOZYME** - VEGF-receptor1
- **HERZYME** - HER-2
- **HEPTAZYM**

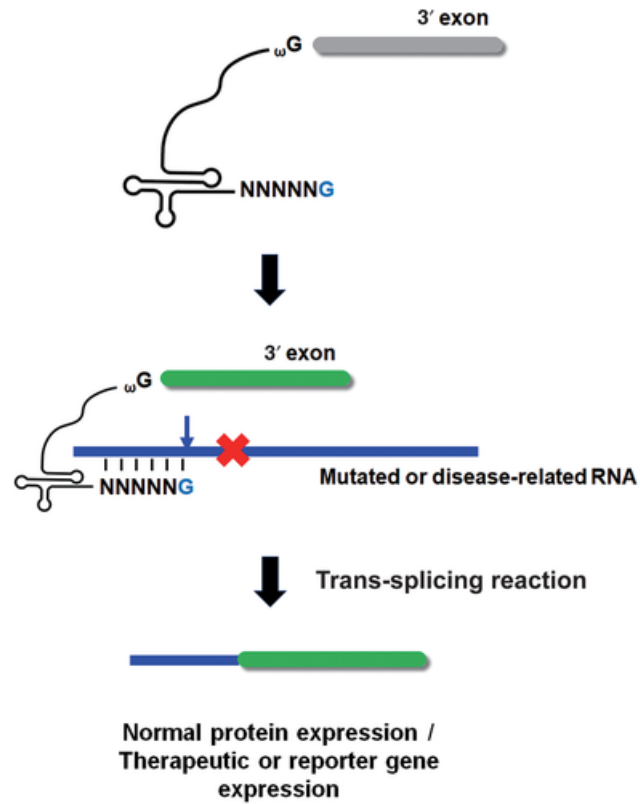
2017

...nessun applicazione biomedica...

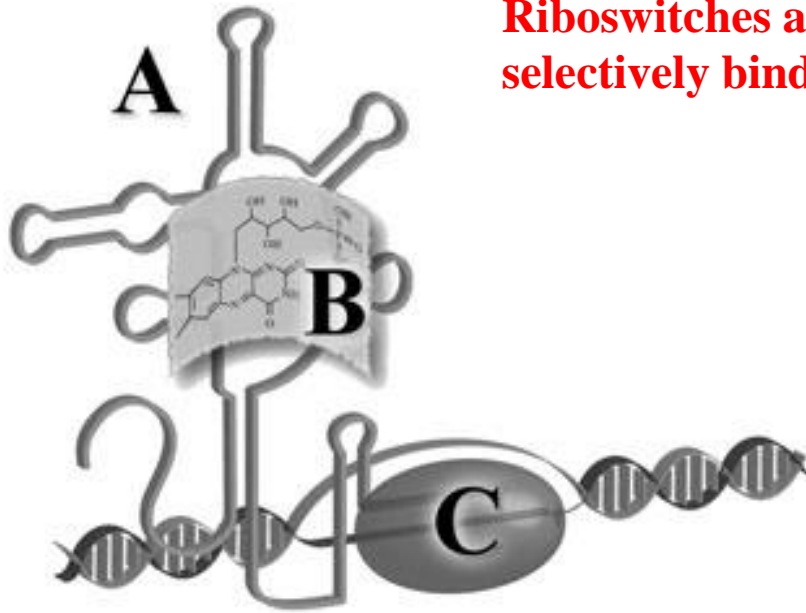
Therapeutic applications of ribozymes

- Only two clinical trials are in progress to evaluate the potential of chemically modified hammerhead ribozymes to fight cancer.
- The first, **ANGIOZYME** (Sirna Therapeutics, Inc.), a hammerhead ribozyme that targets mRNA that encodes **VEGF**, is being examined in a phase II trial for treatment of metastatic **colorectal cancer**.
- The other ribozyme in cancer clinical trials, **HERZYME**, is of a class of modified ribozymes (so called Zinzymes) that has high catalytic activity under physiological Mg^{2+} conditions and targets the mRNA that encodes **human epidermal growth factor-2**, and is in phase I clinical trials to determine toxicity and efficacy in **breast and ovarian** cancer patients.

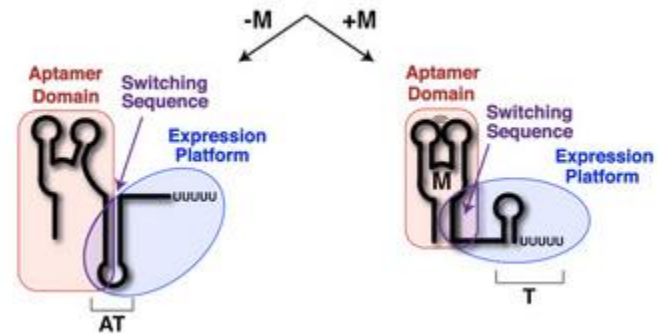
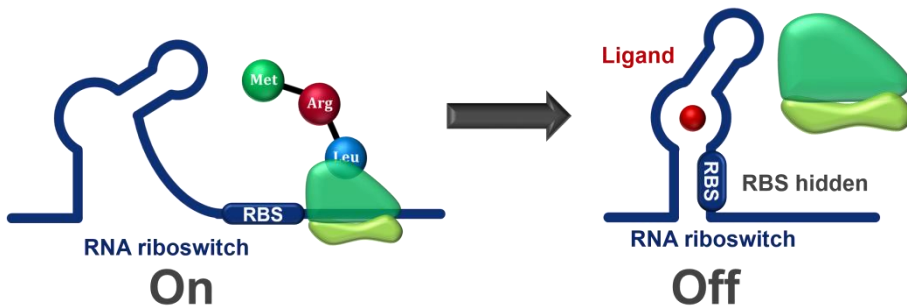
Therapeutic applications of group I intron-based trans-splicing ribozymes



Riboswitches are structured noncoding RNA domains that selectively bind metabolites and control gene expression



Natural Riboswitch Targets include:
Coenzyme B12
Thiamine pyrophosphate
FMN
S-adenosylmethionine
Guanine
Adenine
Lysine



A riboswitch (A) binds to its target molecule (B) and inhibits nearby transcription machinery (C).

All examples of the known riboswitches reside in noncoding regions of messenger RNAs where they control transcription or translation

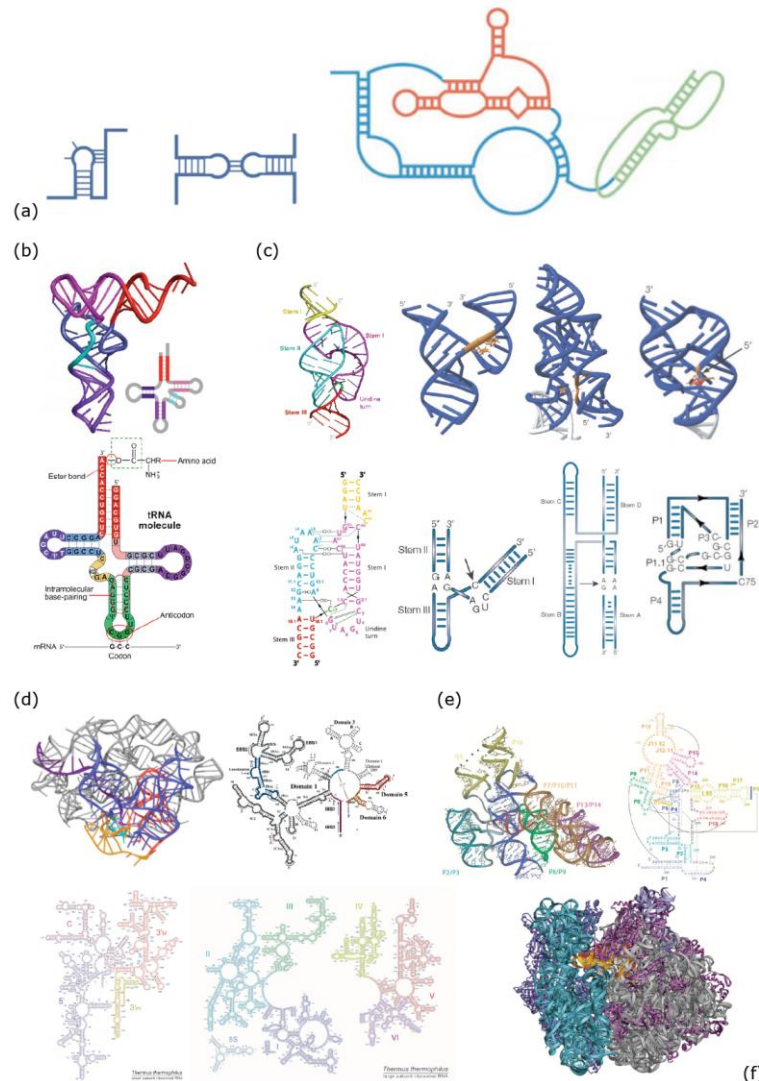


Fig 4.3 (a) Due tipici elementi di struttura terziaria (nell'ordine, *pseudoknot* e *kissing loops*) e un esempio di topologia complessa (b) tRNA (c) ribozimi con funzione di rottura del legame fosfodiesterico: hammerhead (primi due), hairpin, e il ribozima dell'epatite D (HDV)¹¹ (d) introne con funzione auto-catalitica di *self-splicing* (e) Ribonucleasi P (f) RNA ribosomiale: diagramma delle strutture delle sottunità e struttura del ribosoma.

	DNA	RNA
Meccanismi di stabilità-degradazione	Scarsa propensione all'idrolisi della catena	Alta propensione all'idrolisi della catena
Denaturazione	Propensione a subire danni dai raggi UV Temperatura di denaturazione tra 30 e 110 gradi, dipendentemente da lunghezza e composizione	Suscettibilità di mutazione di C in U con formazioni di wobble pairs A parità di lunghezza e composizione, temperatura di denaturazione mediamente più alta di circa 10 gradi
Nucleotidi	Fosfato + desossiribosio + base azotata	Fosfato + ribosio + base azotata
Basi	Adenina Guanina Timina Citosina	Adenina Guanina Uracile Citosina (raramente: Inosina, ribotimina, pseudouridina...)
Struttura primaria	Catene molto lunghe, mediamente intorno ai 100 milioni di bp (~3 cm)	Catene relativamente corte, mediamente 20 -100 nucleotidi
Tipo di accoppiamenti tra basi	Principalmente accoppiamenti WC	Accoppiamenti WC, wobble pairs, accoppiamenti di Hoogsten
Conformazione del backbone	Zucchero in conformazione C2-endo (in BDNA) oppure in C3-endo (in ADNA)	Zucchero in conformazione esclusivamente C3-endo
Eliche	Conformazione principale: B-DNA A bassa idratazione: A-DNA Raramente, Z-DNA	solo A-RNA
Lunghezza di persistenza	~50nm	~60nm
Altri tipi di struttura secondaria	Piccoli tratti di triple o quadruple eliche Giunzioni di Hoilyday	Tratti di elica disaccoppiata, hairpins, bulges, internal loops, giunzioni
Struttura terziaria	Superavvolgimenti	Accoppiamenti estesi tra strutture secondarie tramite base pairing, knot e pseudoknot, eliche triple, accoppiamenti paralleli tra eliche.
Struttura quaternaria	Nucleosomi, elementi di organizzazione strutturale del genoma	Ribosomi, elementi del macchinario cellulare
Tipi principali-organizzazione	DNA codificante e non costituente il genoma, organizzato in cromosomi o plasmidi	mRNA, tRNA, ribozimi e altri tipi di RNA funzionale. RNA ribosomiale (rRNA). RNA codificante in virus
Funzioni	Conservazione e trasmissione dell'informazione genetica Ruoli strutturali (centromeri, telomeri)	Conservazione e trasmissione dell'informazione in alcuni virus. Trasporto dell'informazione all'interno della cellula (mRNA, tRNA). Ruoli funzionali nella duplicazione, trascrizione, traduzione del DNA o di RNA codificante, ruoli enzimatici (ribozimi) o altri ruoli funzionali

Tab 5.1 Caratteristiche e differenze principali tra DNA e RNA