

Curs d'actualització de conceptes de Microbiologia en base al nou currículum de Batxillerat

Bloc 3: Expressió gènica en bacteris: maquinària i regulació

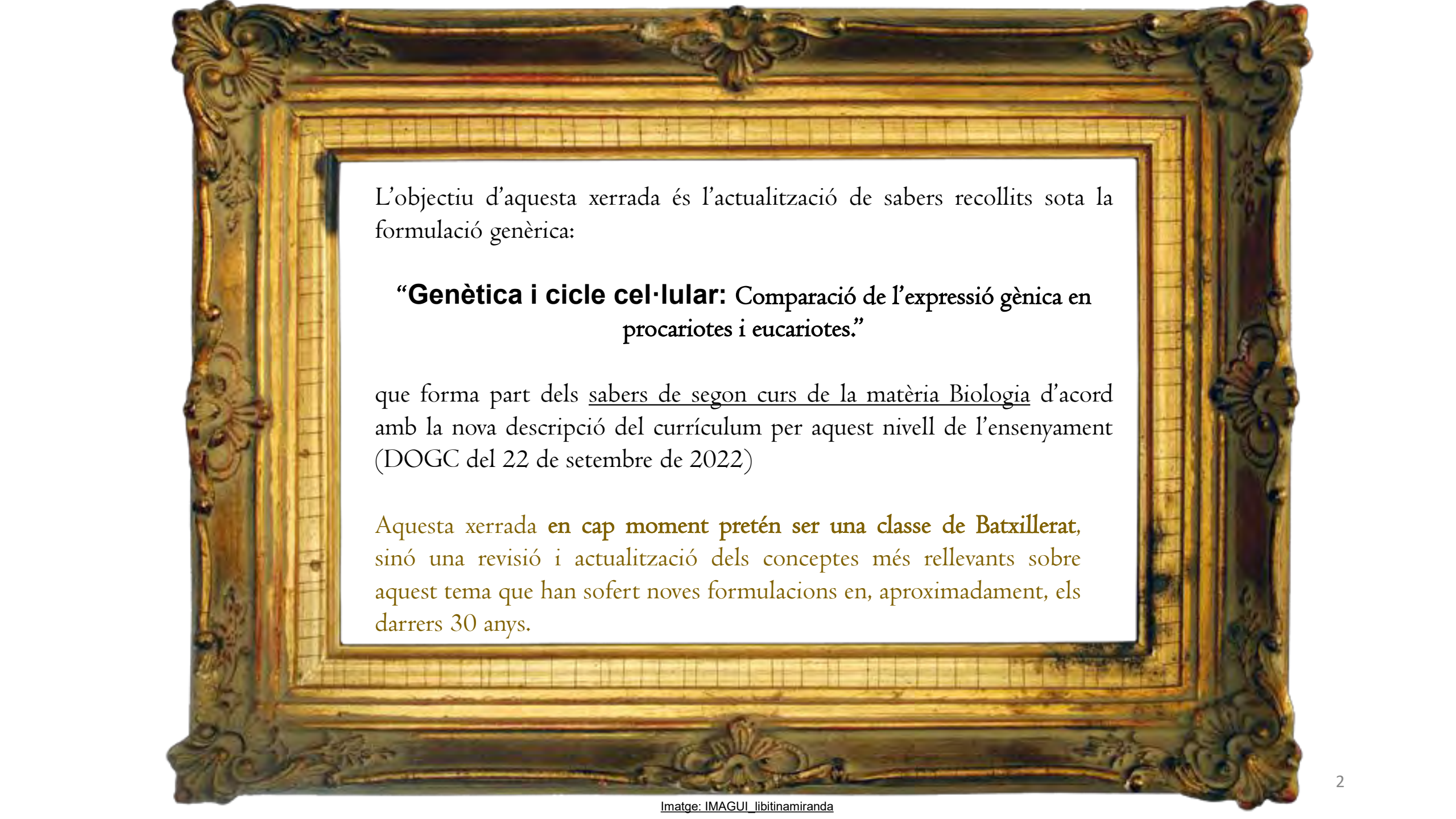
Susana Campoy

Grup de Microbiologia Molecular

Dept. de Genètica i de Microbiologia



Susana.Campoy@uab.cat



L'objectiu d'aquesta xerrada és l'actualització de sabers recollits sota la formulació genèrica:

“Genètica i cicle cel·lular: Comparació de l'expressió gènica en procariotes i eucariotes.”

que forma part dels sabers de segon curs de la matèria Biologia d'acord amb la nova descripció del currículum per aquest nivell de l'ensenyament (DOGC del 22 de setembre de 2022)

Aquesta xerrada **en cap moment pretén ser una classe de Batxillerat**, sinó una revisió i actualització dels conceptes més rellevants sobre aquest tema que han sofert noves formulacions en, aproximadament, els darrers 30 anys.

DE QUÈ PARLAREM??



Estructura de les unitats transcripcionals en bacteris:
promotor i regions codificants monocistròniques o
policistròniques.



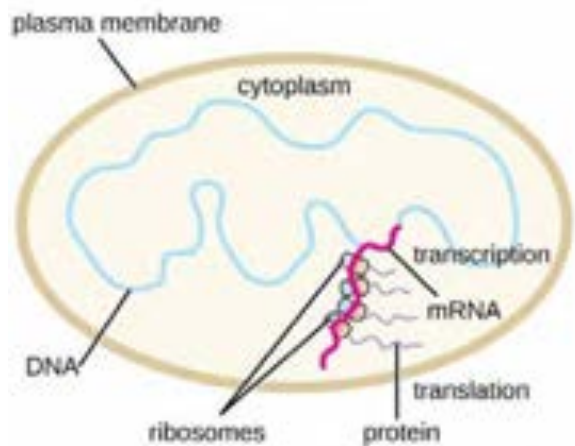
Inici i fi de la transcripció



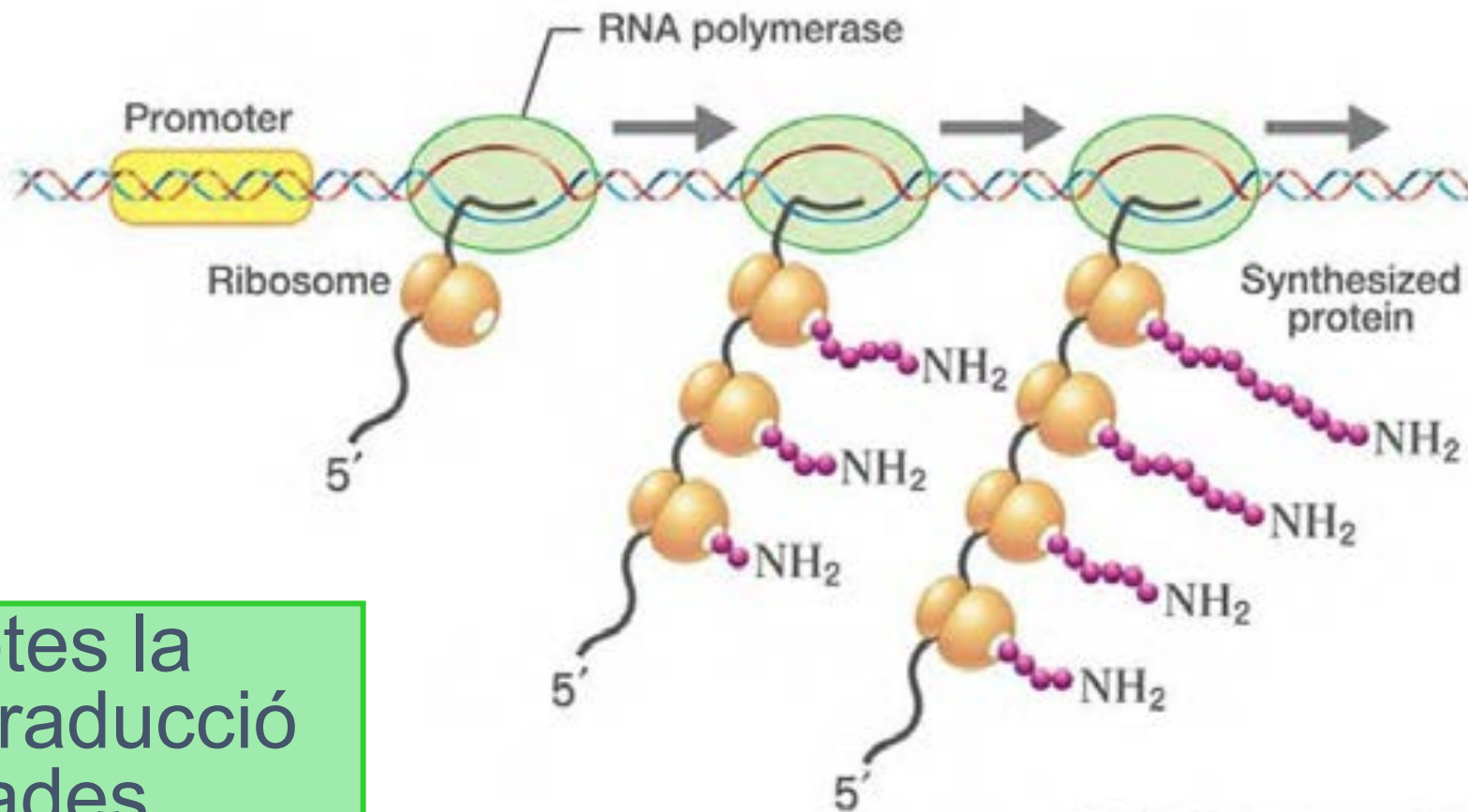
Control de l'expressió gènica



TRANSCRIPCIÓ



<https://www.coursehero.com/study-guides/microbiology/protein-synthesis-translation/>

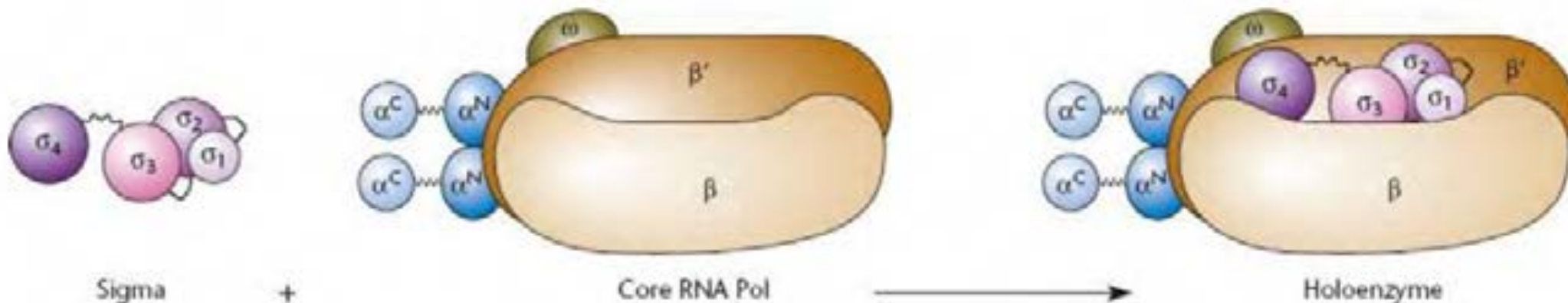


© CSLS/The University of Tokyo

En els procariotes la transcripció i la traducció estan acoblades



RNA POLIMERASA EN BACTERIS



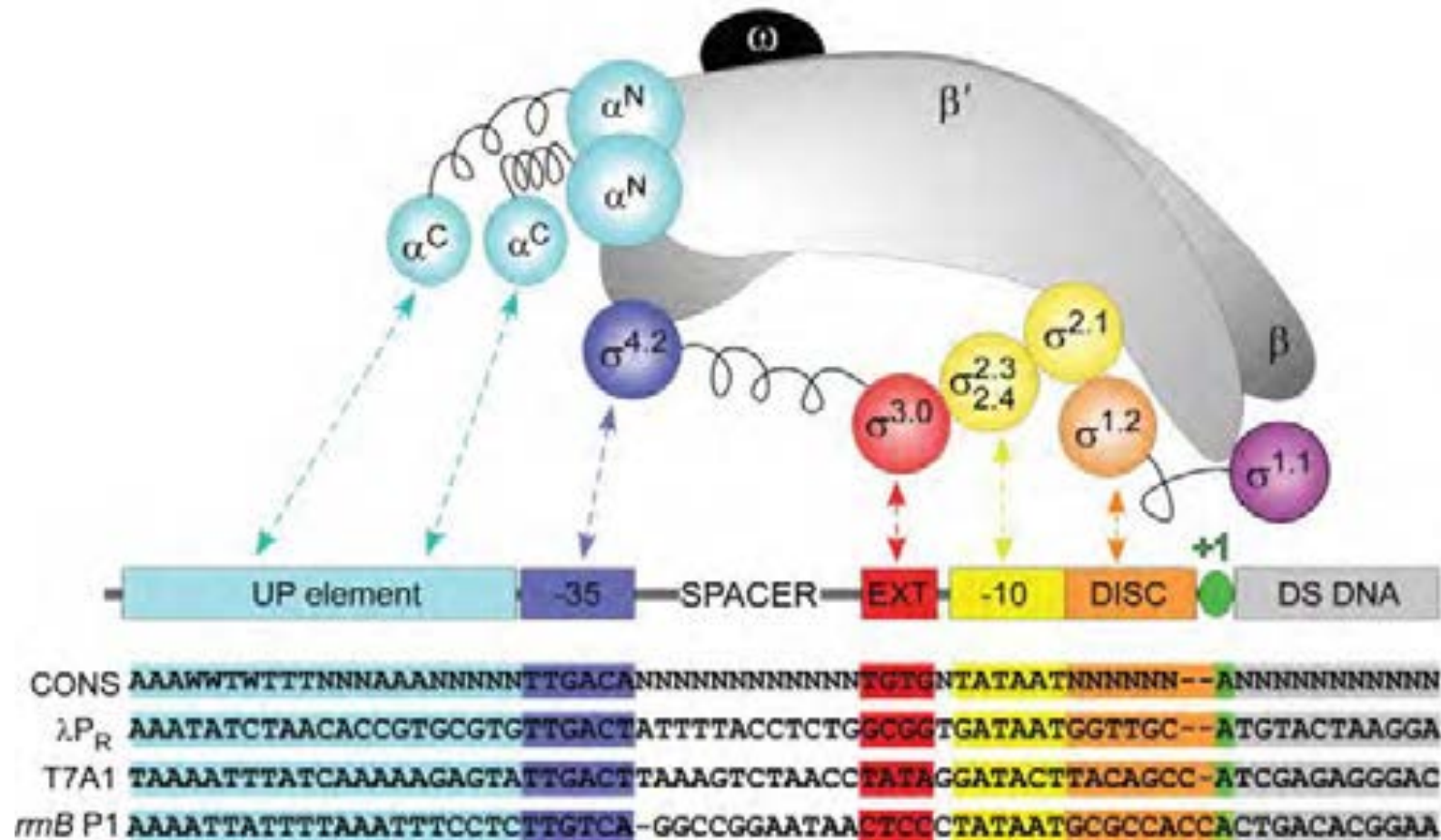
rpoB subunitat β → unió nucleòtids
rpoC subunitat β' → unió DNA motlle
rpoA subunitat α → unió al promotor

} nucli

rpoD subunitat σ → reconeixement de la regió -35 i unió -10

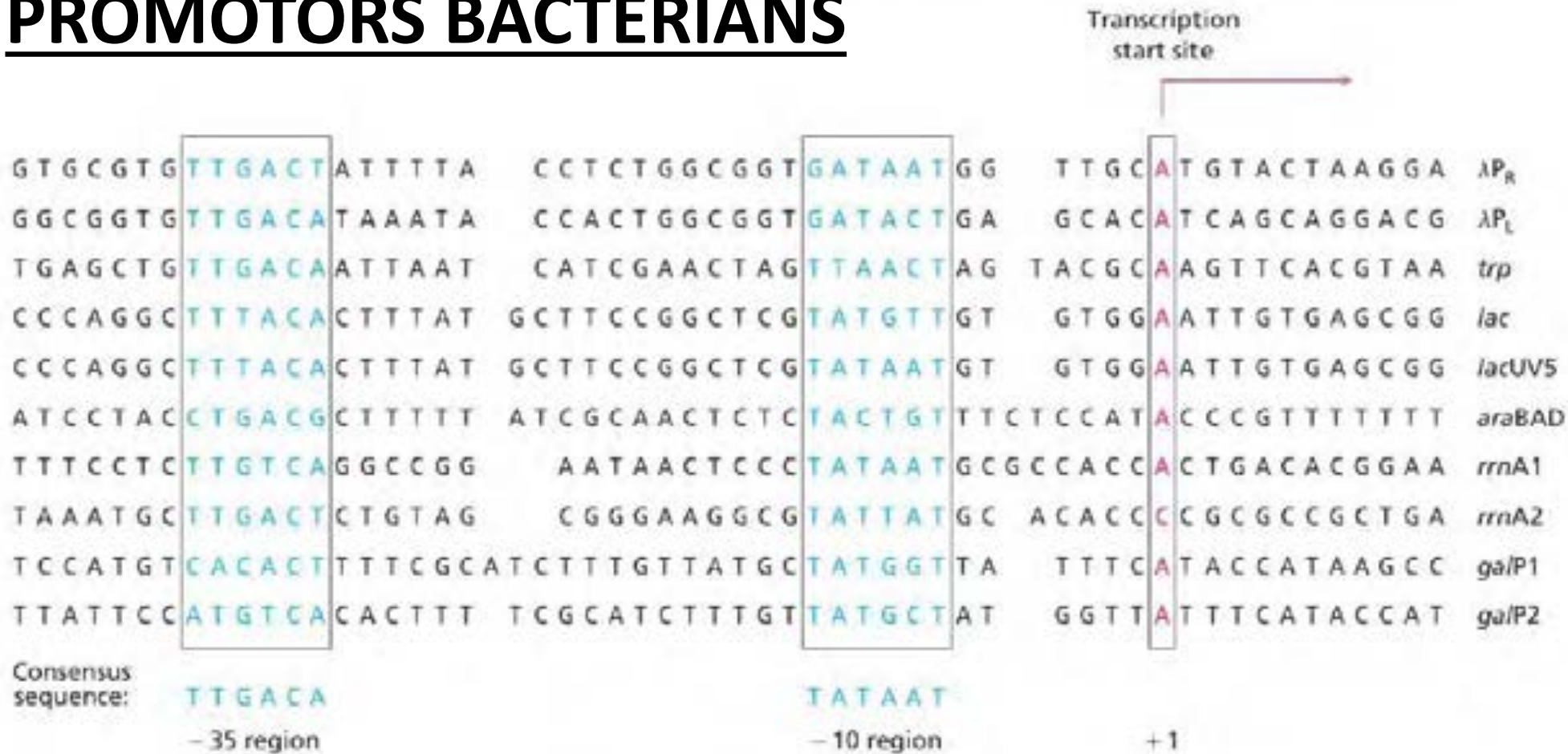


RNA POLIMERASA EN BACTERIS





PROMOTORS BACTERIANS



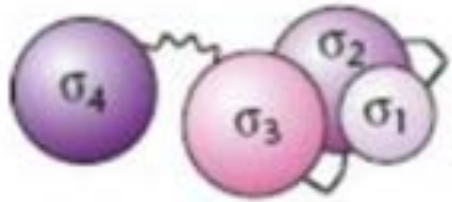
Moran, Horton, Scrimgeour & Perry "Principles of Biochemistry" 5th Ed (2012)

No tots els promotors tenen la mateixa seqüència



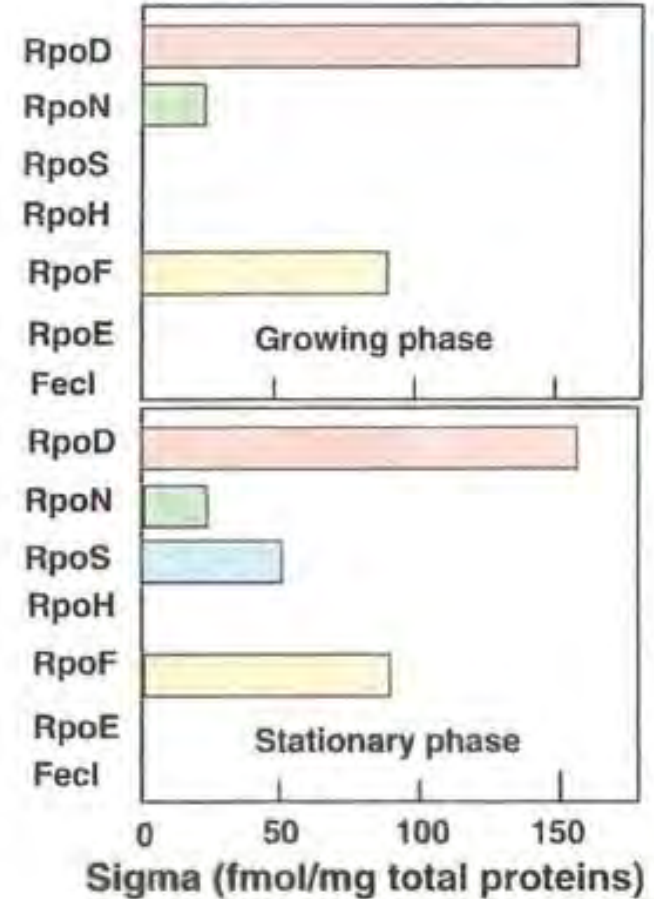
L'afinitat de la RNA polimerasa serà diferent!!!

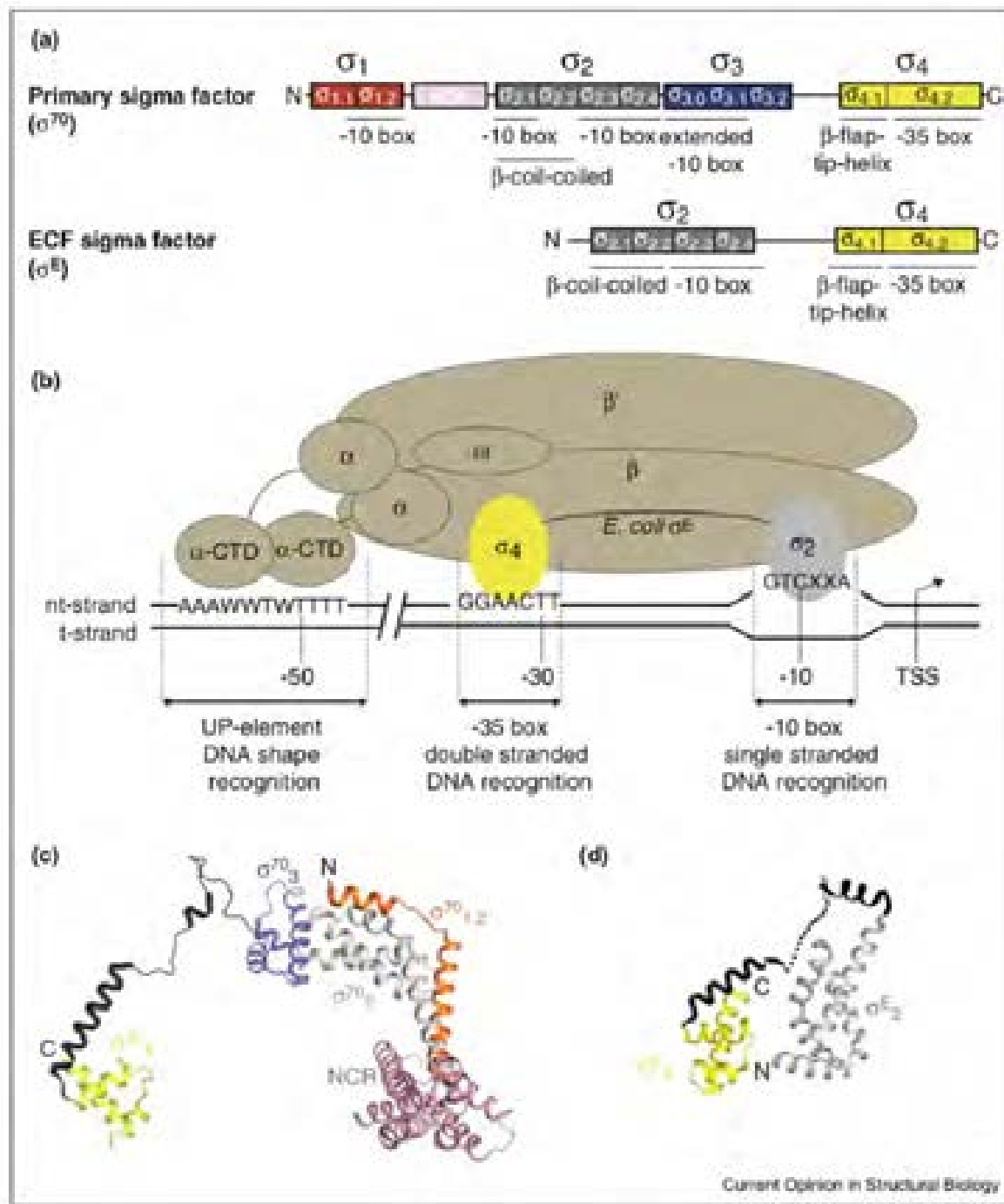
σ



Intracellular Concentrations of RNA Polymerase Sigma Subunits in *Escherichia coli* W3110

| Sigma subunit | Genes under the control of each sigma |
|---------------|------------------------------------------------------|
| RpoD (613 aa) | Growth-related genes (~1,000) |
| RpoN (477 aa) | Nitrogen-regulated/stress response genes (~15) |
| RpoS (330 aa) | Stationary phase/stress response genes (~100) |
| RpoH (284 aa) | Heat shock/stress response genes (~40) |
| RpoF (239 aa) | Flagella-chemotaxis genes (~40) |
| RpoE (202 aa) | Extreme heat shock/extracytoplasmic genes (~5) |
| FecI (173 aa) | Ferric citrate transport/extracytoplasmic genes (~5) |







Unitats transcripcionals en bacteris

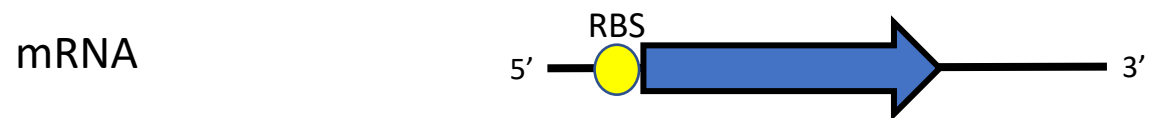
En bacteris existeixen:

- ❖ Unitats transcripcionals MONOCISTRÒNIQUES
 - ❖ El transcrit conté un únic ORF
- ❖ Unitats transcripcionals POLICISTRÒNIQUES
 - ❖ El transcrit conté més d'un ORF
(els ORFs **poden tenir** una relació funcional)

¿Quina serà la diferència?



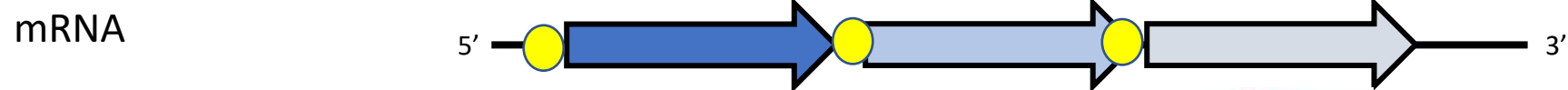
Unitat transcripcional monocistronica



Producte gènic

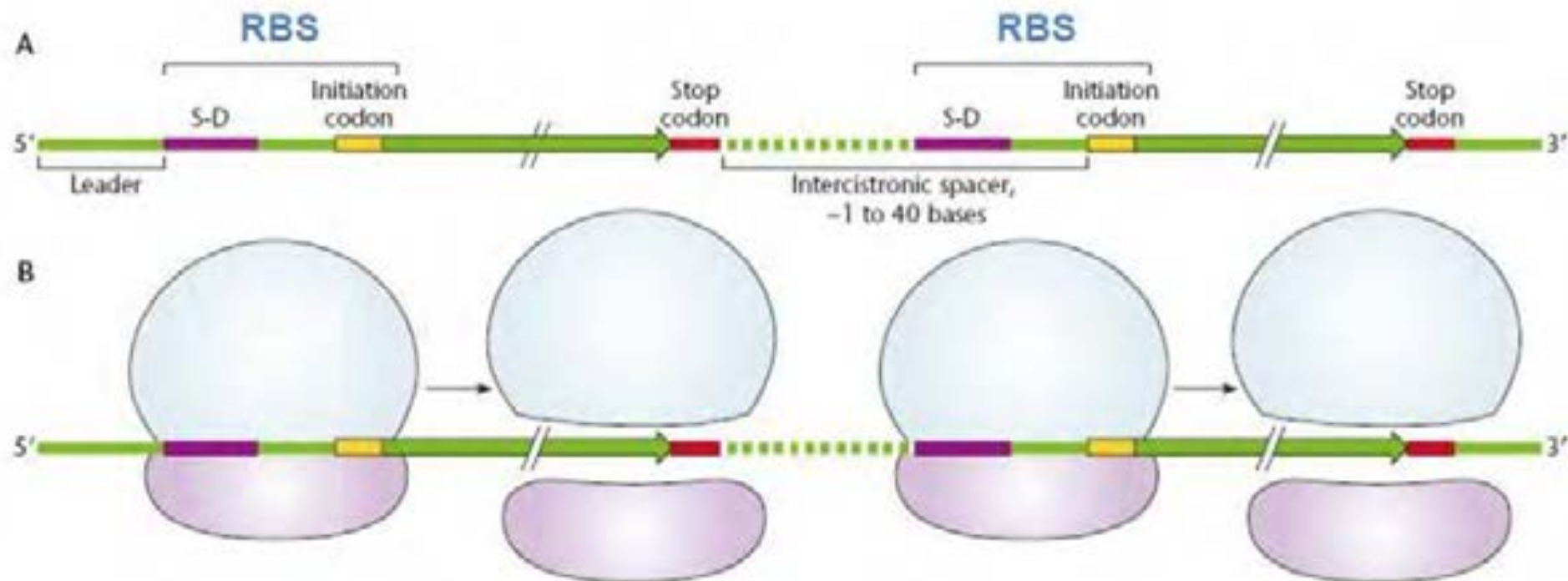


Unitat transcripcional policistronica



Productes gènics



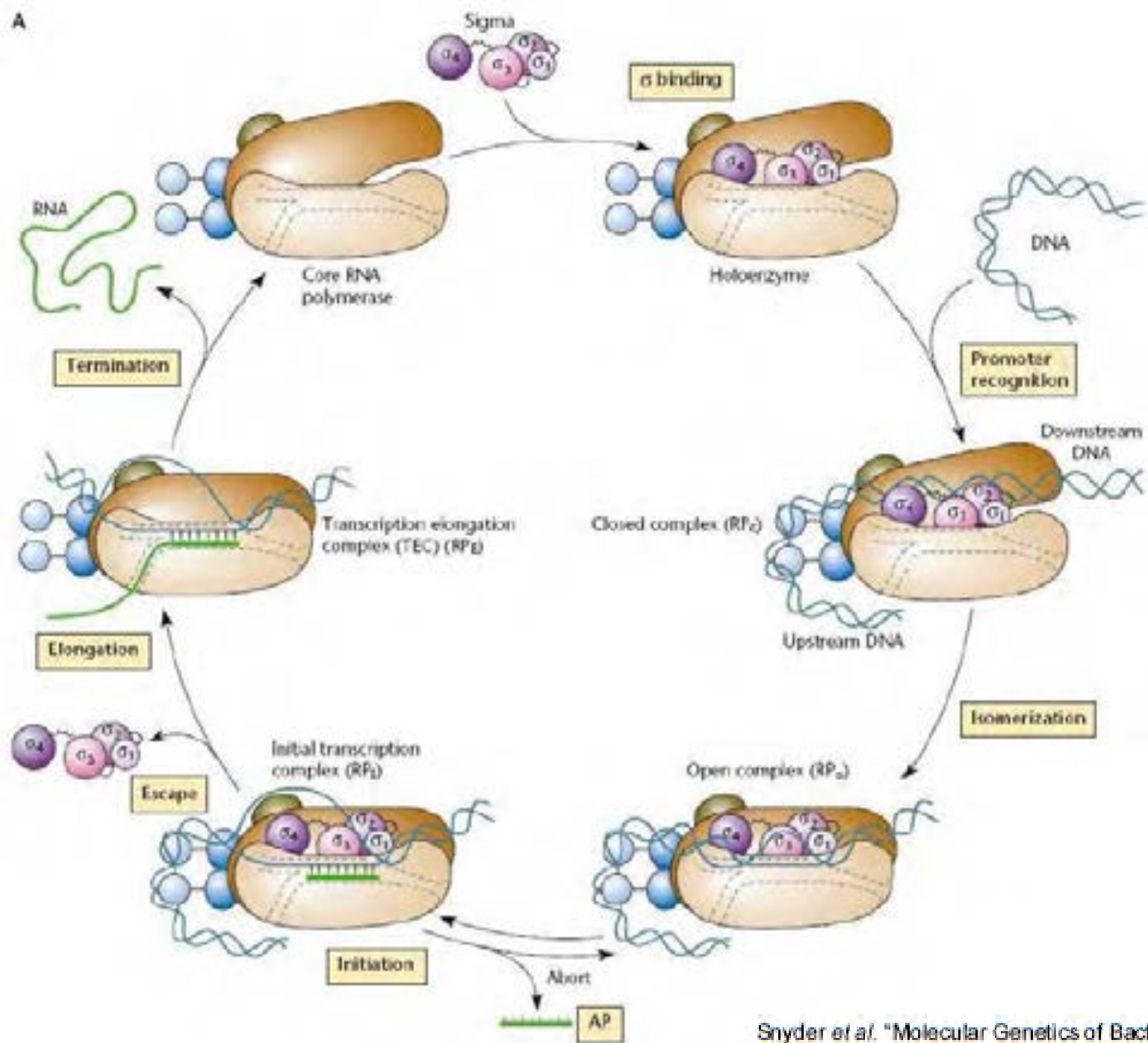


Stoyan et al. "Molecular Genetics of Bacteria" 5th Edition (2001)

- ✓ El marc de lectura de cada cistró pot ser diferent. És el ribosoma qui marca la pauta de lectura quan s'uneix al RBS.
- ✓ Per proximitat, el ribosoma que acaba la traducció d'un cistró pot iniciar la traducció del següent.

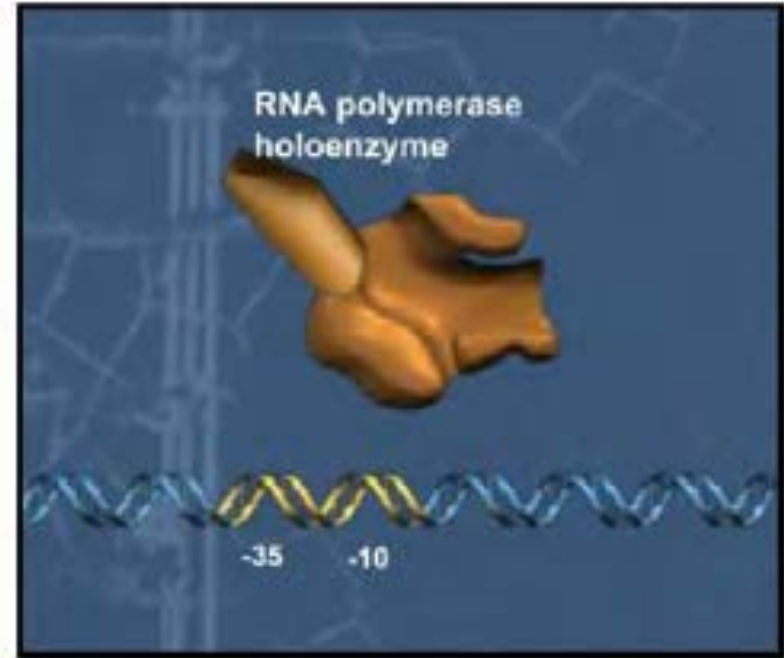
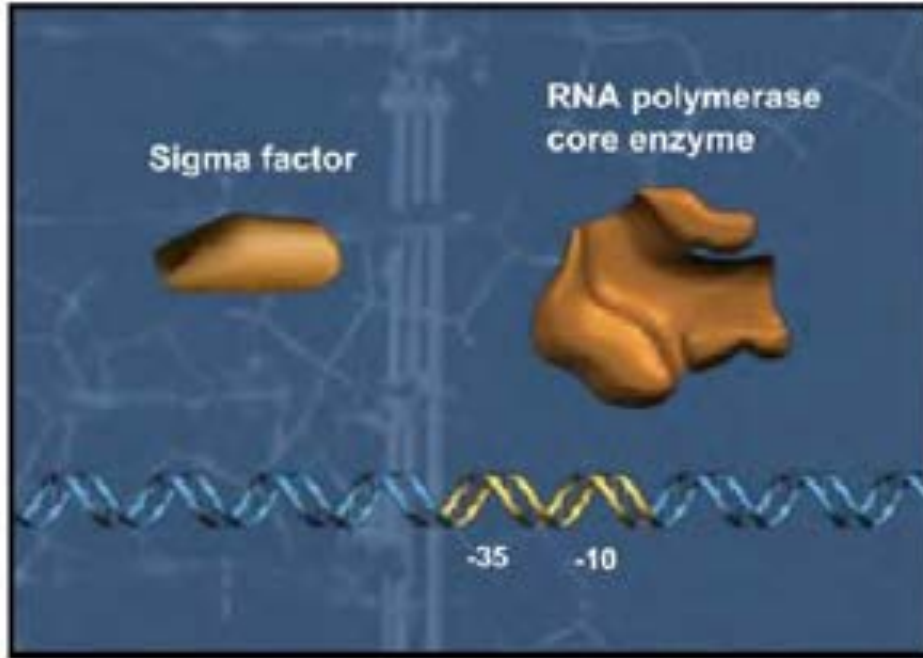


La transcripció en bacteris





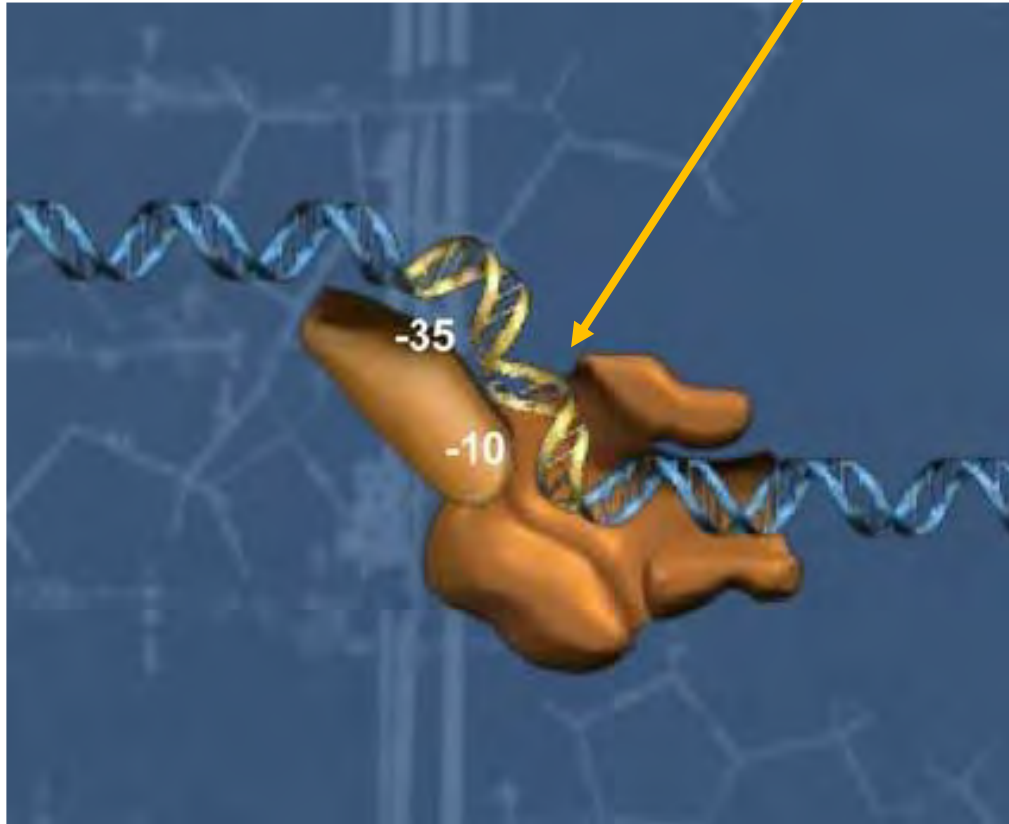
INICI DE LA TRANSCRIPCIÓ



Reconeixement i unió del factor σ a la RNA polimerasa i formació de l'holoenzim

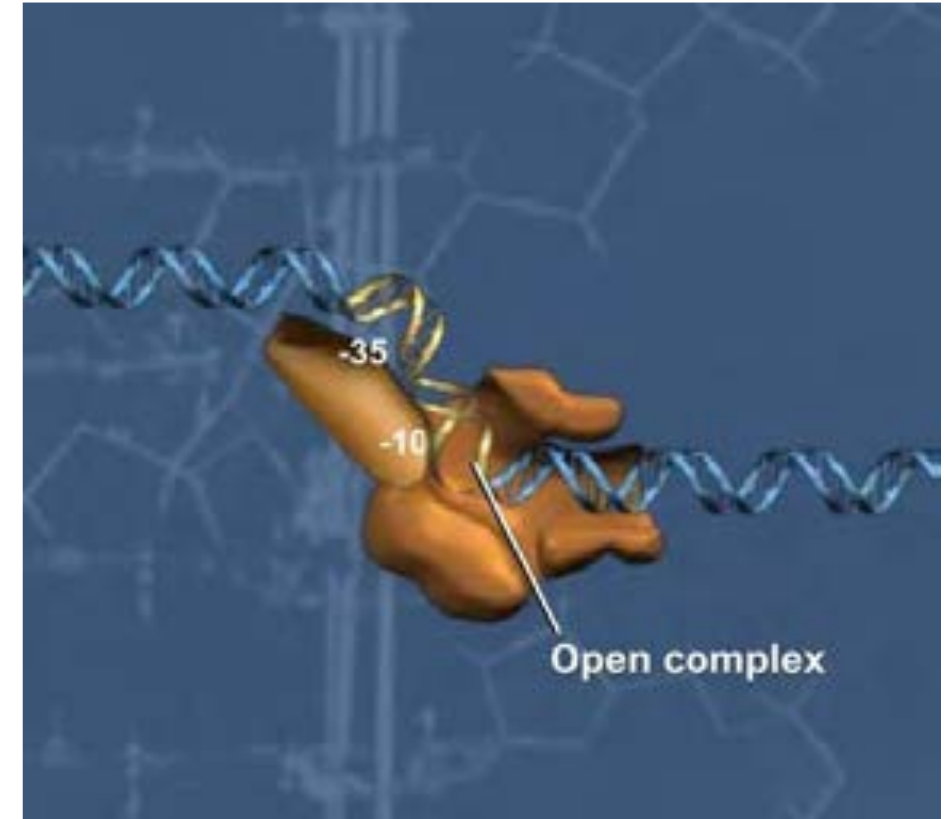


Complex tancat

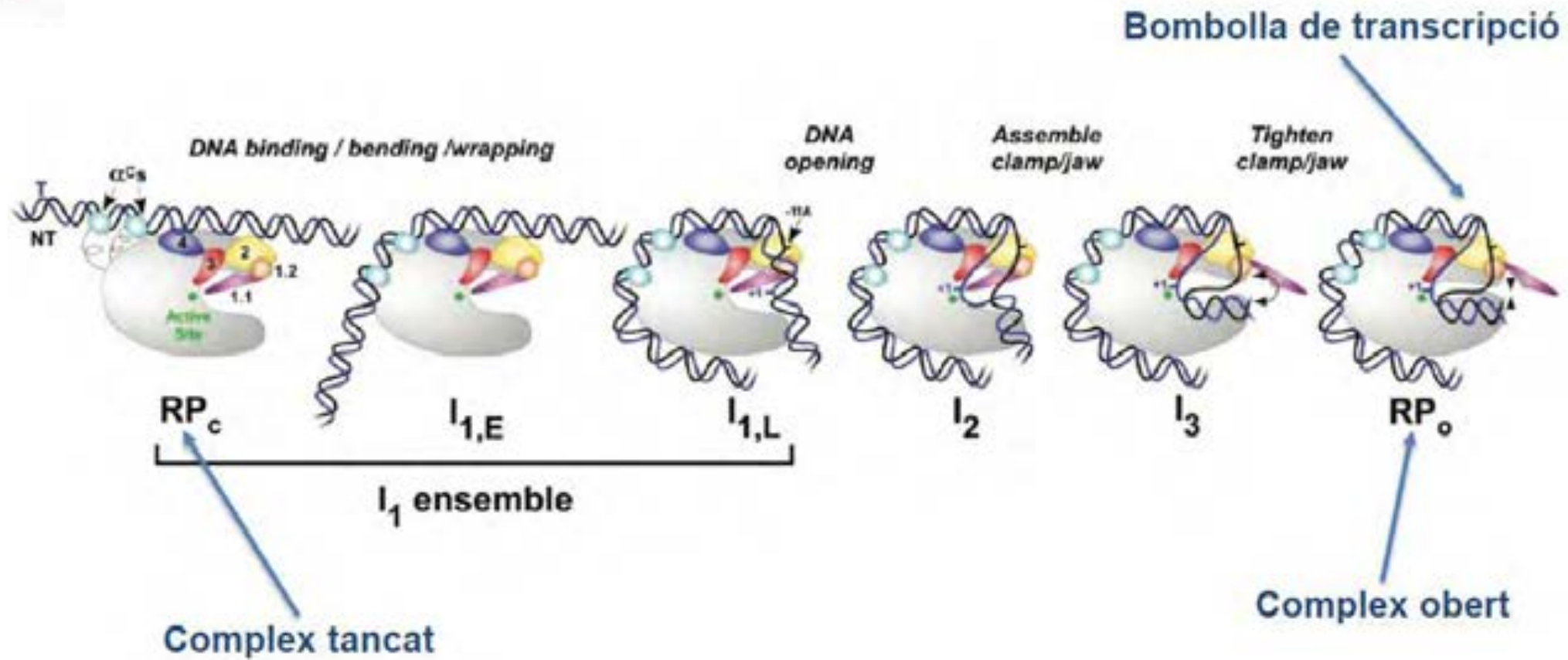


Reconeixement i unió

Isomerització



Mitjançant el trencament de ponts d'hidrogen es produeix l'obertura del DNA i la formació del **complex obert**

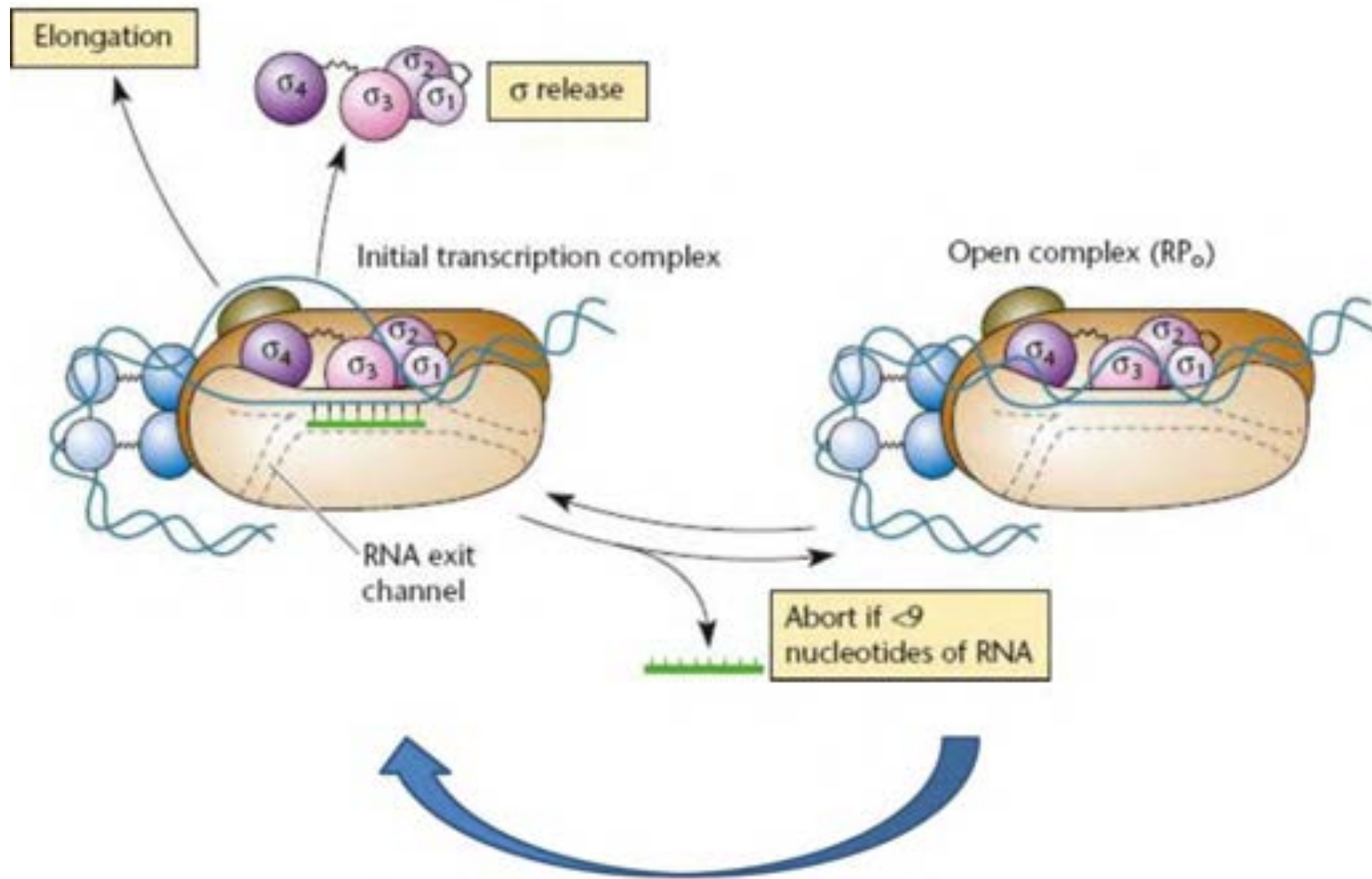




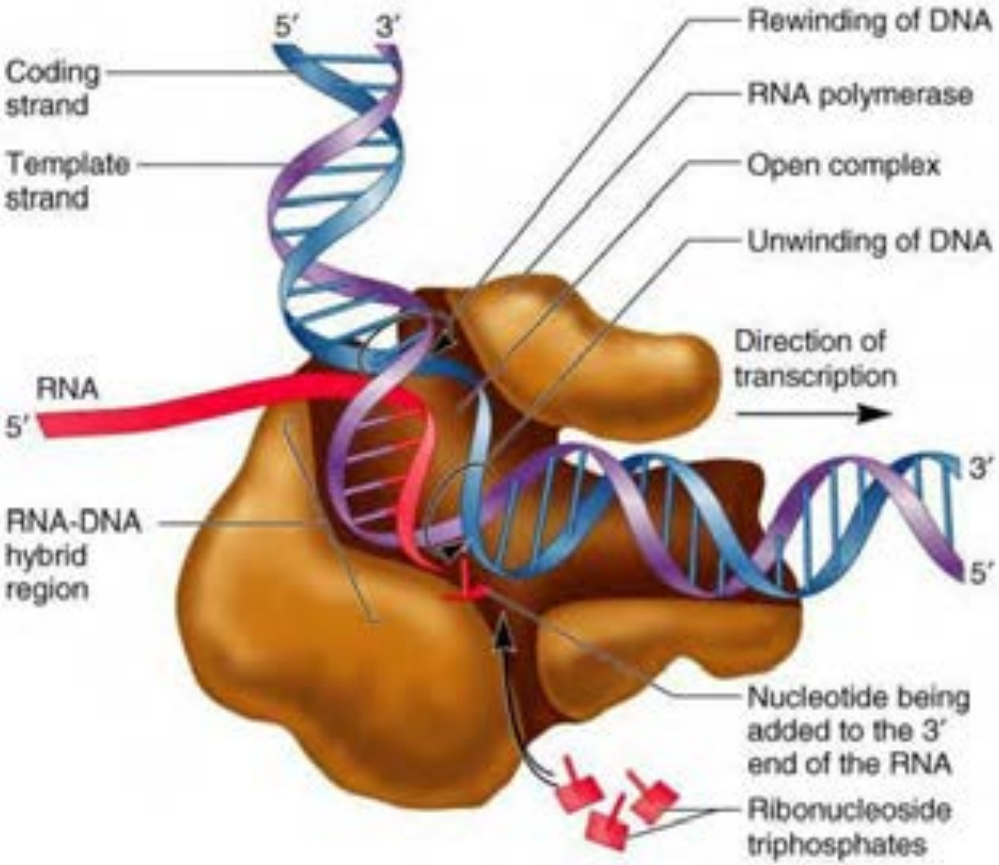
En el centre actiu de la RNAP s'afegeixen nucleòtids a l'extrem 3' del nou transcrit



La fase d'inici s'acaba quan es desuneix el factor σ de l'holoenzim i la RNAP surt de la zona del promotor

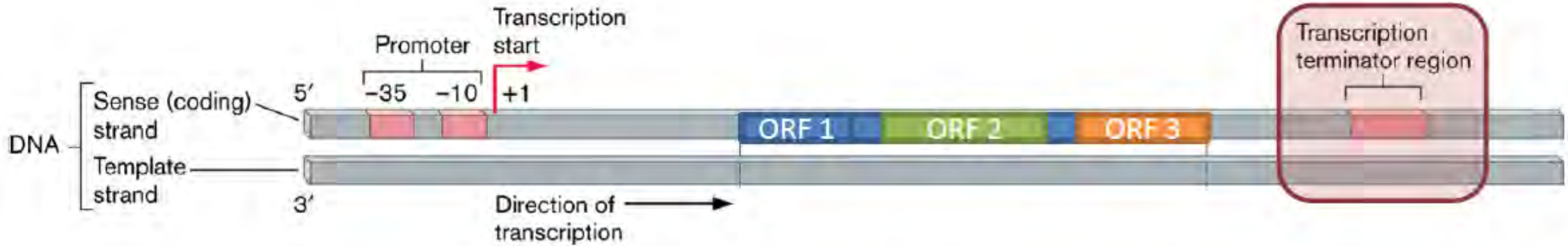


ELONGACIÓ





FINAL DE LA TRANSCRIPCIÓ



La regió de terminació de la transcripció està al final de cada unitat transcripcional

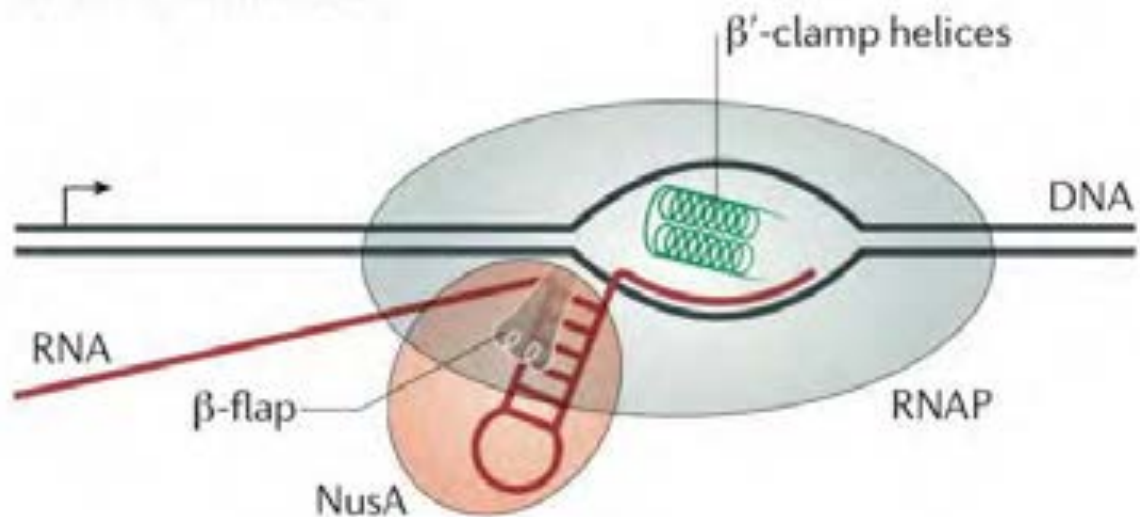
ATURADA DE LA RNA POL

- Alentiment de la velocitat d'elongació
- Tancament del complex
- Desplaçament de la RNA Pol del DNA



MECANISMES DE FINALITZACIÓ

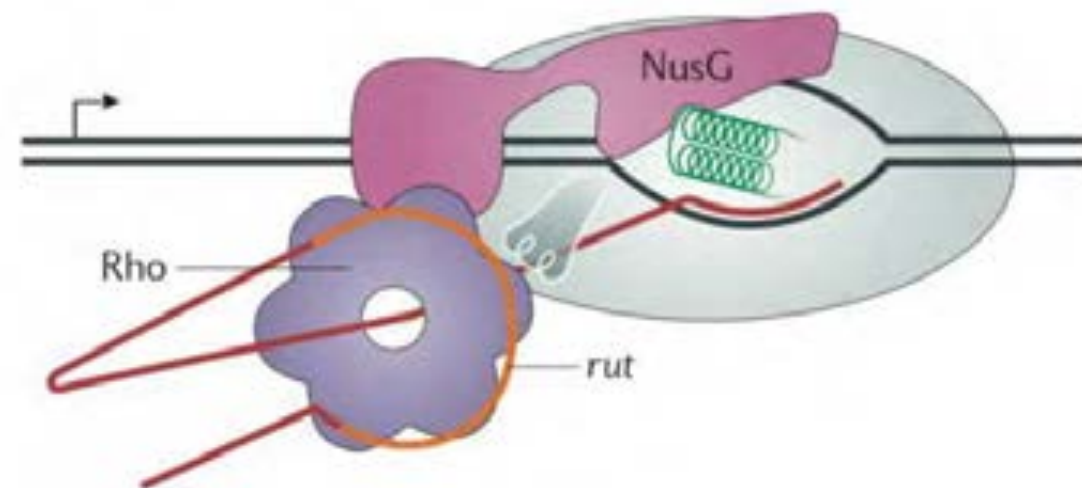
Intrinsic terminator



Nature Reviews Microbiology (2011) 9, 319-329

DEPENDENTS D'UN
TERMINADOR INTRÍNSEC

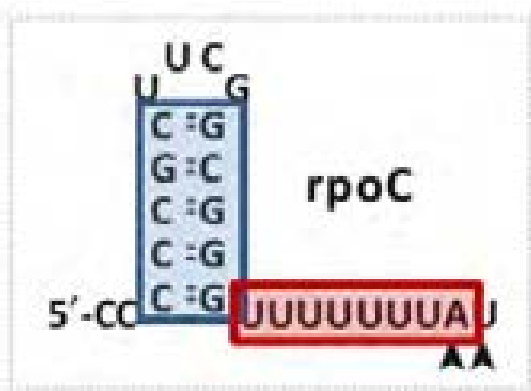
Rho-dependent terminator



DEPENDENTS DE FACTOR
(Rho)



DEPENDENTS D'UN TERMINADOR INTRÍNSEC



Trends in Genetics (2016) 32, 508-522

Regió rica en G-C



Gran estabilitat del llaç

Regió rica en Us



Inestabilitat de l'híbrid RNA:DNA

Motiu $G_{-10}Y_{-1}G_{+1}$

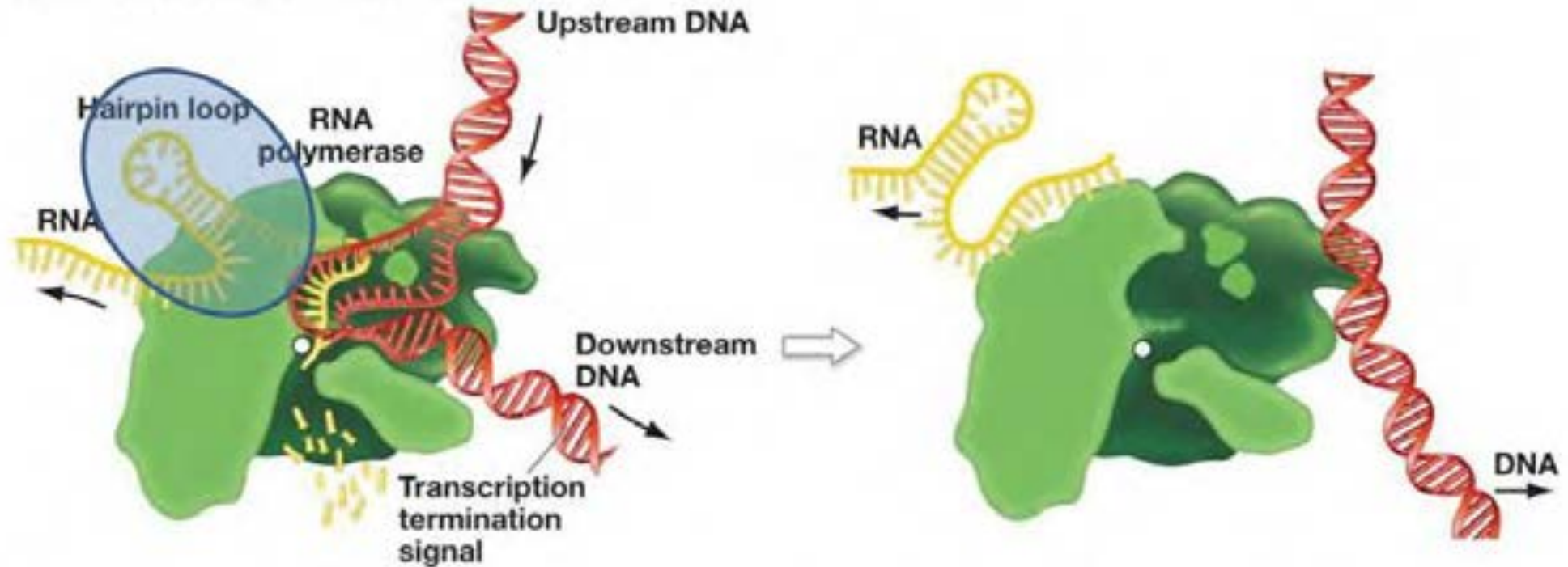


Lloc d'aturada de la RNAP



DEPENDENTS D'UN TERMINADOR INTRÍNSEC

HOW TRANSCRIPTION ENDS



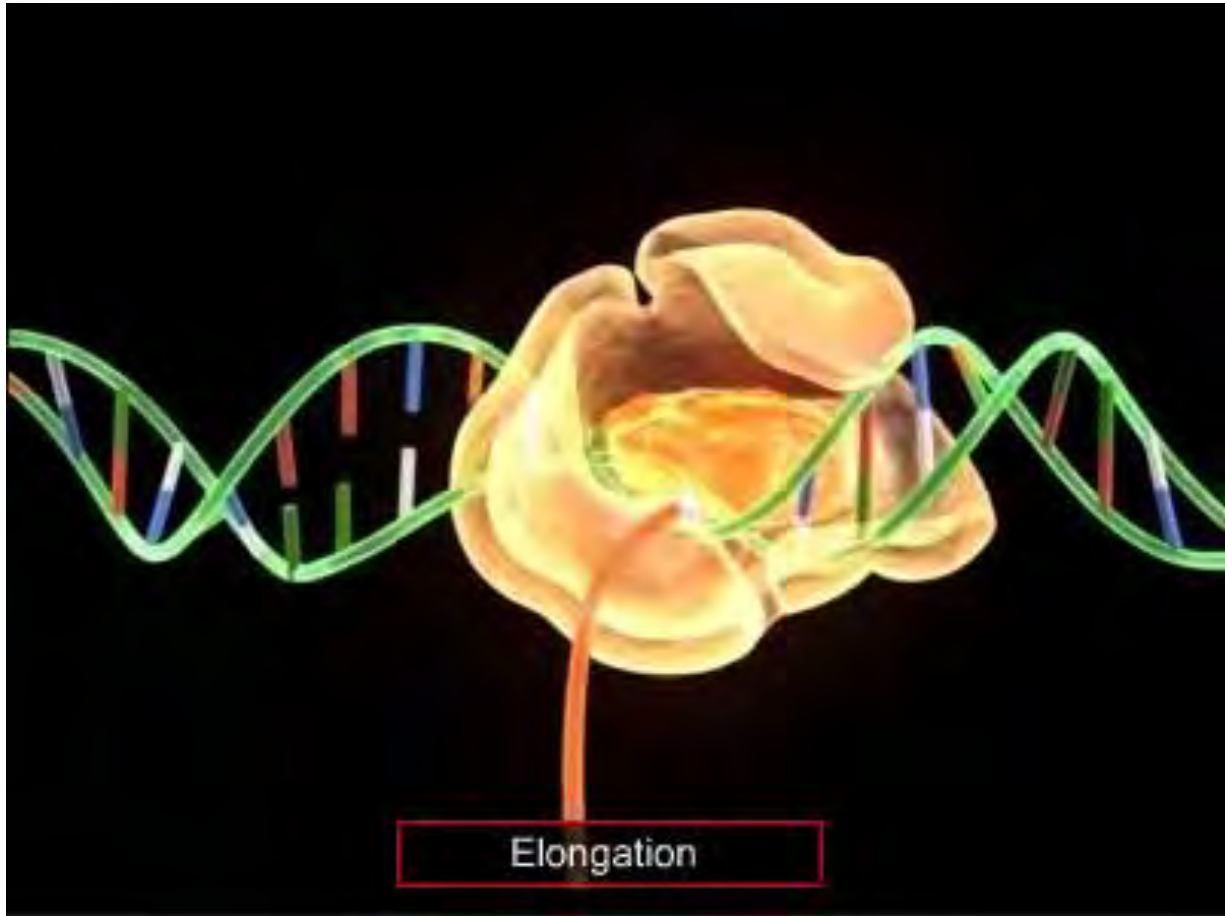
1. RNA polymerase reaches a transcription termination signal, which codes for RNA that forms a hairpin.

Copyright © 2008 Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

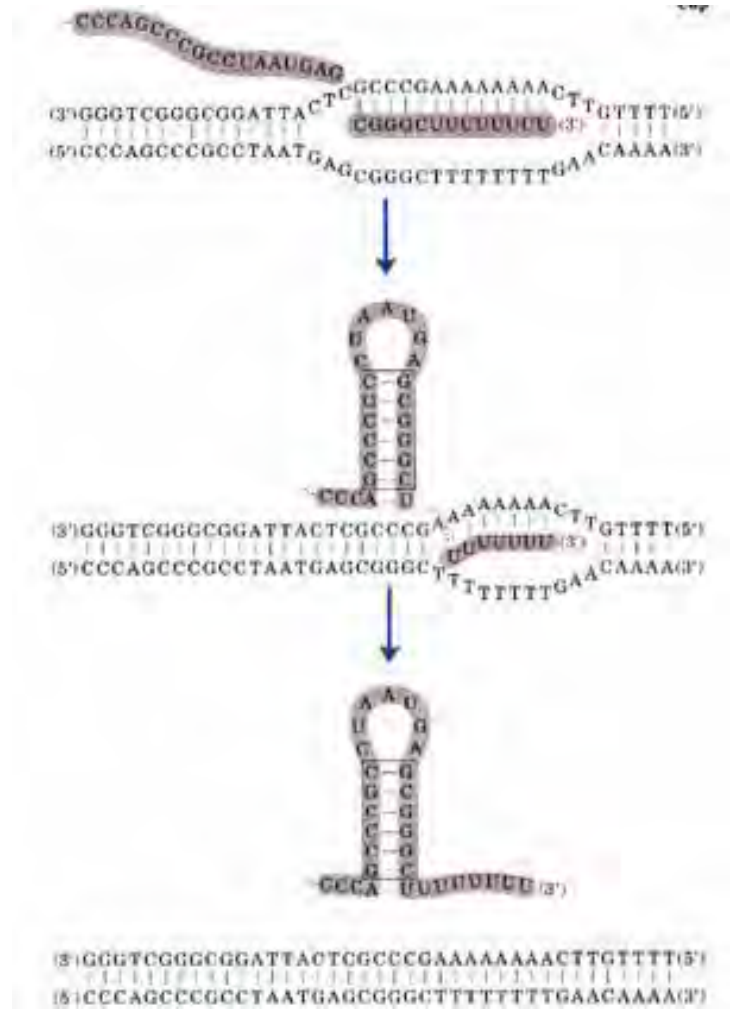
2. The RNA hairpin causes the RNA strand to separate from the RNA polymerase, terminating transcription.



DEPENDENTS D'UN TERMINADOR INTRÍNSEC



FRAGMENT DE <https://www.youtube.com/watch?v=1b-bRVgqof0>





DEPENDENTS DE FACTOR (Rho)

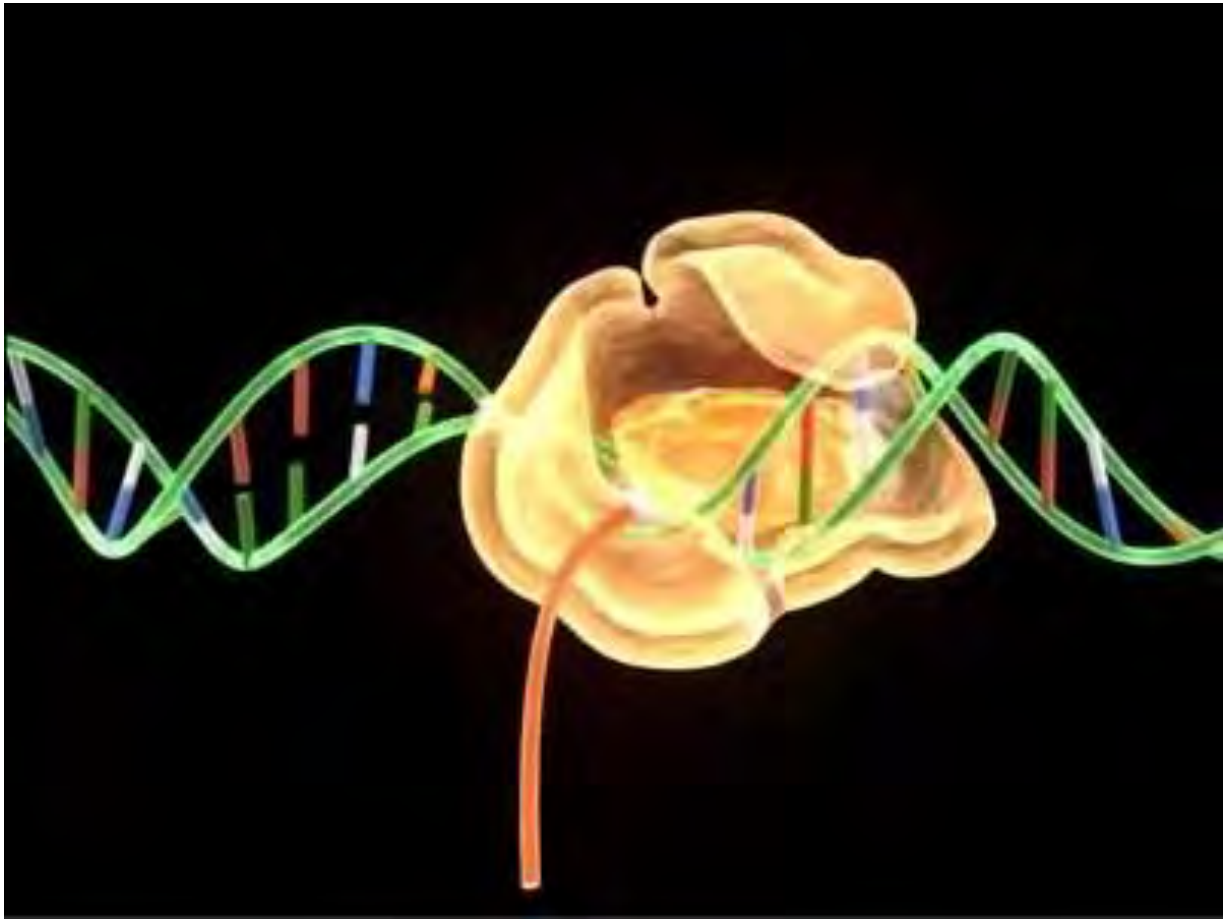
Proteïna Rho

- ❖ Pertany a la família de les RNA-DNA helicases
- ❖ Proteïna hexamèrica de subunitats idèntiques
- ❖ Domini d'unió a RNA i d'hidròlisis d'ATP
- ❖ Reconeix una seqüència específica en el RNA
- ❖ S'uneix al RNA i circula sobre ell fins a atrapar a la RNA polimerasa

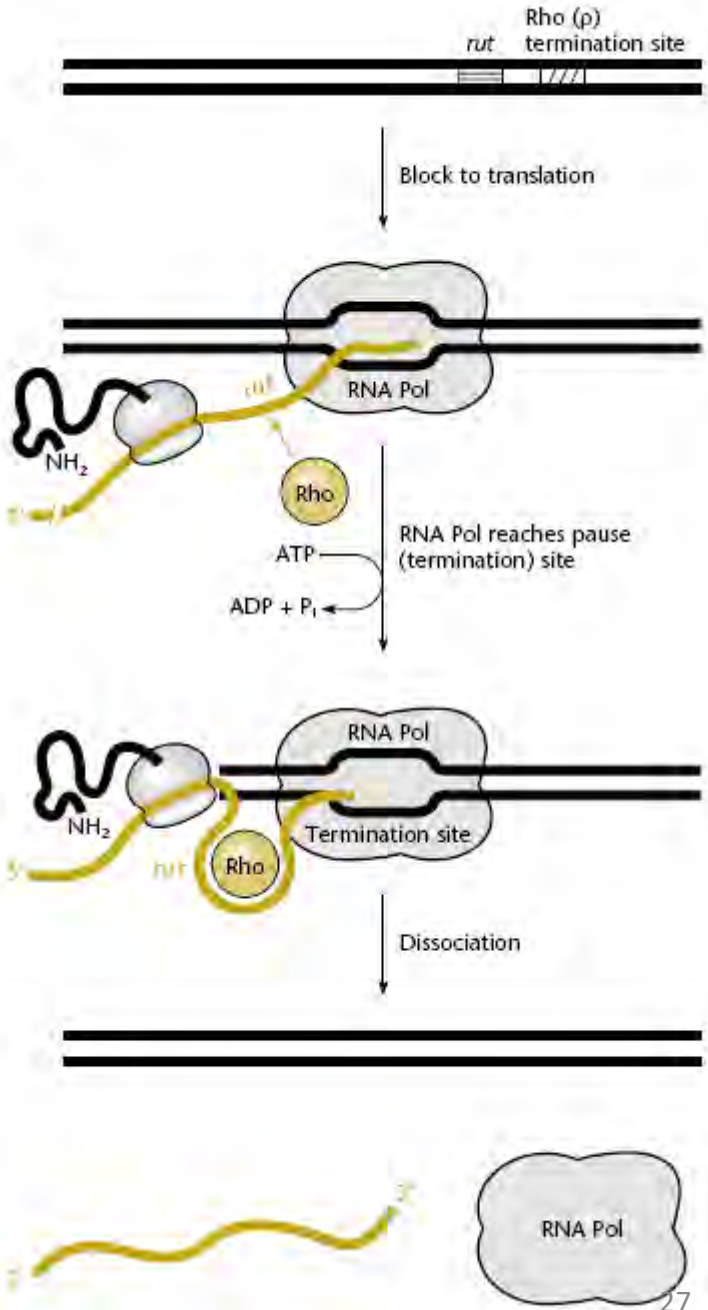




DEPENDENTS DE FACTOR (Rho)



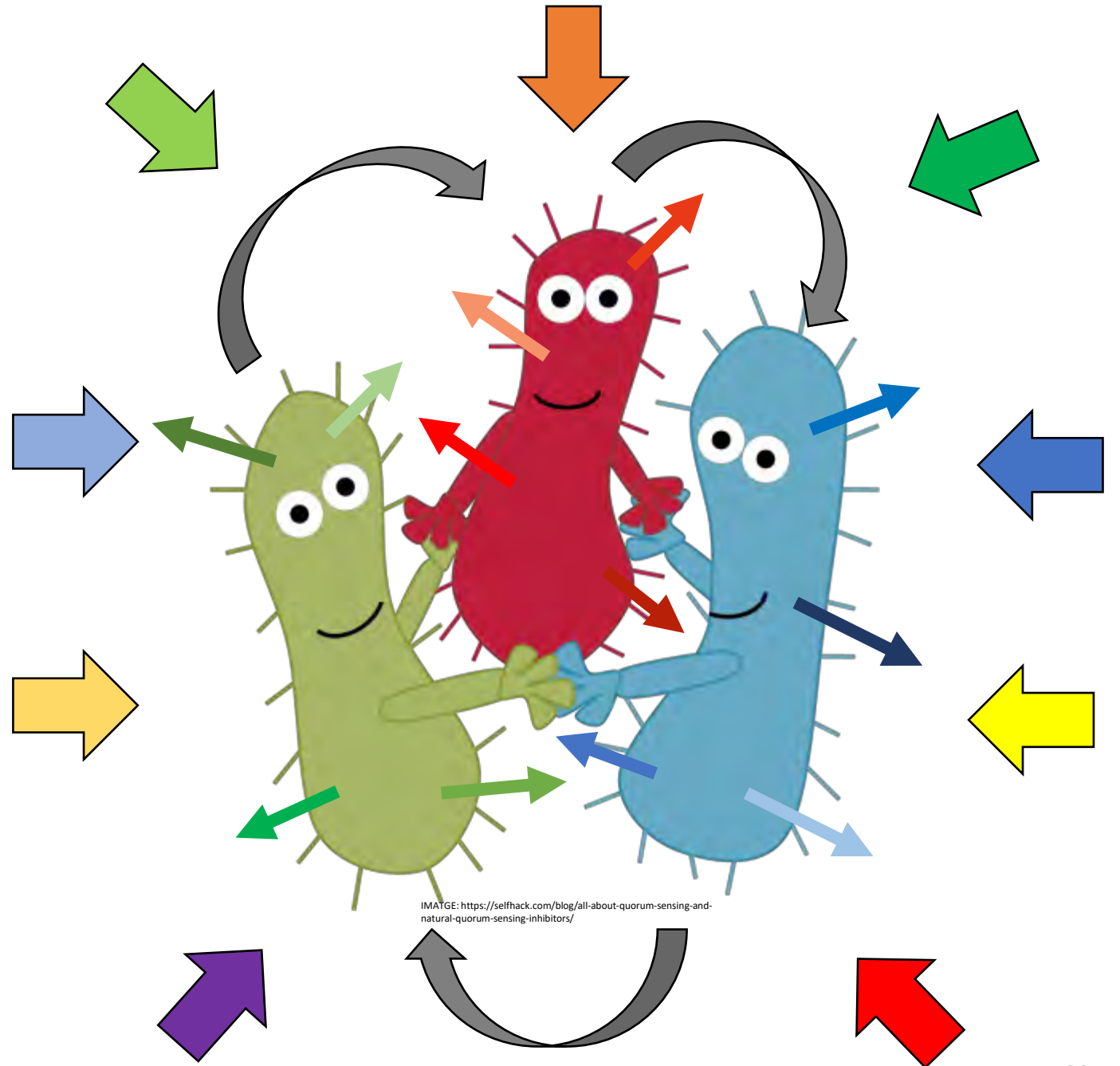
FRAGMENT DE <https://www.youtube.com/watch?v=1b-bRVgqof0>







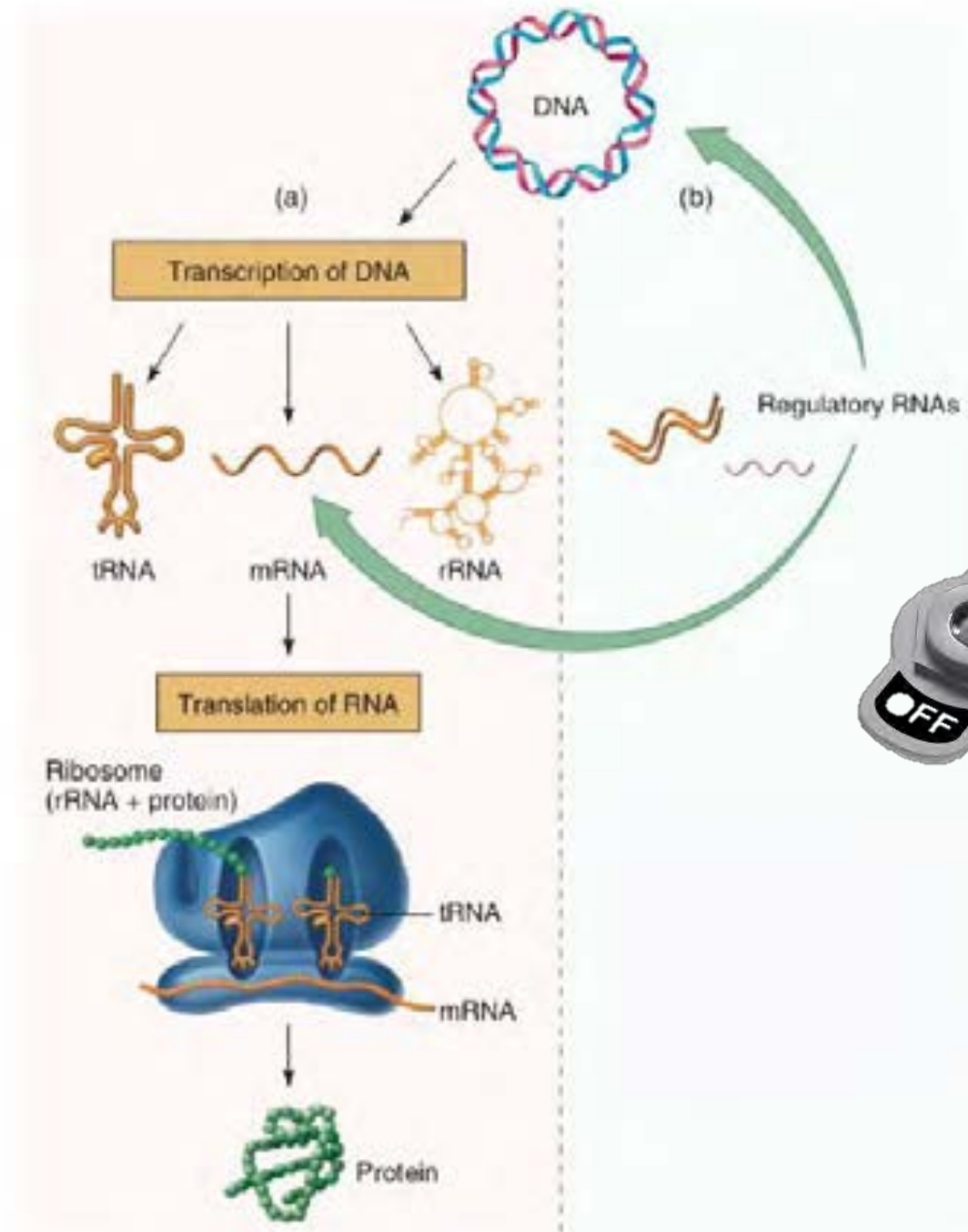
CONTROL DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA



Control
transcripcional



Control
Traduccional



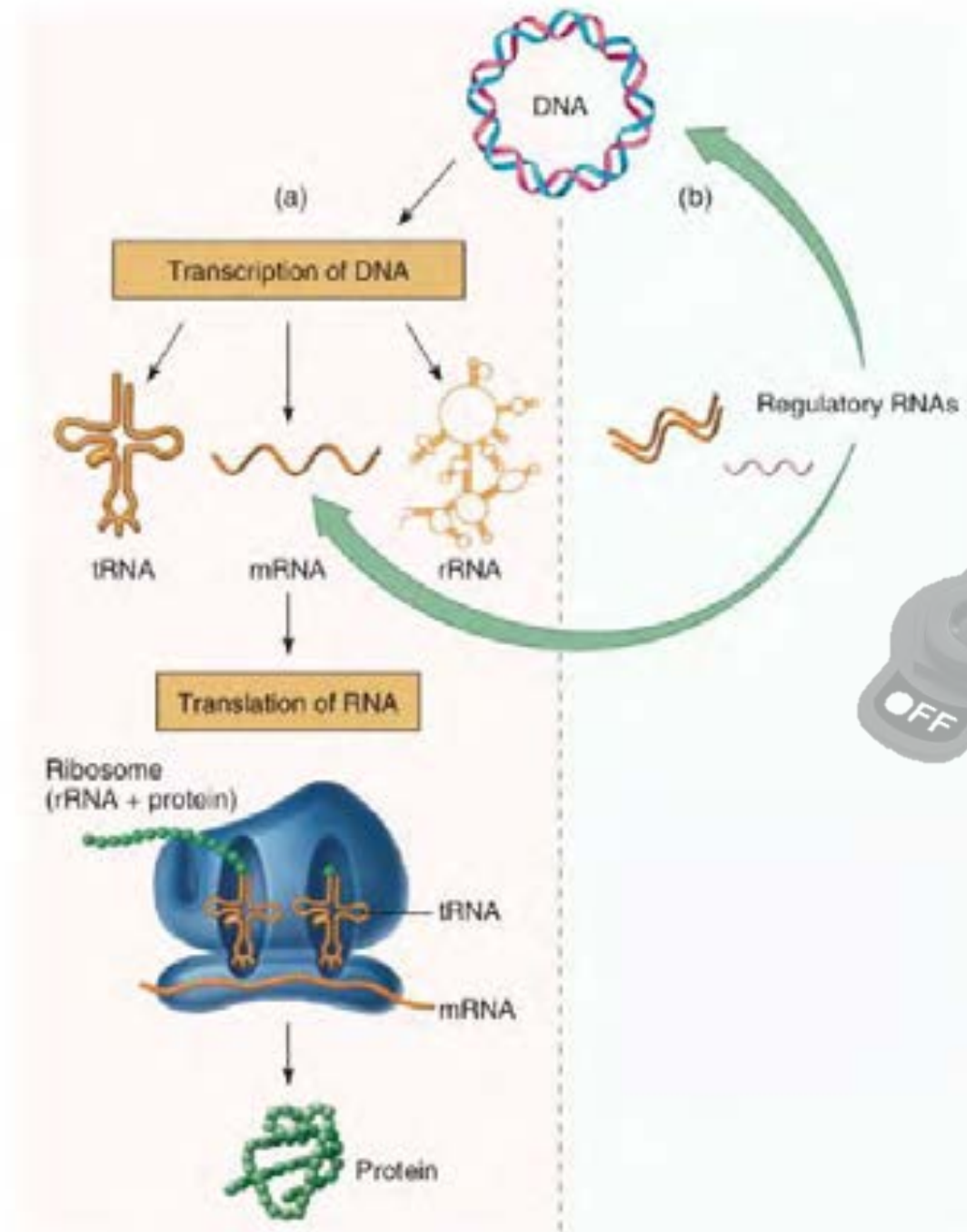
Control post-
transcripcional



Control
transcripcional



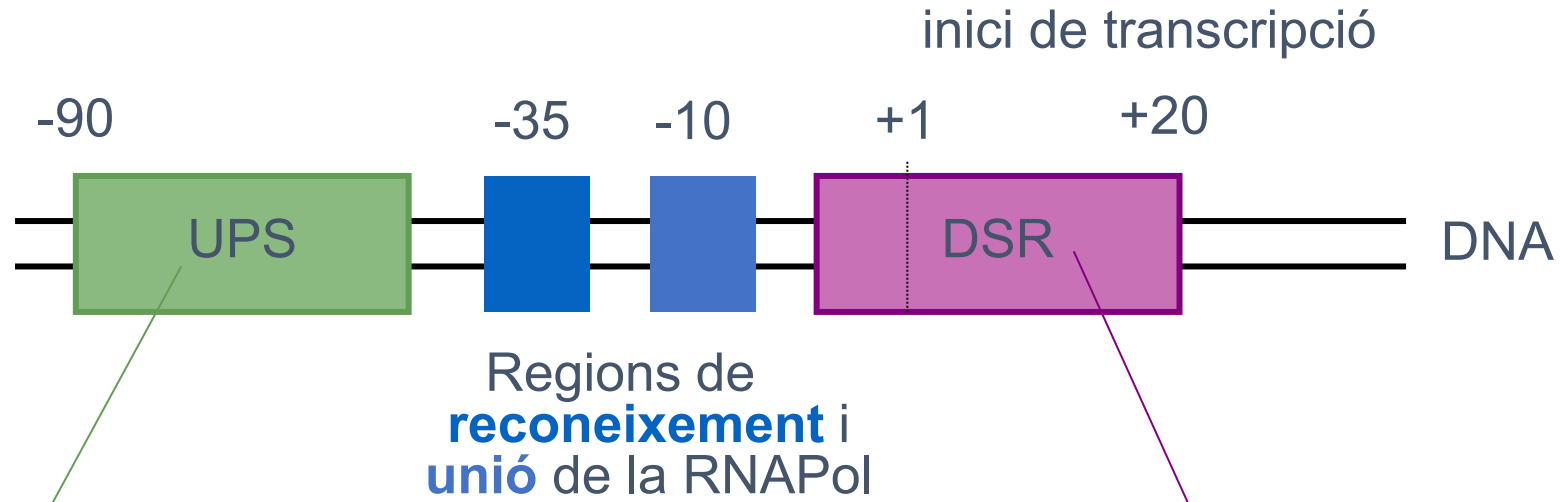
Control
Traduccional



Control post-
transcripcional



Regió promotora en bacteris



Regions *upstream*

Regions *downstream*

activadors i moduladors positius

repressors i moduladors negatius

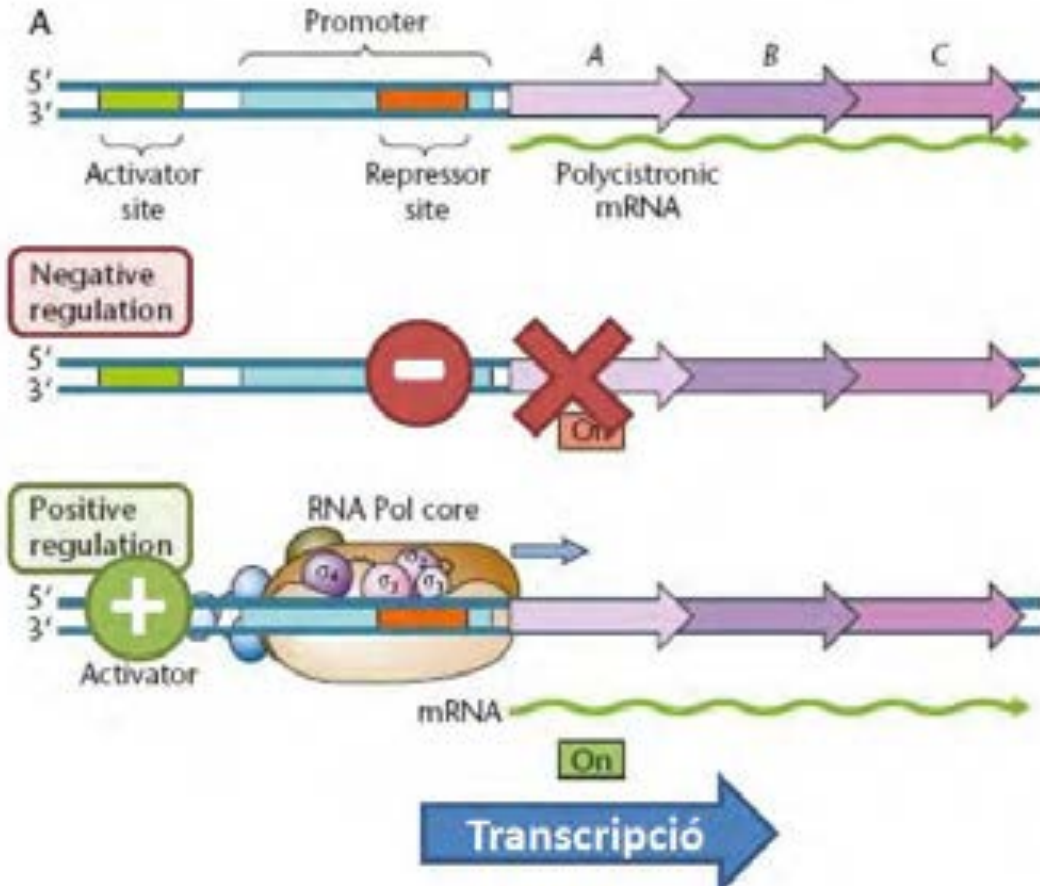
Faciliten l'entrada de la RNAPol

Obstaculitzen l'acció de la RNAPol

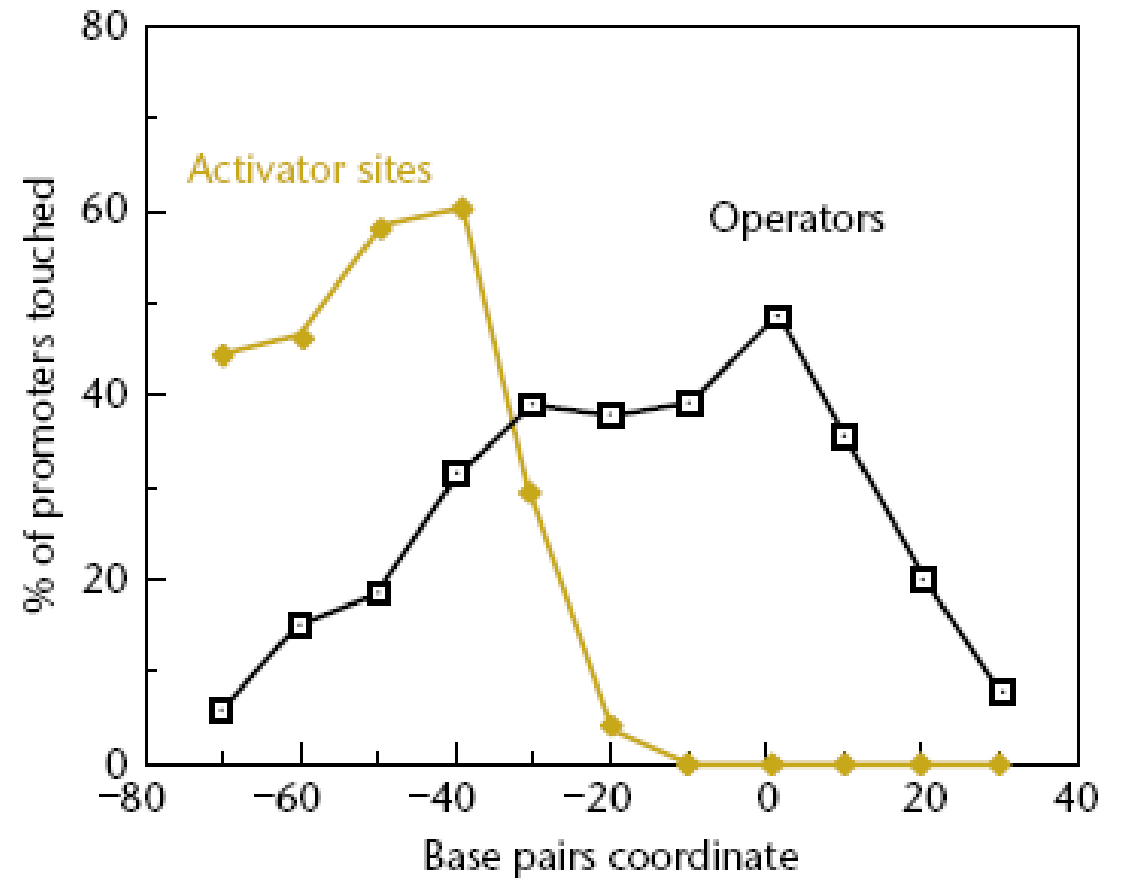




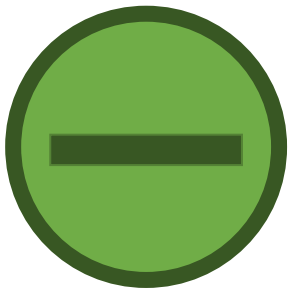
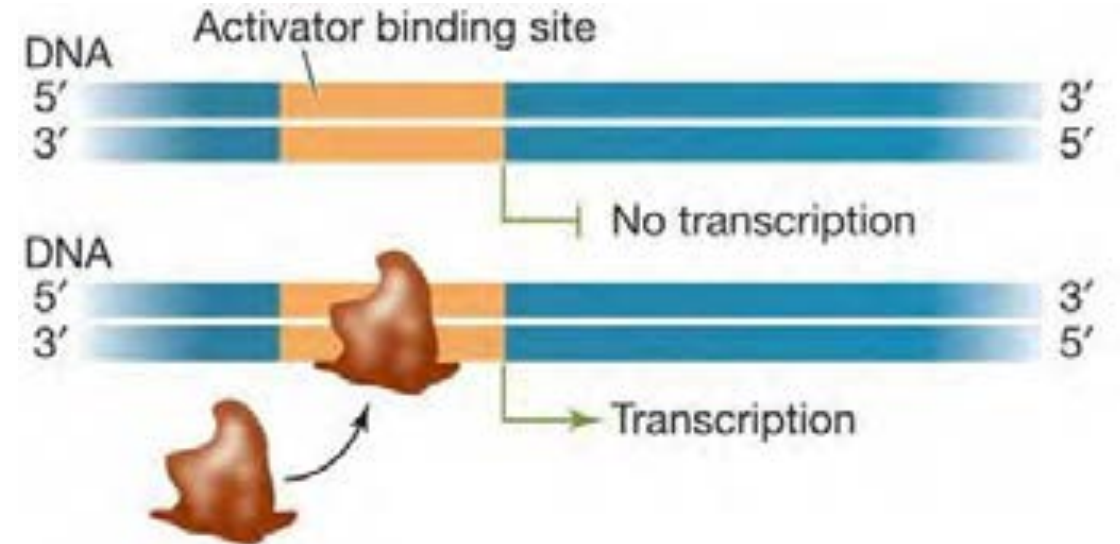
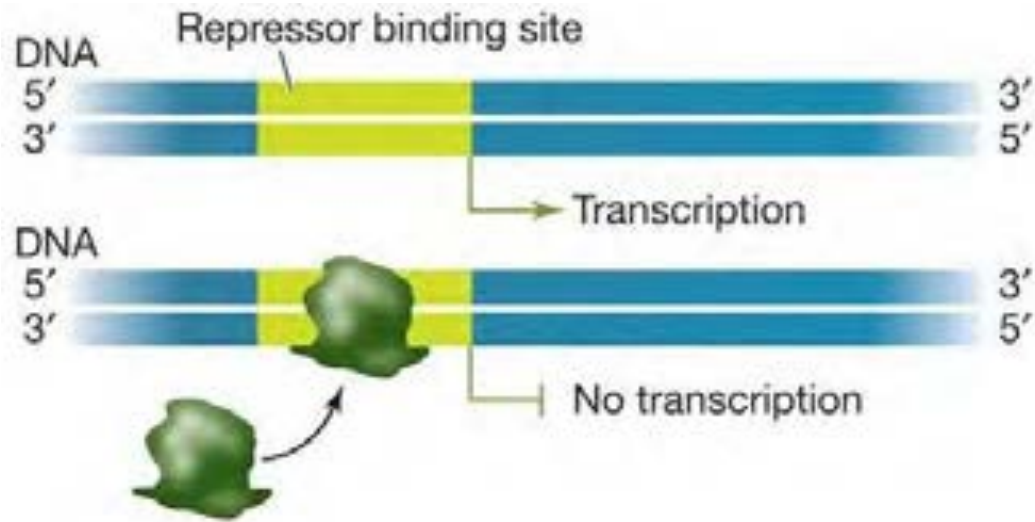
REGULADORS TRANSCRIPCIONALS



Snyder *et al.* "Molecular Genetics of Bacteria" 5th Edition (2020)

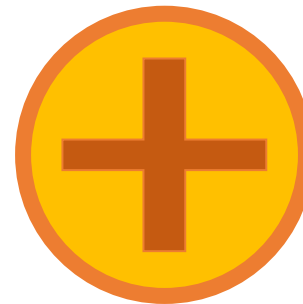


Snyder L and Champness W. Molecular Genetics of bacteria. Second Edition. 2003 ASM PRESS



CONTROL NEGATIU:
La unió del regulador **bloqueja** la transcripció

-



CONTROL POSITIU:
La unió del regulador **activa** la transcripció

-



CONTROL ALOSTÈRIC DELS REGULADORS TRANSCRIPCIONALS

INDUCTOR:

Lligant que unit al regulador transcripcional

PERMET la transcripció

REPRESSOR:

Lligant que unit al regulador transcripcional

EVITA la transcripció



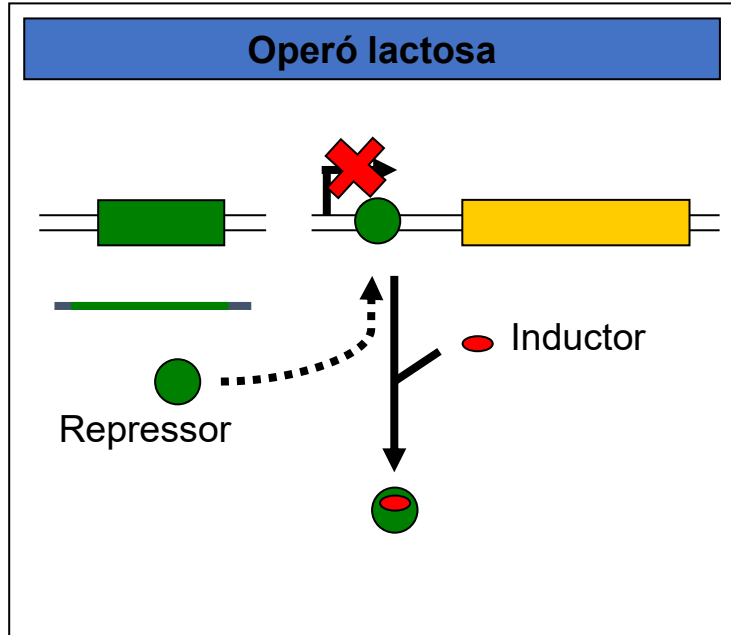
4 TIPUS DE CONTROL TRANSCRIPCIONAL

CONTROL NEGATIU=
REPRESSOR



CONTROL NEGATIU
PER INDUCCIÓ

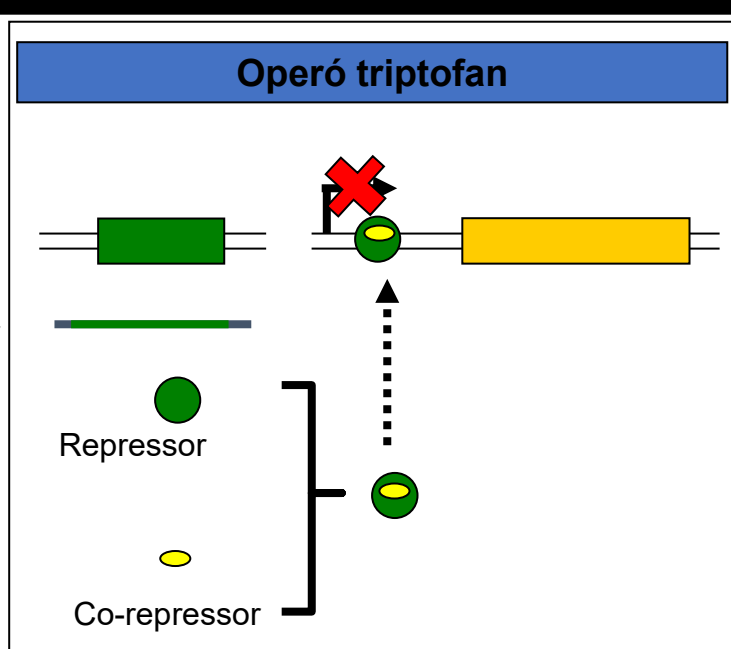
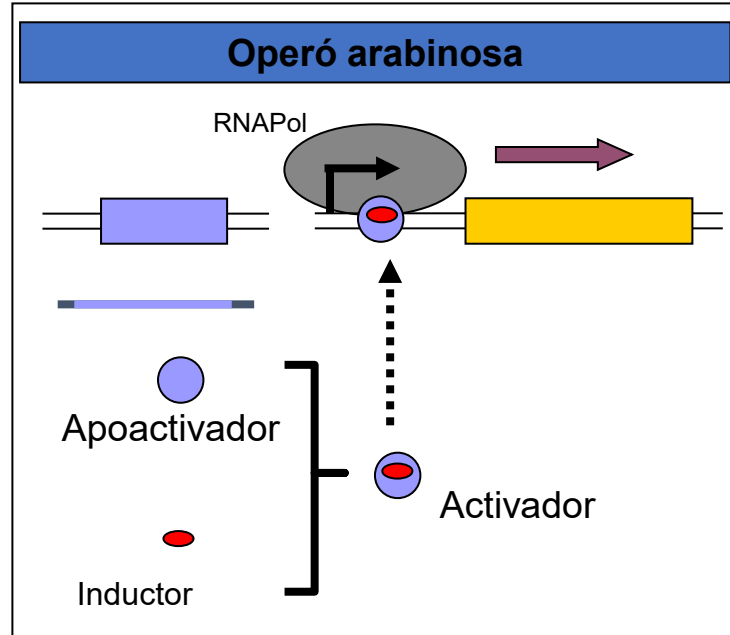
INDUCCIÓ=
Inductor



CONTROL POSSITIU=
ACTIVADOR

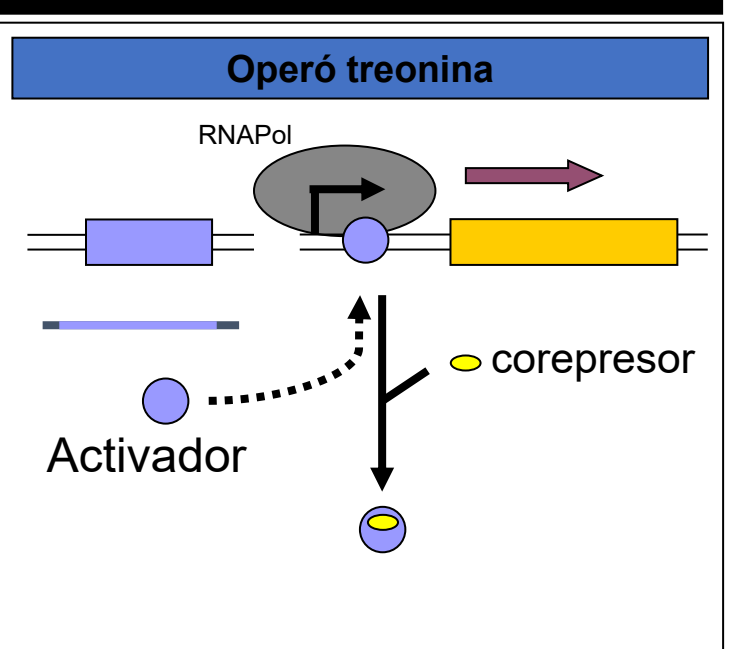


CONTROL POSITIU
PER INDUCCIÓ



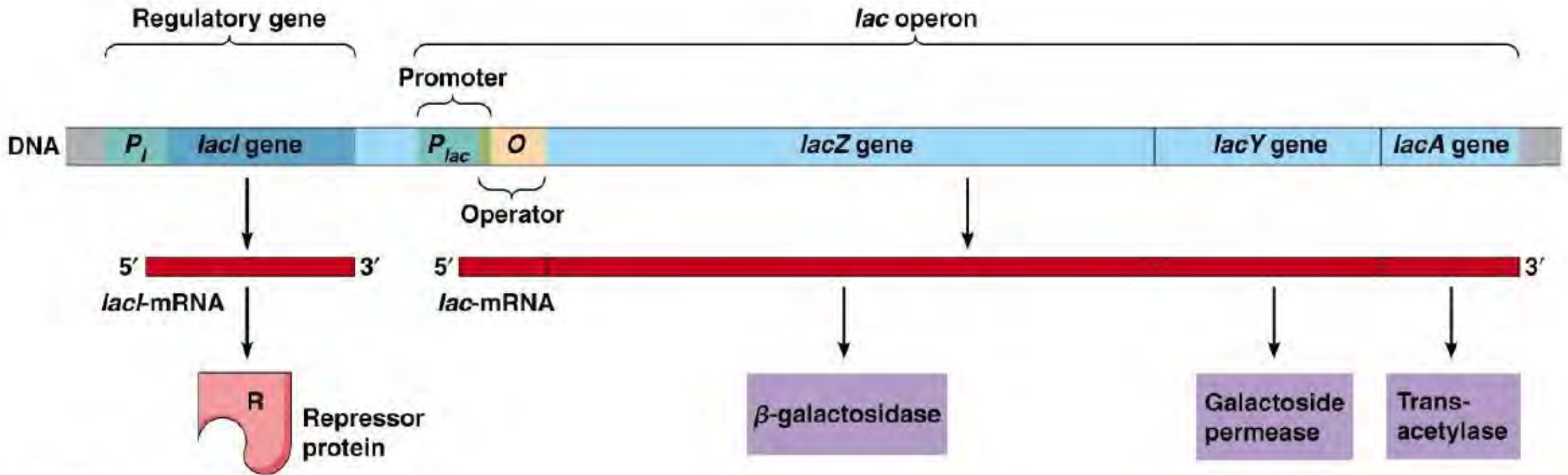
REPRESSIÓ
Co-repressor

CONTROL NEGATIU
PER REPRESSIÓ

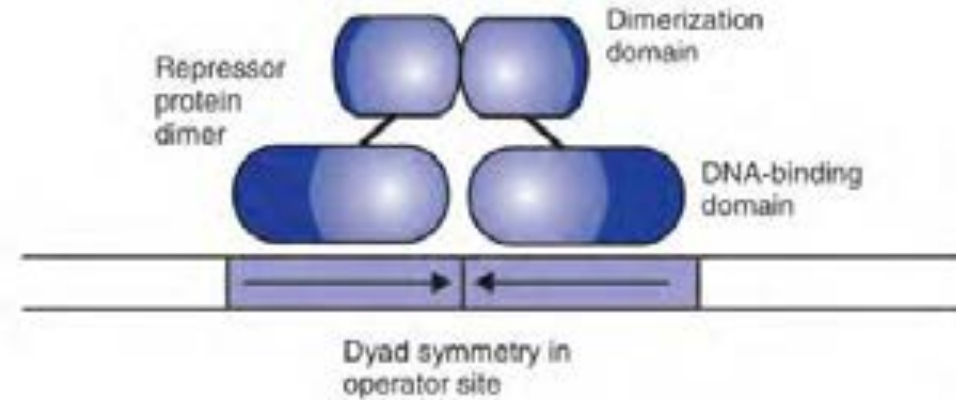
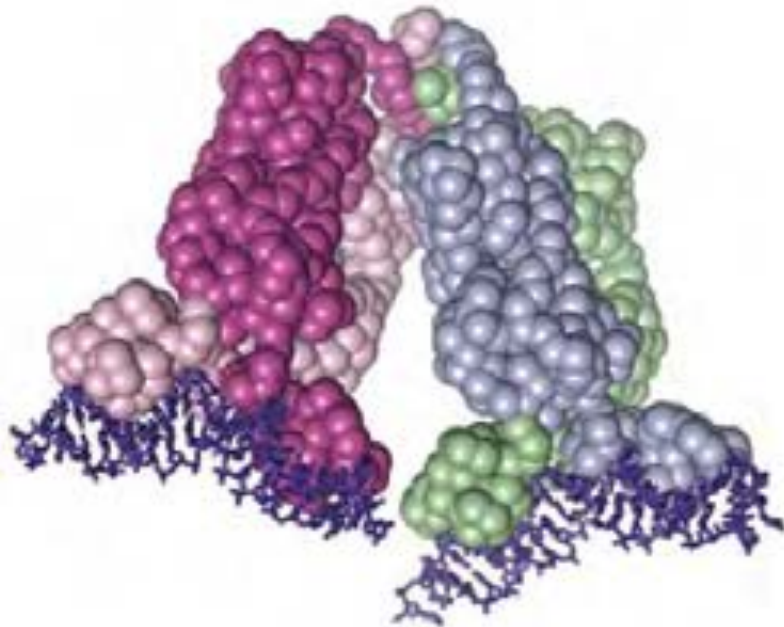
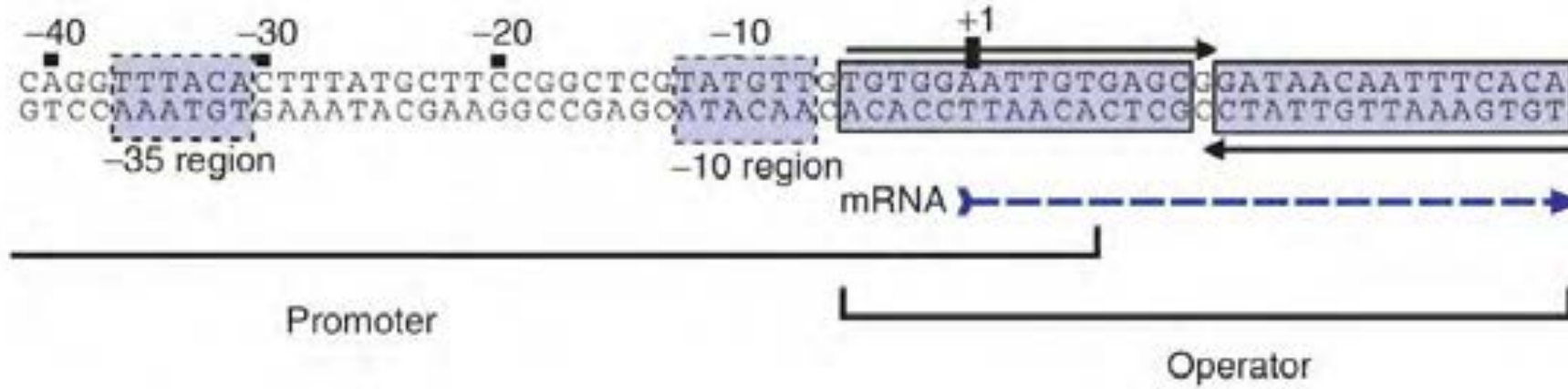


CONTROL POSITIU
PER REPRESSIÓ

OPERÓ LACTOSA

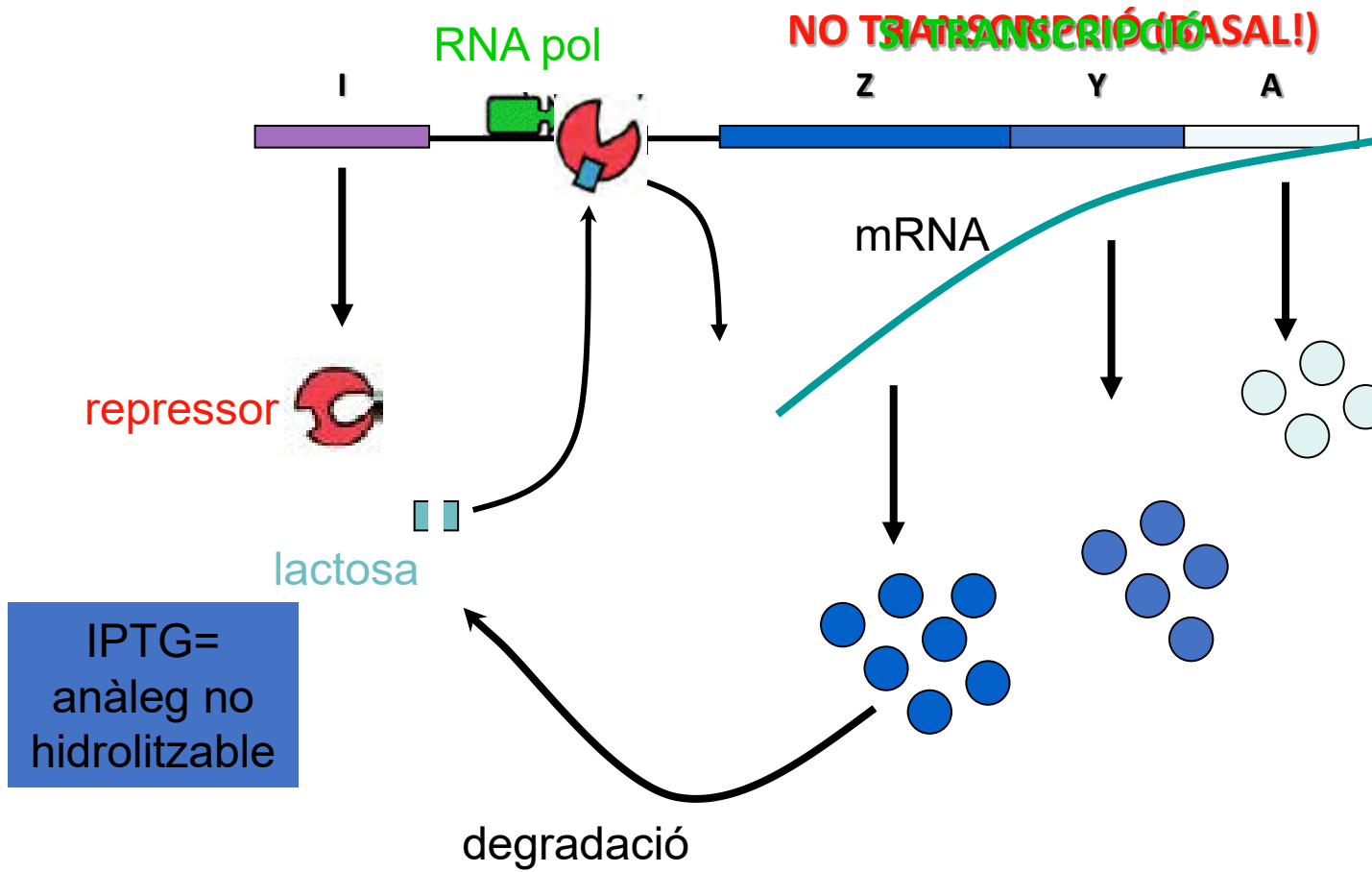


REPRESOR LacI





Funcionament

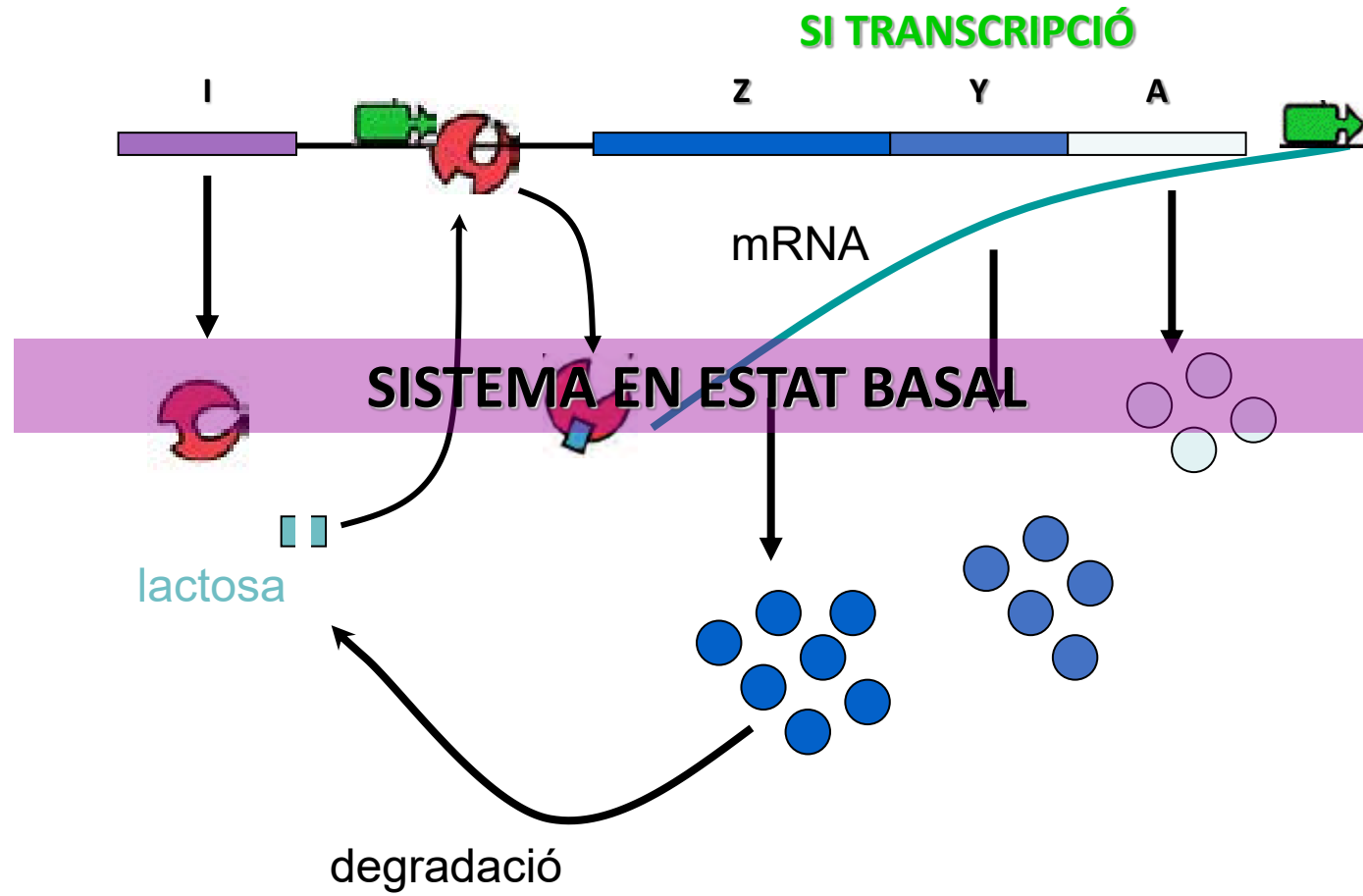


Jacob and Monod (1965)





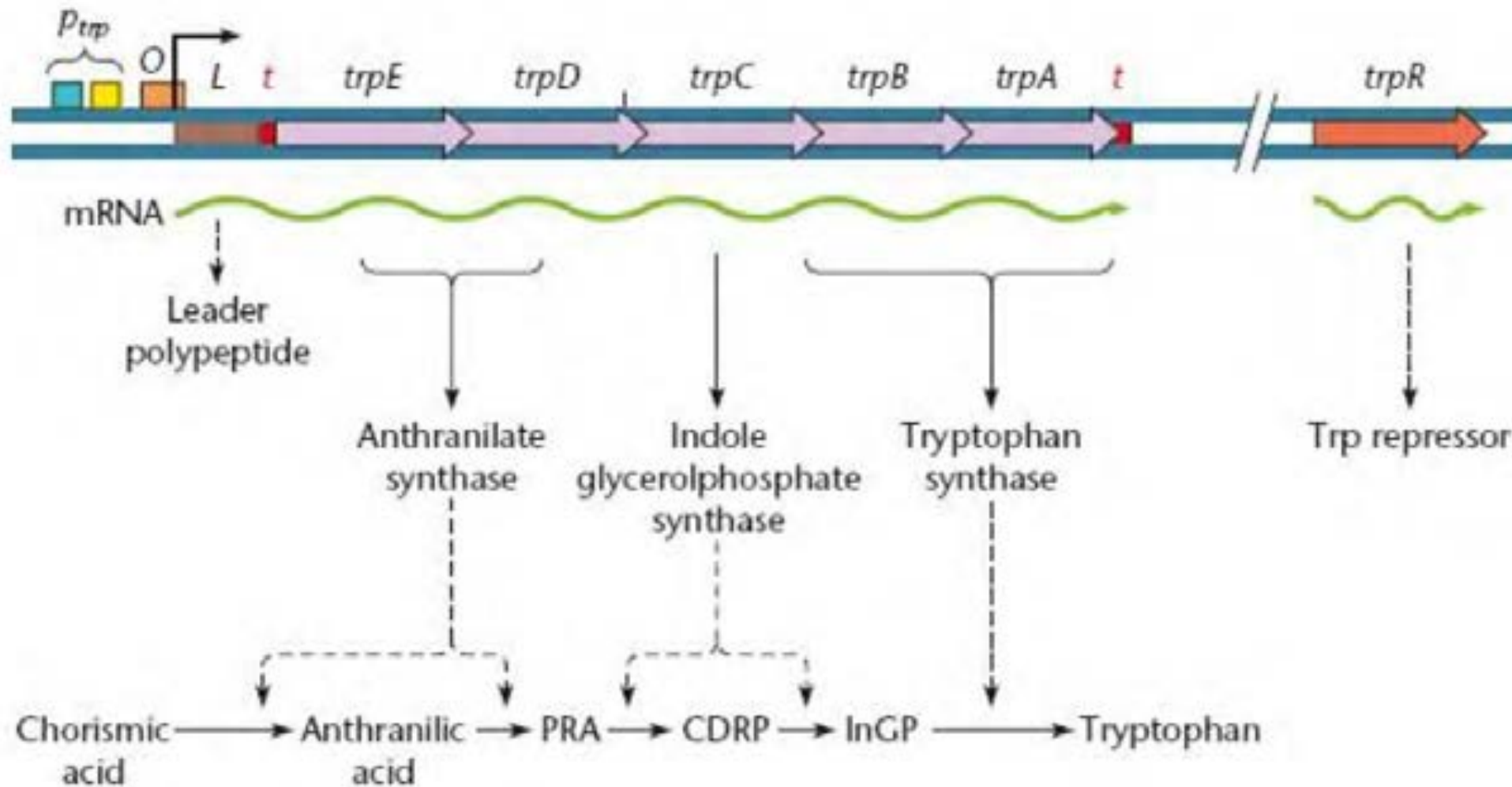
Funcionament



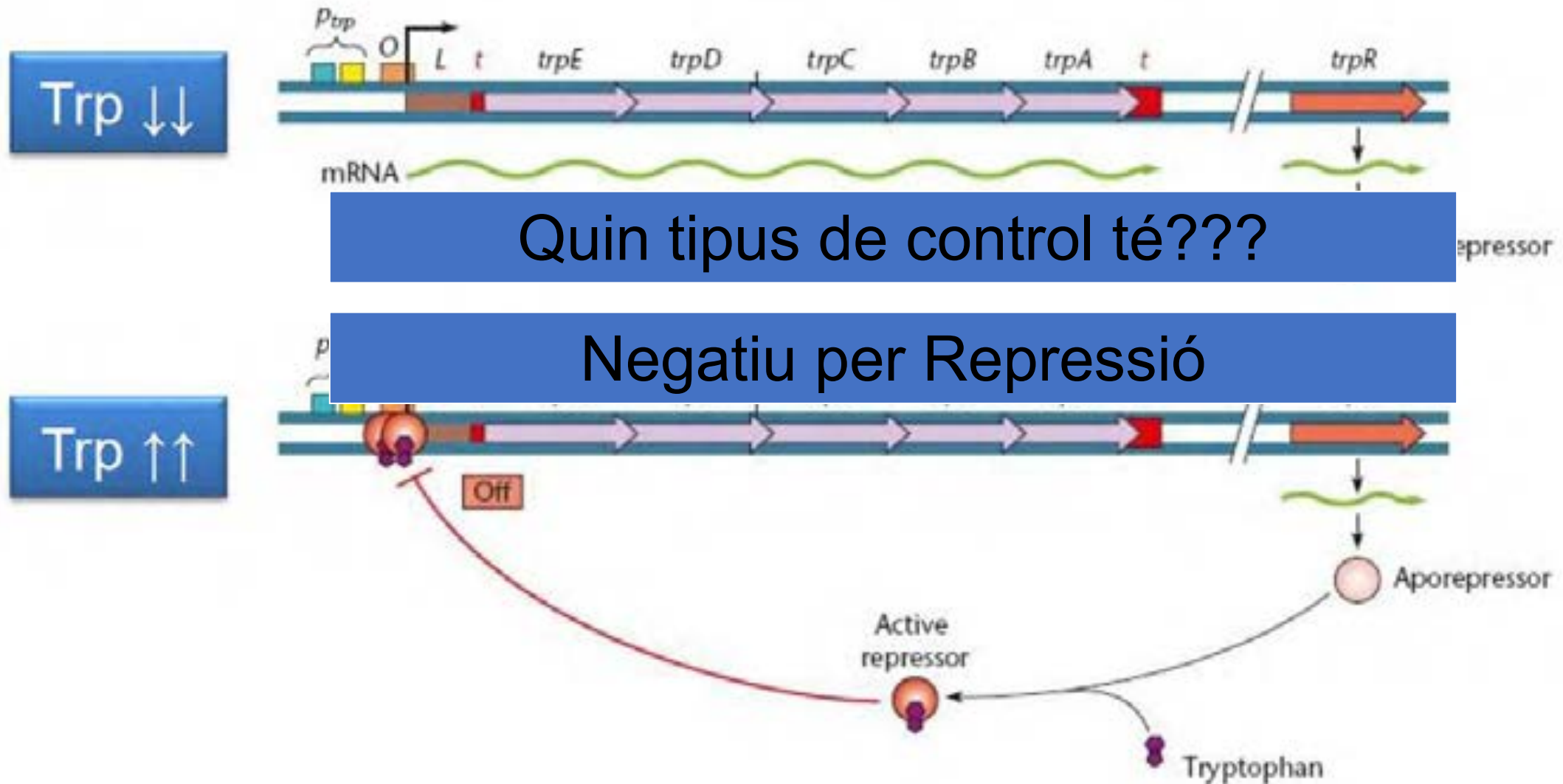
<https://phet.colorado.edu/en/simulations/gene-machine-lac-operon>



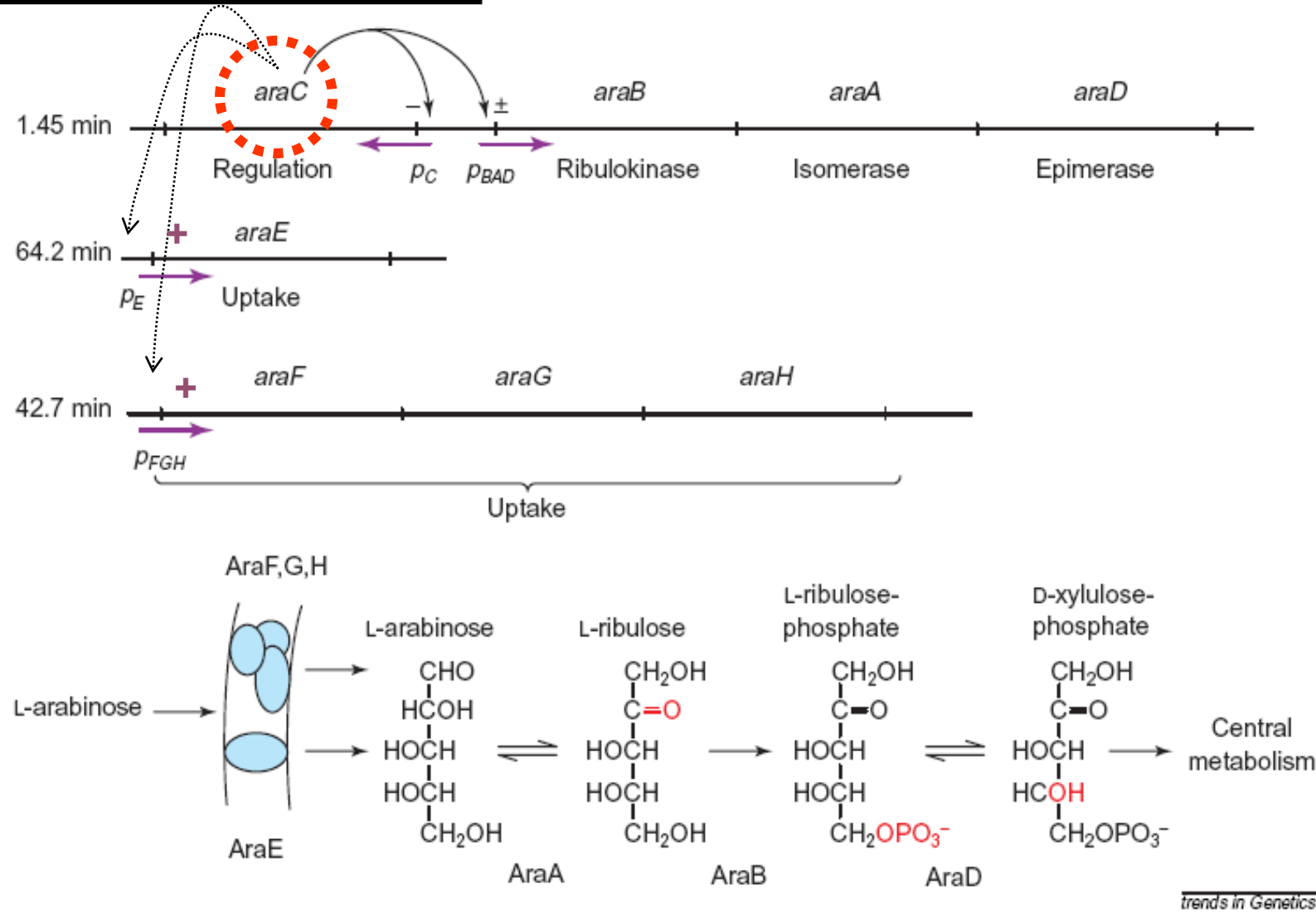
OPERÓ TRIPTÒFAN



OPERÓ TRIPTÒFAN



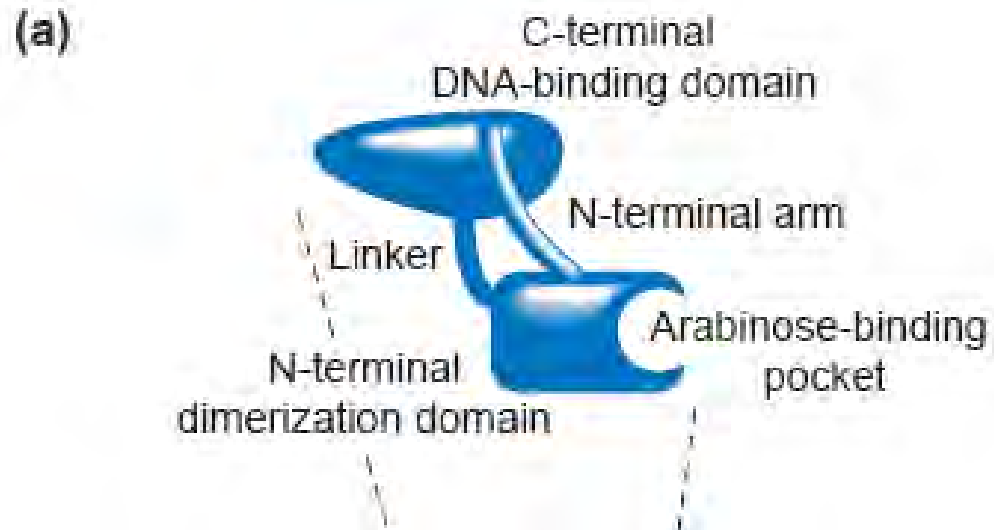
OPERÓ ARABINOSA



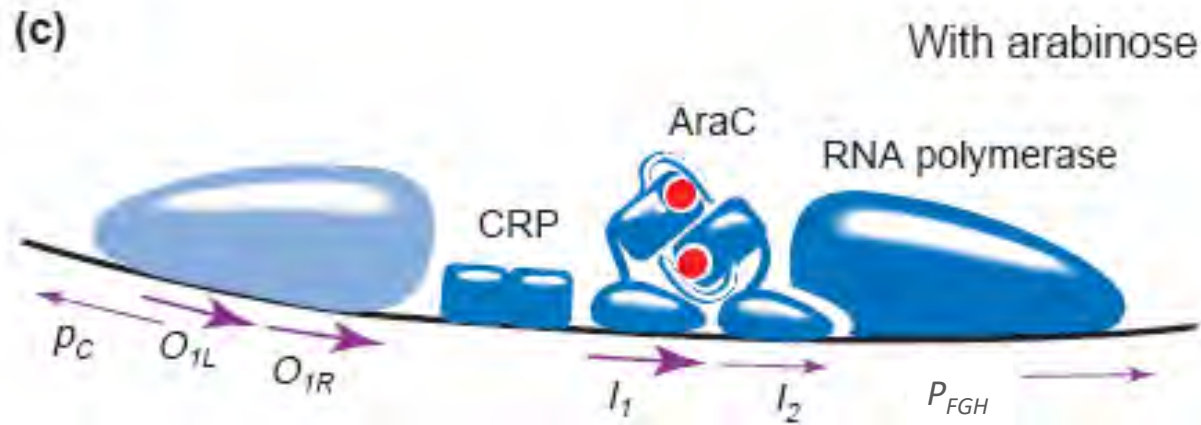
The genes required for the uptake and catabolism of L-arabinose in *Escherichia coli*, the operon structures, their approximate locations on the 100-minute circular genetic map, and the intermediates of the pathway and the steps catalyzed by the products of the *ara* operon gene products. AraC acts positively (induction) and AraB acts negatively (repression).

OPERÓ ARABINOSA

AraC



Amb Arabinosa

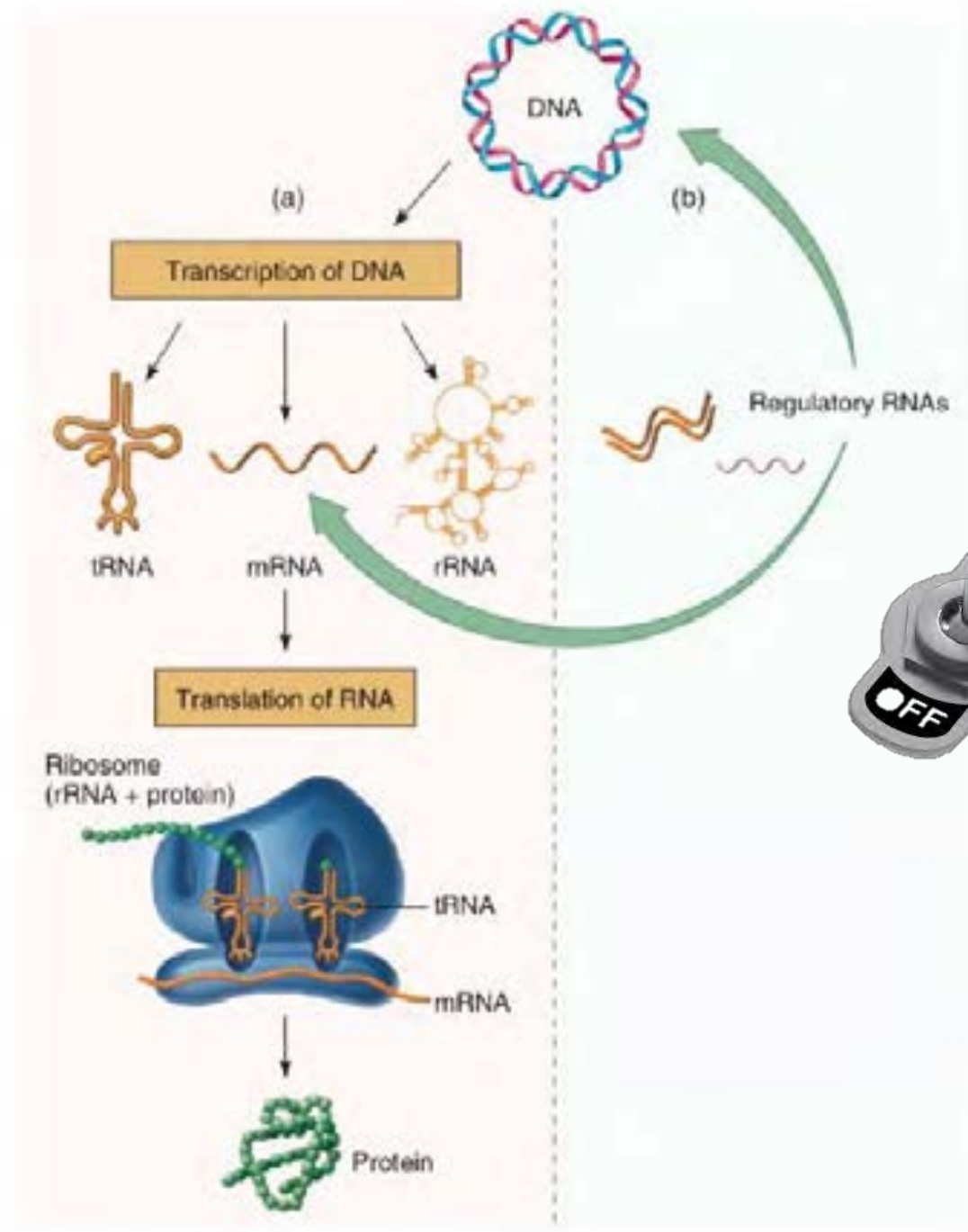


Inducció del sistema

Control transcripcional



Control Traduccional



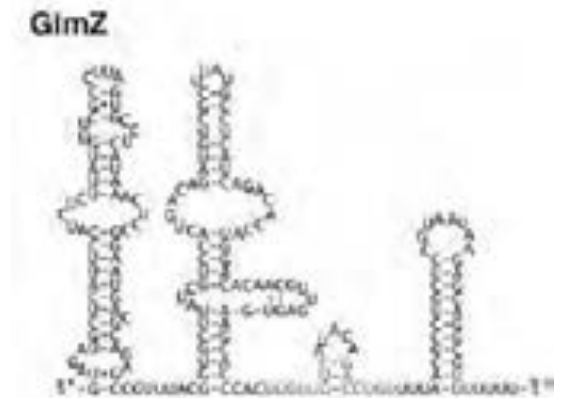
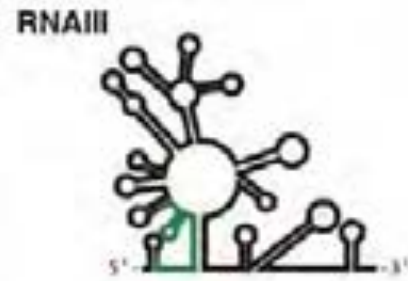
Control post-transcripcional





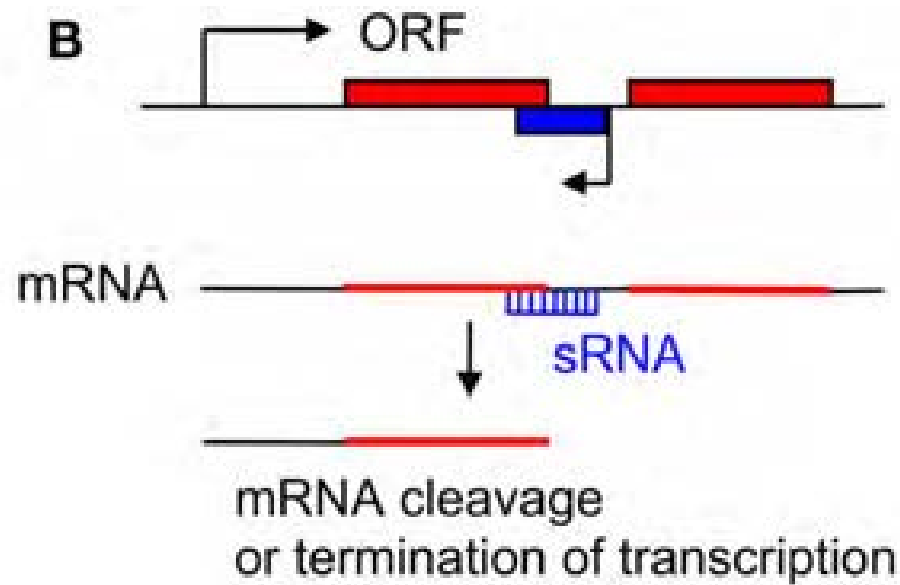
Small RNAs (sRNAs)

Segons interacció poden tenir tant un efecte positiu com negatiu

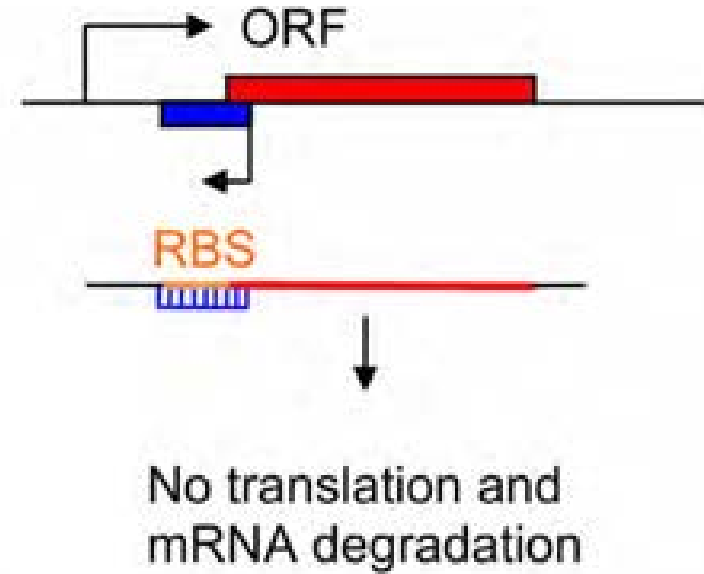




Mecanismes d'acció



Frontiers in Microbiology | Cellular and Infection Microbiology



May 2011 | Volume 2 | Article 501

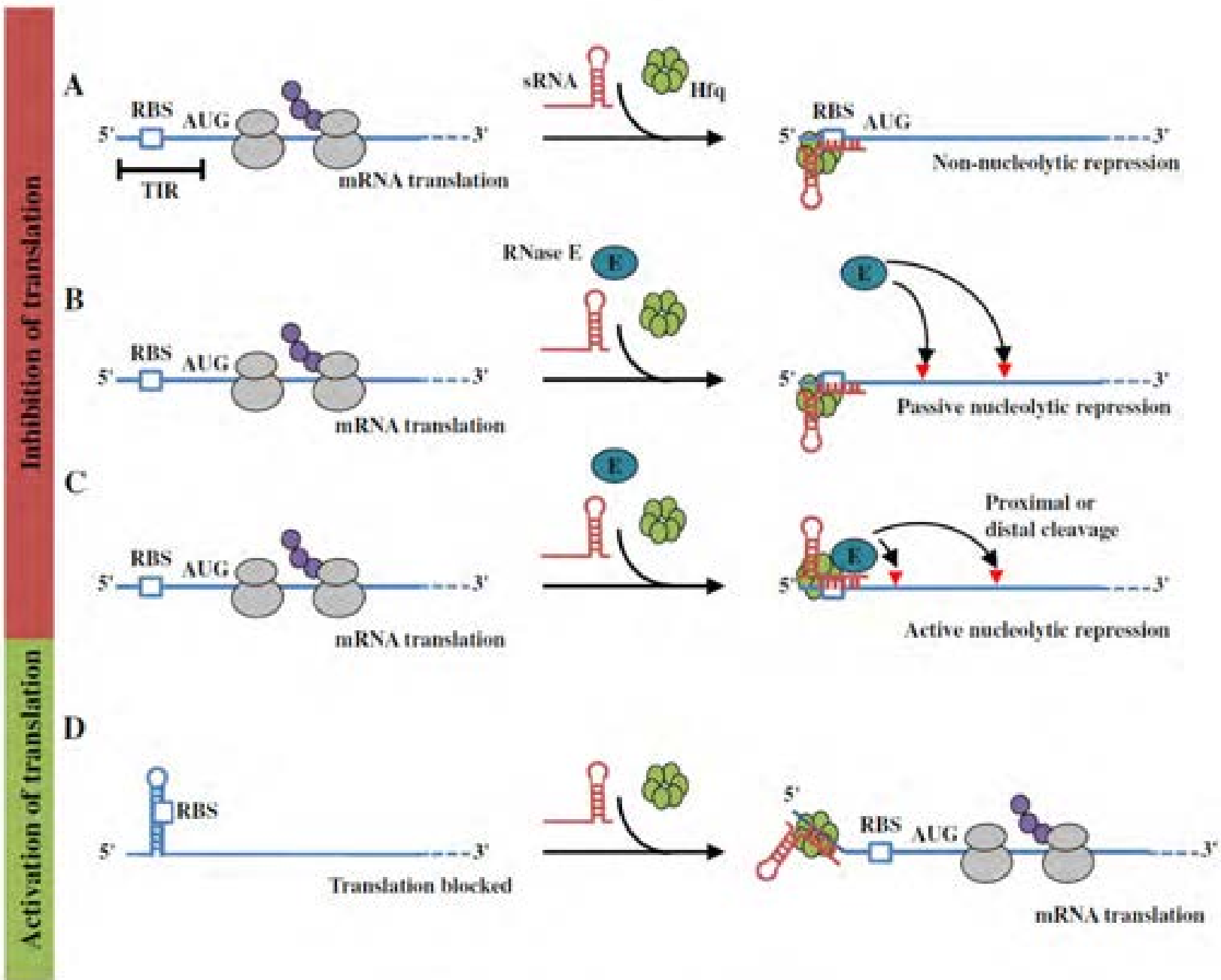
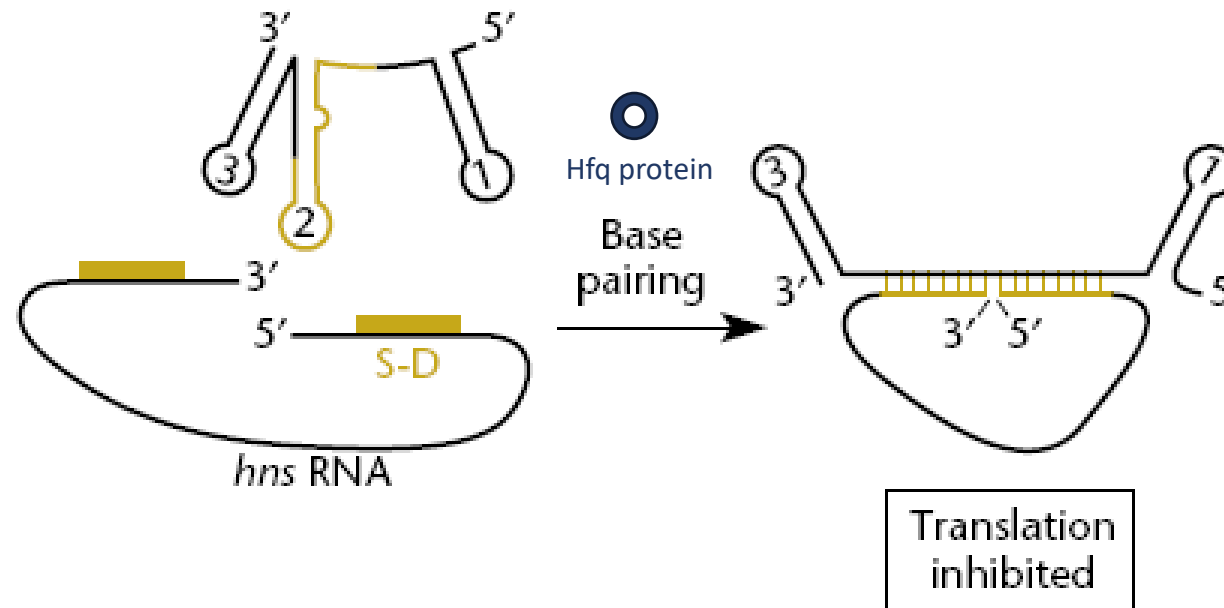


Fig. 1. Small RNA-based regulatory mechanisms of mRNA expression.

sRNA's

REGULACIÓ NEGATIVA

I. DsrA RNA

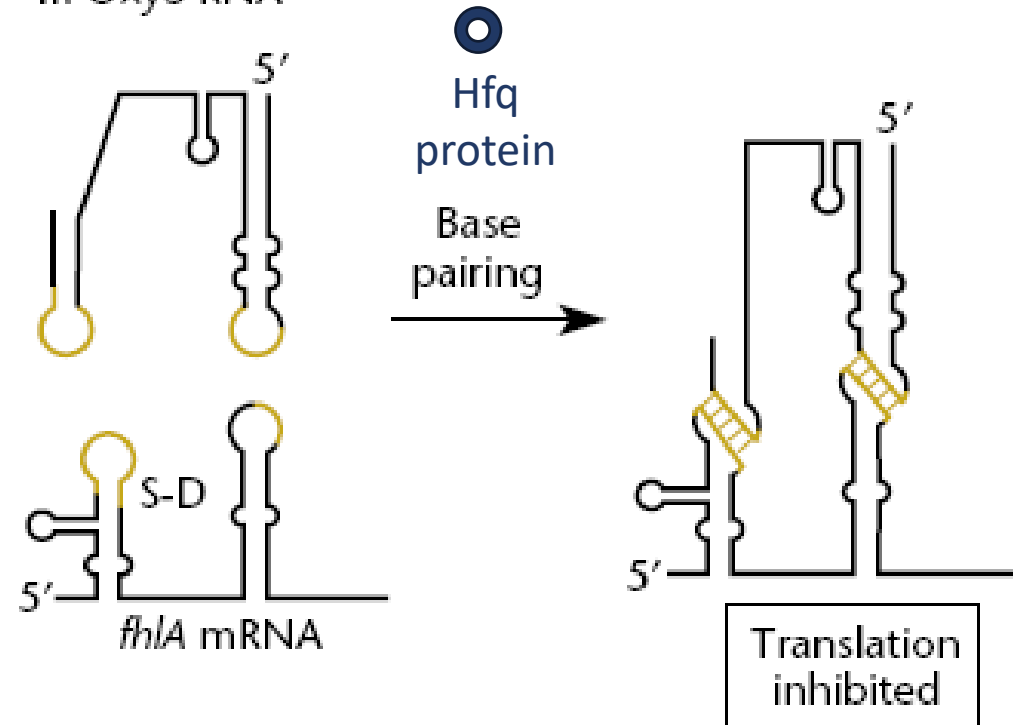


Fent inaccessible la regió del RBS en el mRNA

sRNA's

REGULACIÓ NEGATIVA

II. OxyS RNA

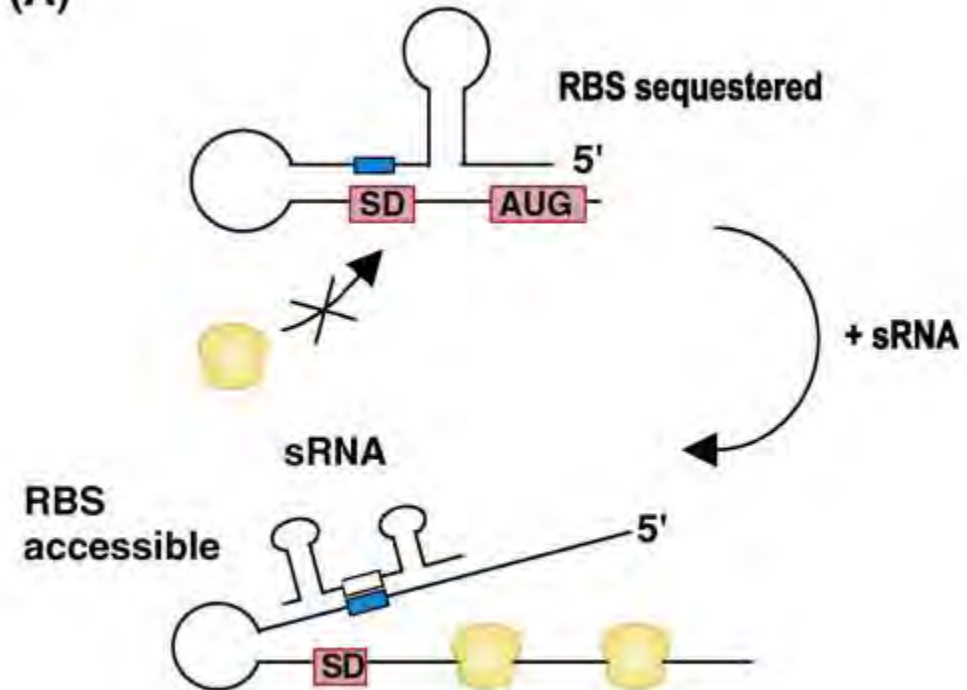


Estabilitzant estructures 2aries del mRNA regulat

sRNA's

REGULACIÓ POSITIVA

(A)



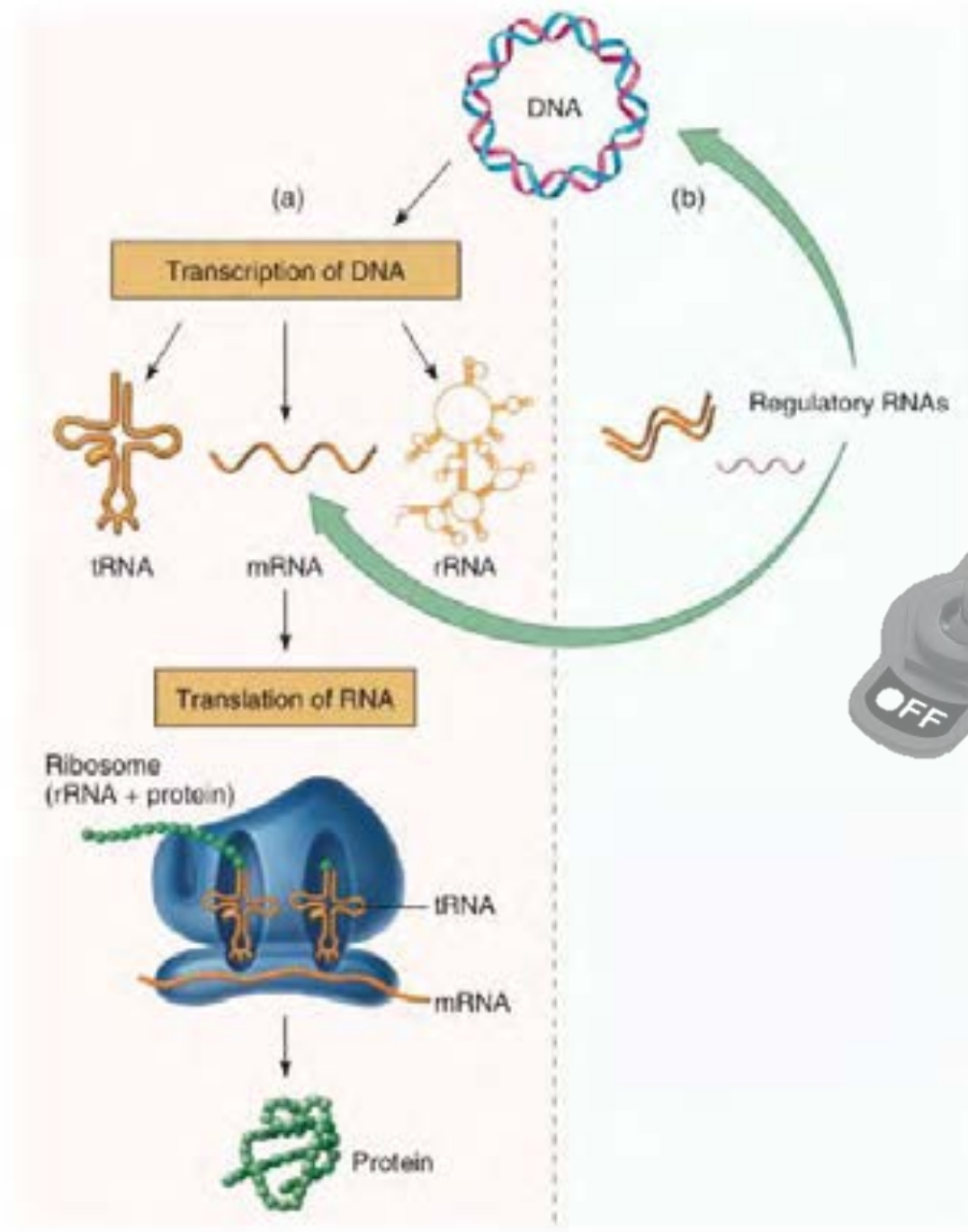
Current Opinion in Microbiology 2009, 12:674-682

Fent accessible la regió del RBS en el mRNA

Control transcripcional



Control Traduccional

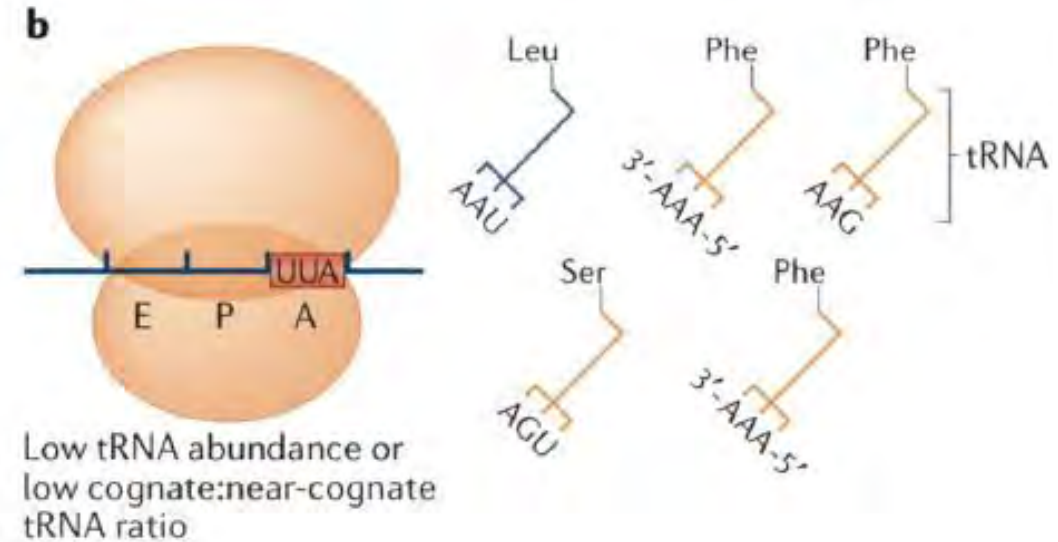
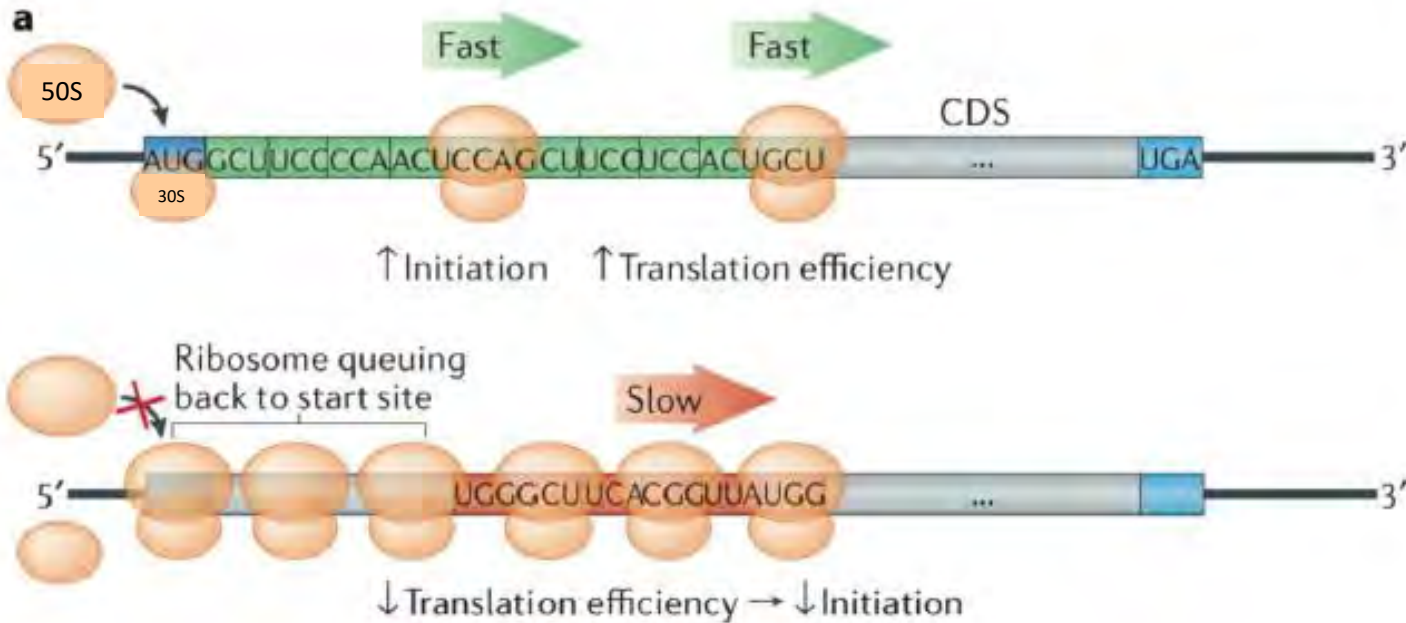


Control post-transcripcional



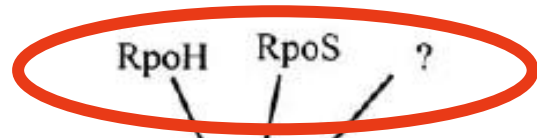


US DE CODÓ

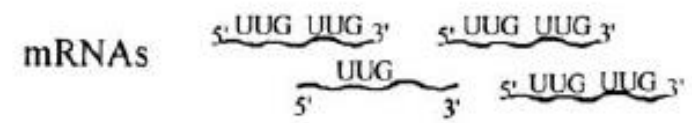
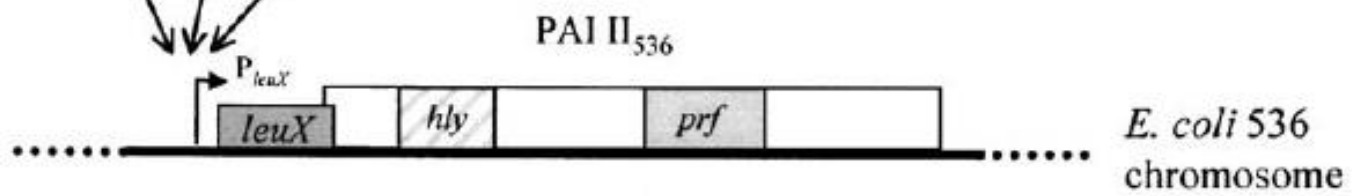


ADAPTAT DE *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2018) **19**, 20-30

La velocitat de traducció d'un gen depèn de la proporció que hi hagi de cada un dels diferents tRNAs corresponents i per tant del seu **US DE CODÓ**

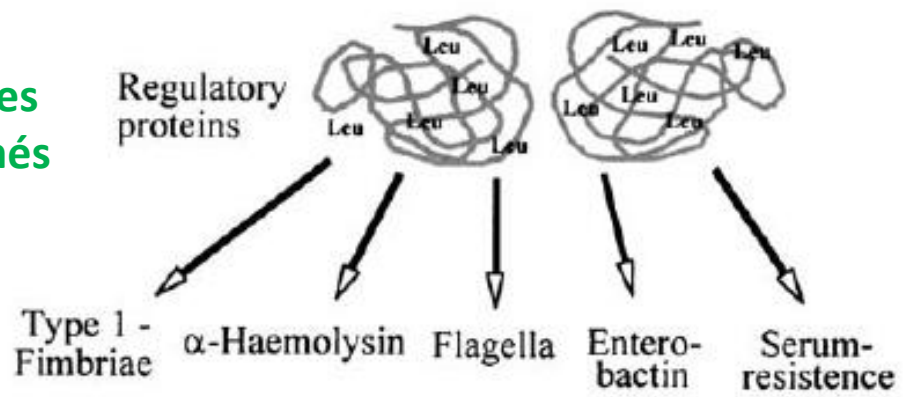


Reguladors transcripcionals que modulen l'expressió del tRNA amb l'anticodó poc "habitual"



L'increment d'expressió del tRNA permetrà l'augment de la traducció dels gens que contenen aquest codó

Controlant el promotor d'un gen es regula tota una resposta a un o més d'un estímul



in vivo Pathogenicity

Table 1. Examples of tRNA-dependent gene expression in bacteria

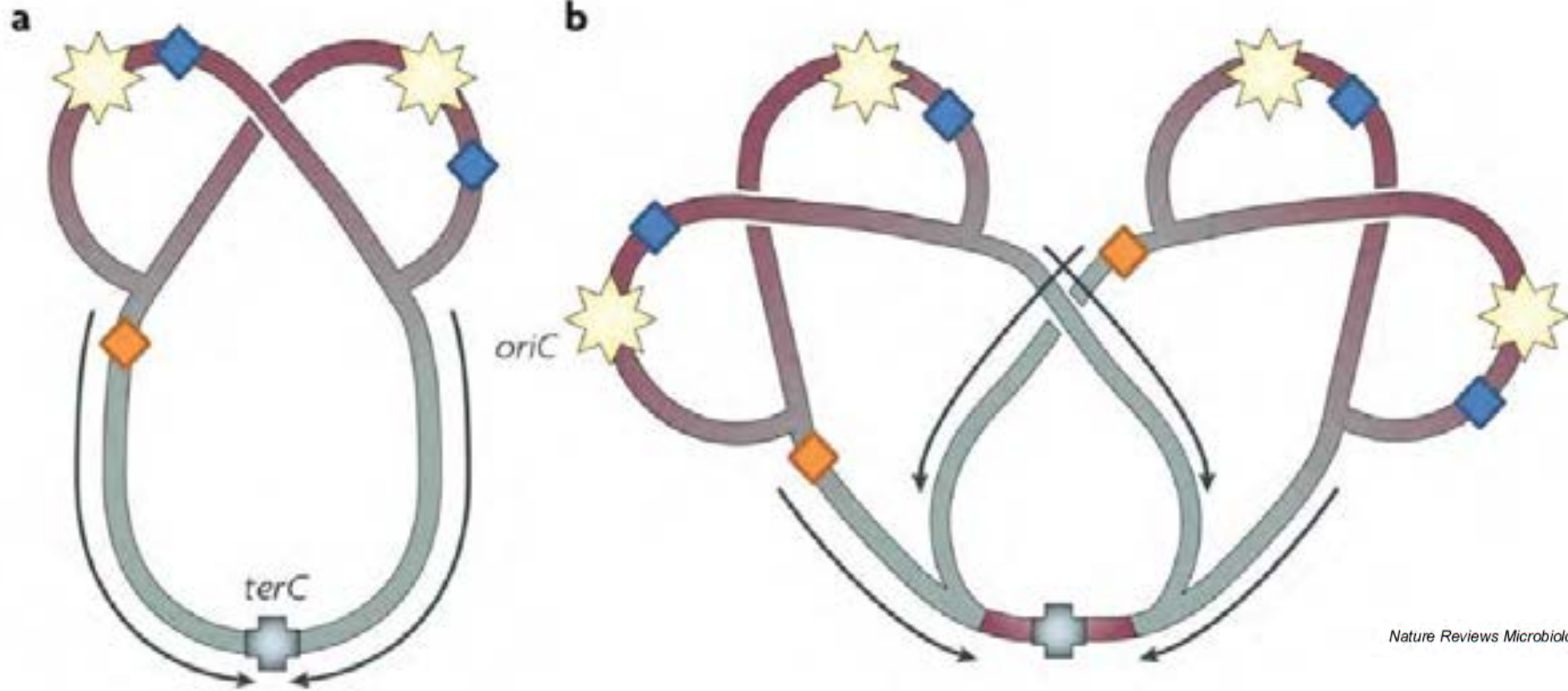
| Function | Organism | Codon | Amino acid specificity |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------|
| Photosynthesis | <i>Rhodobacter capsulatus</i> | GCU | Ala |
| | | GUC | Val |
| Fructose utilization | <i>R. capsulatus</i> | AAU | Asn |
| | | UGU | Cys |
| Production of acetone and butanol | <i>Clostridium acetobutylicum</i> | ACG | Thr |
| Production of aerial mycelium, conidiospores and antibiotics | <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2), <i>S. lividans</i> , <i>S. alboniger</i> | UUA | Leu |
| Expression of type 1-fimbriae | <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> | UCU | Ser |
| | | AGA AGG | Arg Arg |
| Global gene expression | <i>Escherichia coli</i> | AGA AGG | Arg Arg |
| Expression of type 1-fimbriae-, enterobactin and flagella, serum resistance, virulence | <i>E. coli</i> 536 (uropathogenic) | UUG | Leu |
| Persistence in stationary phase in cecal or bladder mucus of CD-1 mice | <i>E. coli</i> F-18, <i>E. coli</i> 536 | UUG | Leu |
| Cell division | <i>E. coli</i> | UCA | Ser |
| | | UCG | Ser |
| | | CUA | Leu |
| | | UUG | Leu |
| DNA-Replication | <i>E. coli</i> | AGA | Arg |
| Resistance to calmodulin-inhibitor | <i>E. coli</i> | CUA | Leu |
| Temperature sensitivity | <i>E. coli</i> | CUA | Leu |
| Production of protease and syringomycin | <i>Pseudomonas syringae</i> | AUG | Met |
| | | CUU | Leu |
| | | CUC | Leu |
| Virulence | <i>Shigella flexneri</i> | CUG UAC | Leu |
| | | UAC | Tyr |



Altres mecanismes de control



POSICIÓ EN EL GENOMA

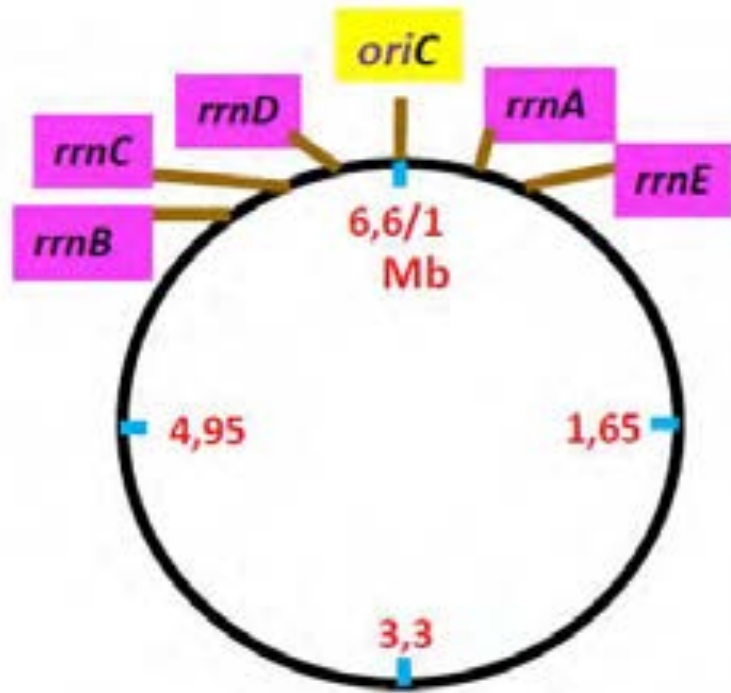


Nature Reviews Microbiology (2009) 7, 822-827

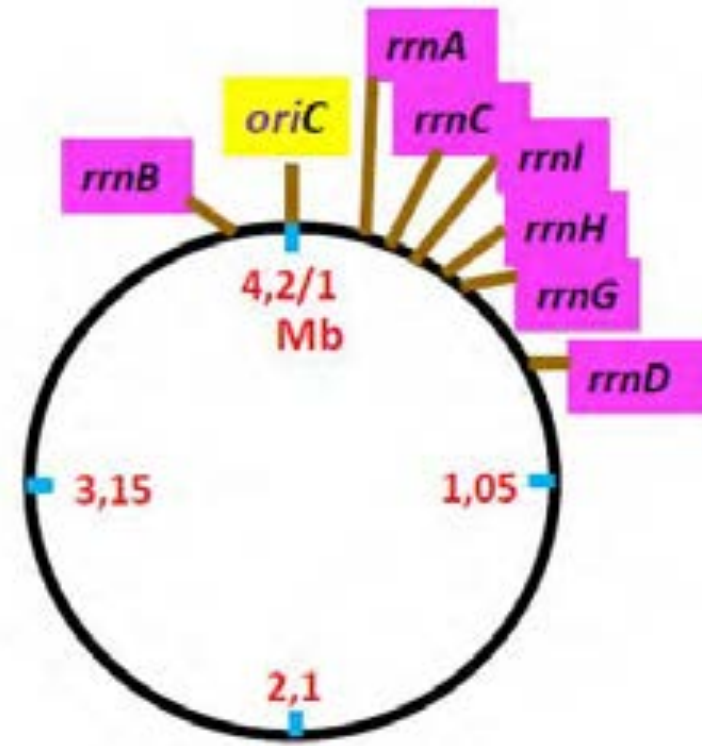
Segons la proximitat al OriC pot variar el nombre de còpies



NOMBRE DE CÒPIES D'UN GEN



Pseudomonas aeruginosa



Bacillus subtilis

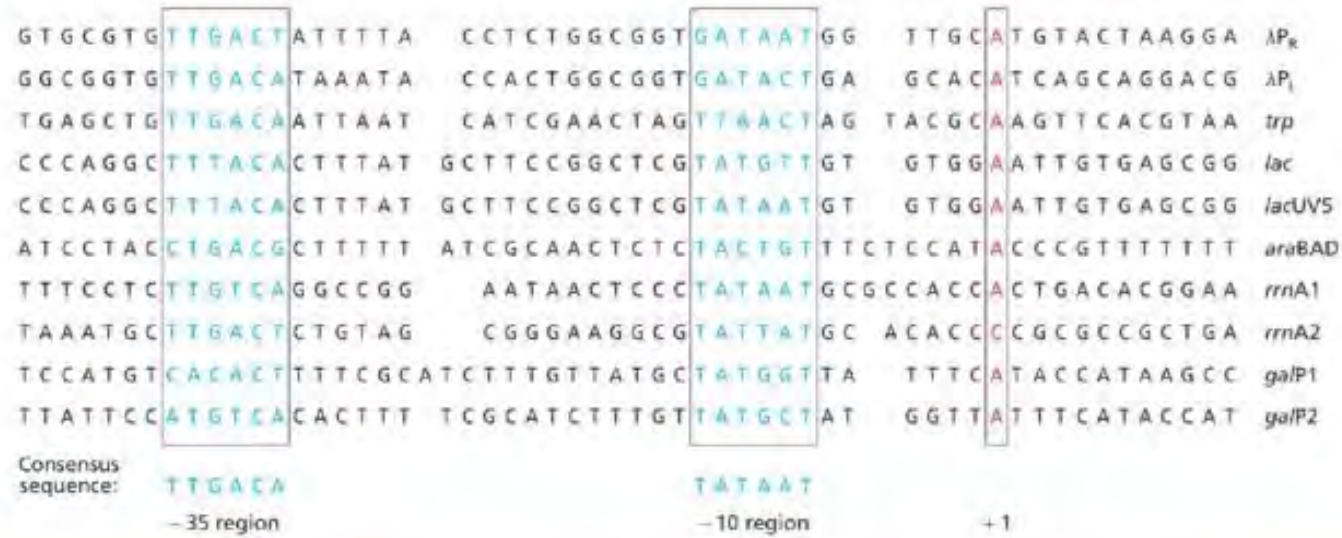
El nombre de còpies també fa variar l'expressió gènica



PROMOTOR



PROMOTORS BACTERIANS



Moore, Terrian, *Comparative & Functional Genomics of Bacteriophage*, 2011 (2012)

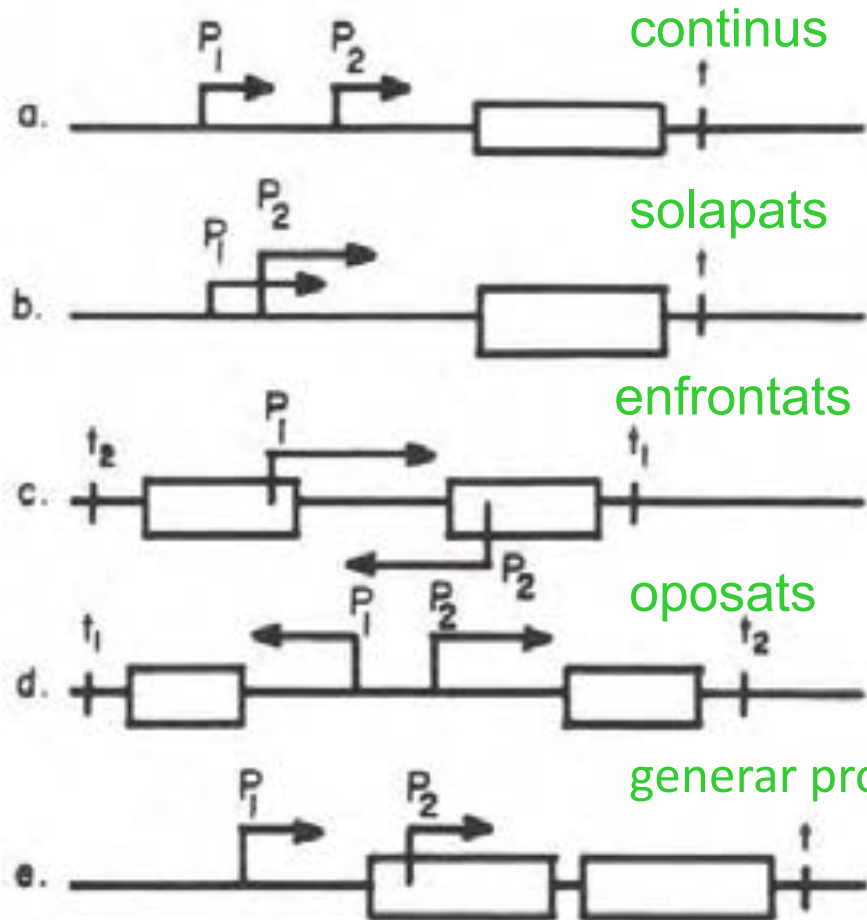
No tots els promotors tenen la mateixa seqüència

L'afinitat de la RNA polimerasa serà diferent!!!





PROMOTOR



Pot existir més d'un promotor en la mateixa regió

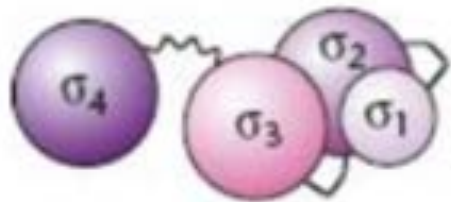


Incrementar els mecanismes de regulació i modulació de la expressió gènica



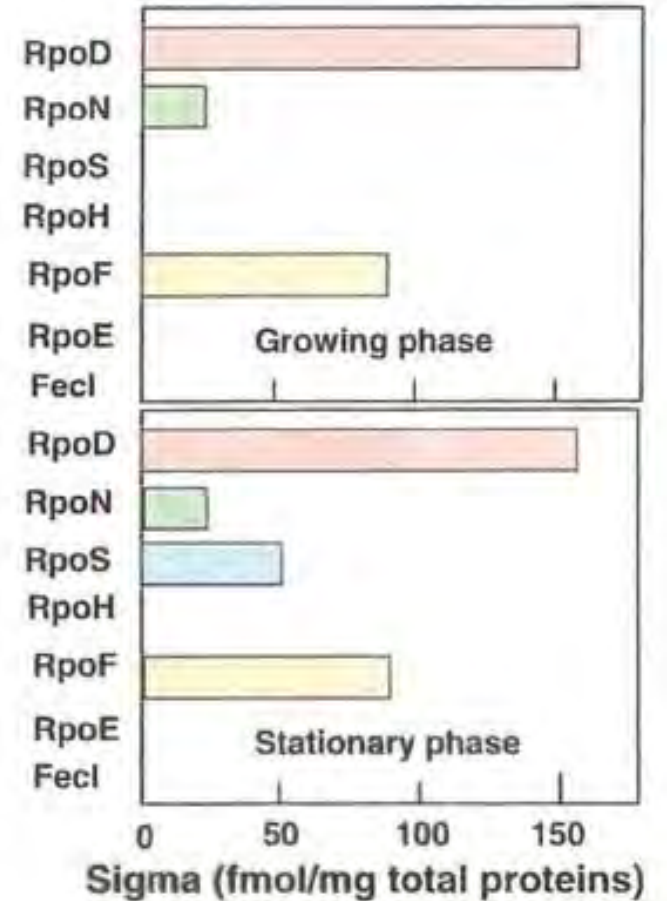
PROMOTOR

σ

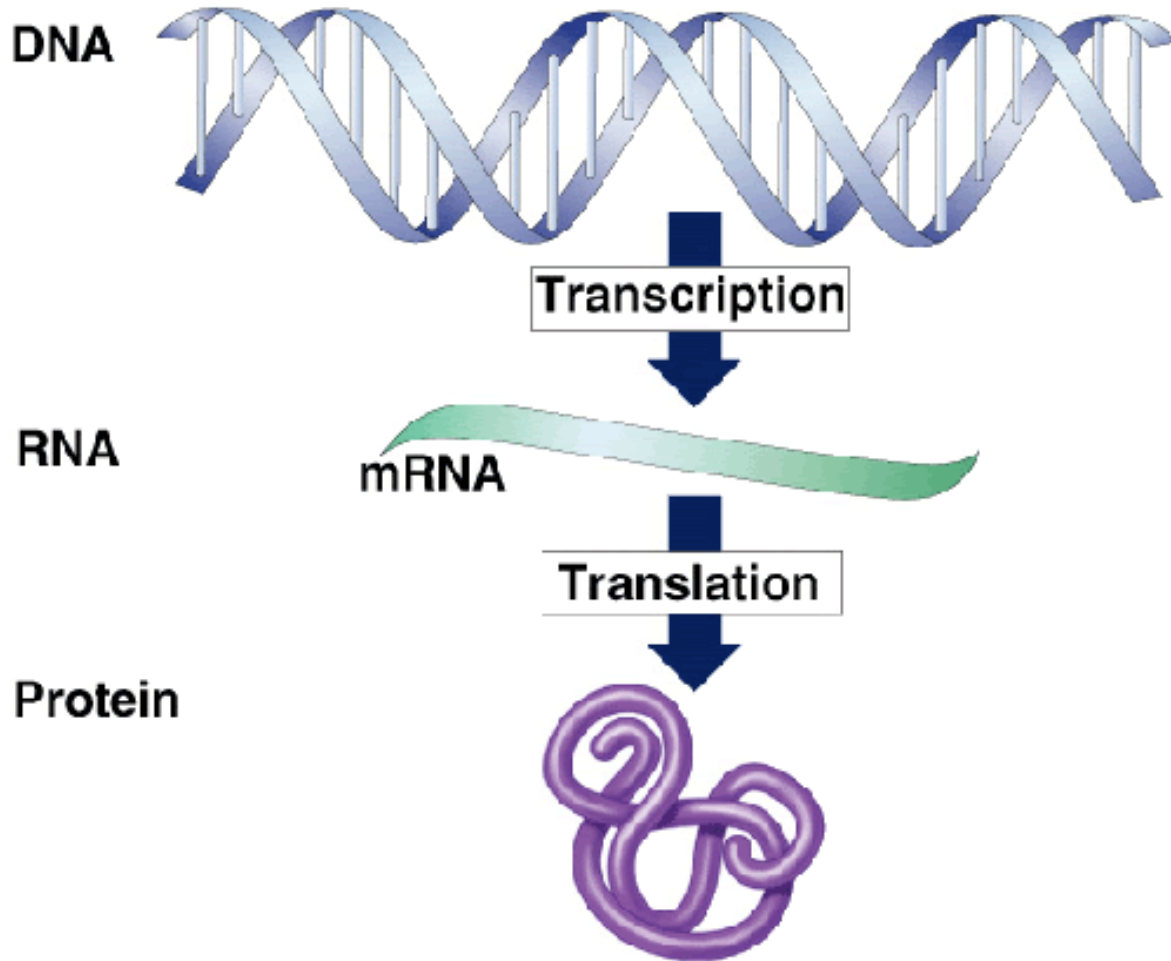


Intracellular Concentrations of RNA Polymerase Sigma Subunits in *Escherichia coli* W3110

| Sigma subunit | Genes under the control of each sigma |
|------------------|------------------------------------------------------|
| RpoD (613 aa) | Growth-related genes (~1,000) |
| RpoN (477 aa) | Nitrogen-regulated/stress response genes (~15) |
| RpoS (330 aa) | Stationary phase/stress response genes (~100) |
| RpoH (284 aa) | Heat shock/stress response genes (~40) |
| RpoF (239 aa) | Flagella-chemotaxis genes (~40) |
| RpoE (202 aa) | Extreme heat shock/extracytoplasmic genes (~5) |
| FecI (173 aa) | Ferric citrate transport/extracytoplasmic genes (~5) |



ALGUNS DELS POSSIBLES PUNTS DE REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA



- ✓ Dosi gènica
- ✓ L'afinitat de la RNAP pel promotor
- ✓ Control del promotor per reguladors transcripcionals

- ✓ Estabilitat del mRNA
- ✓ La seqüència RBS
- ✓ L'accessibilitat al RBS
- ✓ Control per sRNAs
- ✓ L'ús de codó

- ✓ L'estabilitat de la proteïna
- ✓ Múltiples modificacions post-transcripcionals que modifiquen la proteïna i per tant la seva funcionalitat





tivall



Susana.Campoy@uab.cat