

Small RNAs in bacteria

Discovered in 1981

Synthesized as discrete transcripts
with dedicated promoters and terminators

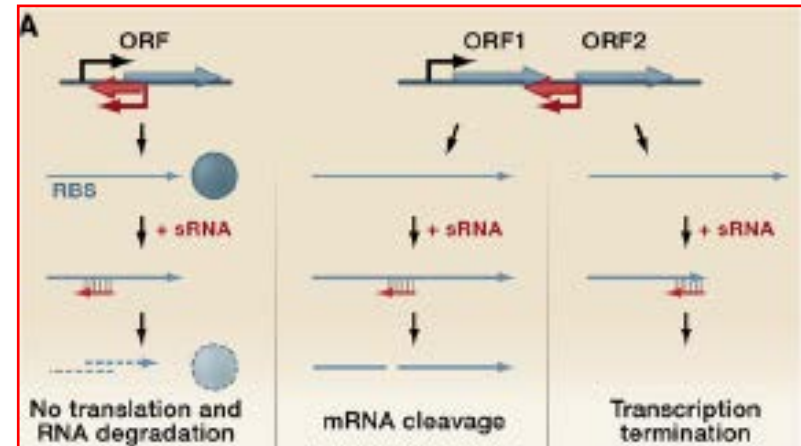
Act as regulators through base pairing with mRNAs

Piccoli RNA come molecole regolatrici nei procarioti

- Identificati in numerosi batteri molecole di **RNA non codificanti** di piccole dimensioni 40-500 nucleotidi
- La maggior parte implicati nel controllo del processo di traduzione mediante appaiamento con la regione leader del mRNA del gene bersaglio
- Possono essere o complementari a mRNA del gene bersaglio ma trascritti sull'altra elica, (RNA cis) oppure trascritti in altri siti ma con forte omologia per la sequenza bersaglio (Rna trans)
- **Le interazioni RNA-RNA** (in genere negli RNA trans) favorite da una proteina molto abbondante chaperon degli RNA definita **Hfq**

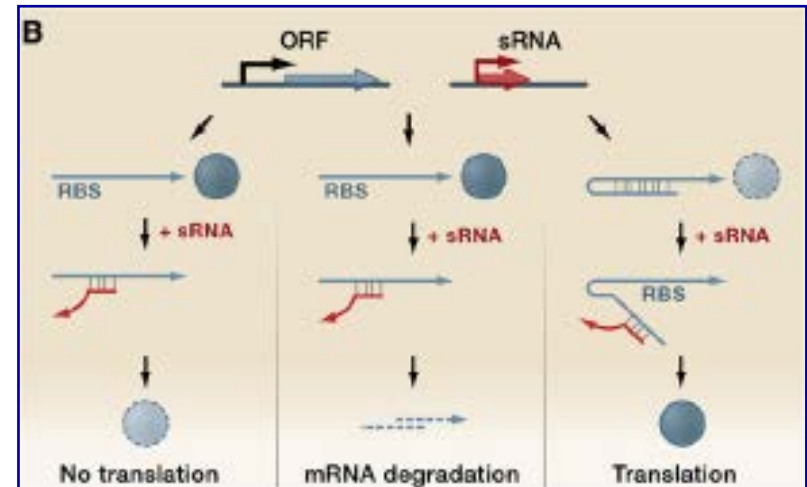
Cis encoded sRNAs

- are encoded on the DNA strand opposite the target RNA
- share extended regions of complete complementarity

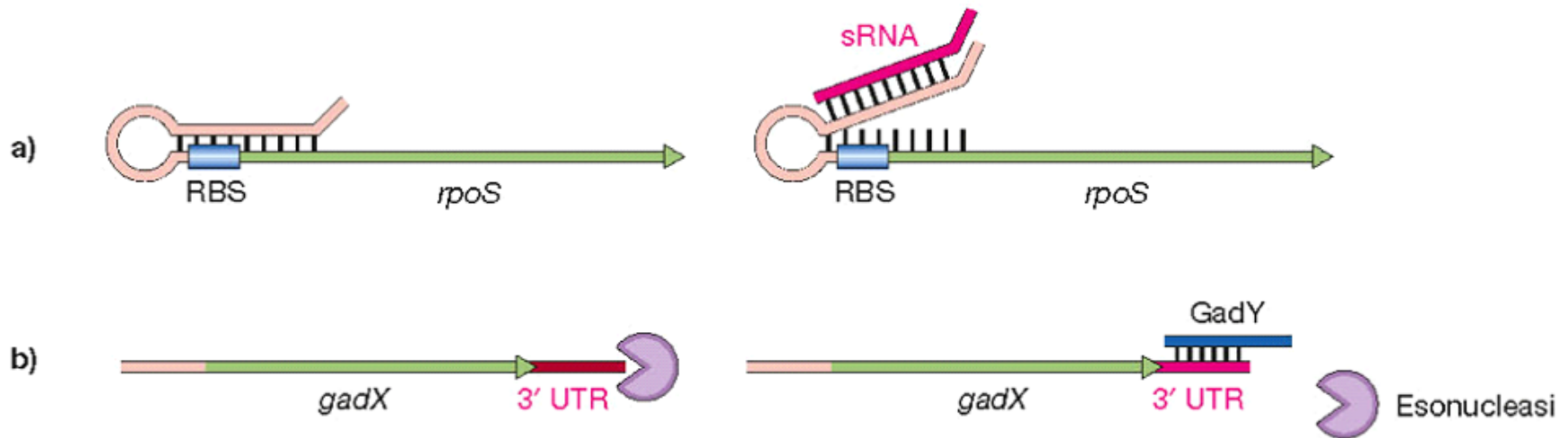


Trans encoded sRNAs

- are encoded far from their targets
- share only limited complementarity with their target mRNAs
- require RNA chaperones to facilitate the RNA-RNA interactions.



Regolazione positiva mediata dai piccoli RNA

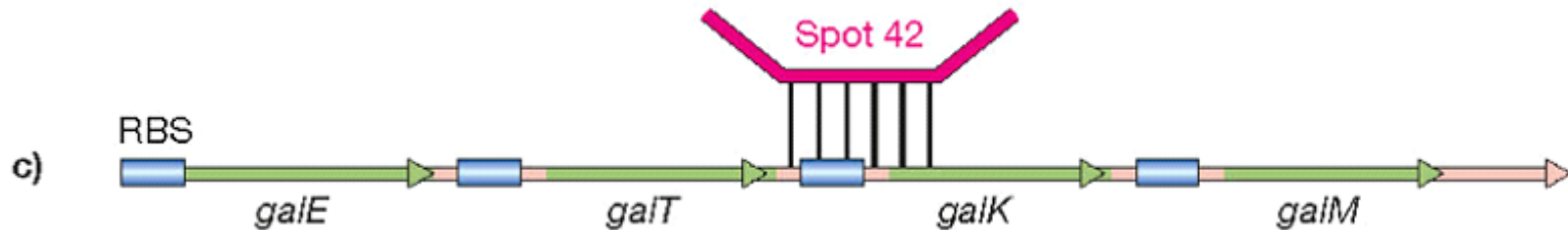


a) Nel caso del trascritto per gene *rpoS* che codifica per σ^s (sigma che attiva la trascrizione dei geni in fase stazionaria) il sito di legame dei ribosomi (RBS) forma una struttura secondaria con una regione di mRNA a monte impedendo così l'accesso ai ribosomi. Il legame di sRNA alla regione di appaiamento con la sequenza RBS apre la struttura permettendo la traduzione del mRNA σ^s .

b) *GadY* un piccolo RNA non codificante impedisce la degradazione del trascritto per *gadX* legandosi nella regione 3'UTR. Il sistema *gad* è importante per la sopravvivenza in stress acido.

Regolazione negativa mediata dai piccoli RNA

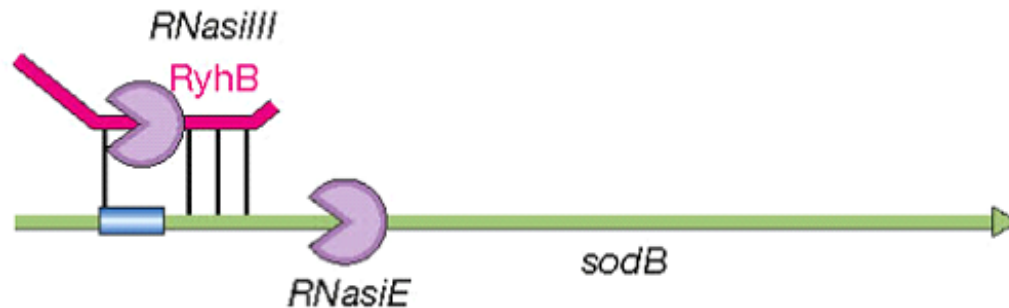
L'operone galETK



In presenza di glucosio un piccolo RNA Spot42 è espresso ad alto livello e si lega al sito d'inizio della traduzione del gene *galK* inibendone la traduzione.

In questo modo si destabilizza mRNA dell'intero operone trascritto dal Promotore P2. Si avrà una ridotta traduzione di *galT* mentre l'effetto su *galE* sarà minore in quanto è un enzima con funzione essenziale

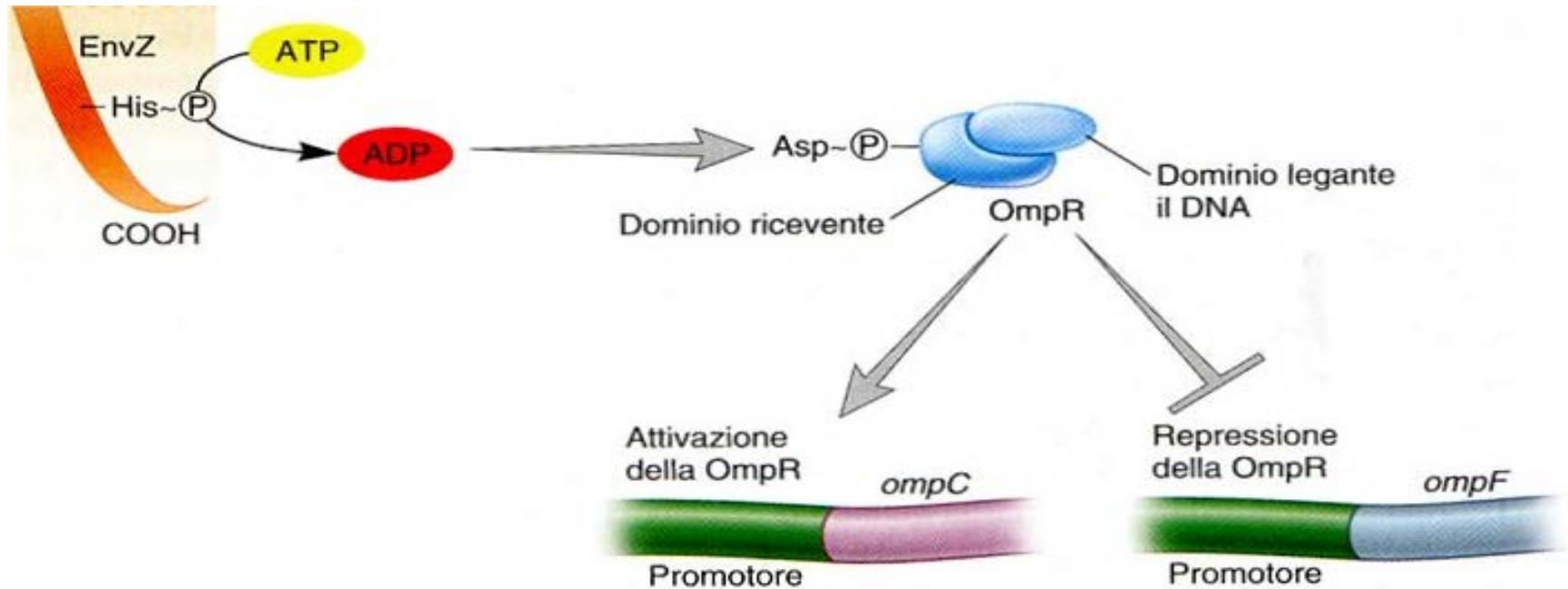
Controllo negativo mediato da RyhB



Il piccolo RNA RyhB

- è trascritto ad alta efficienza in in carenza di ferro
- si lega al mRNA del gene *sodB* favorendone la degradazione da parte della RNasi III
- viene a sua volta degradato da RNasi III

Sistema a 2 componenti : il regolatore OmpR

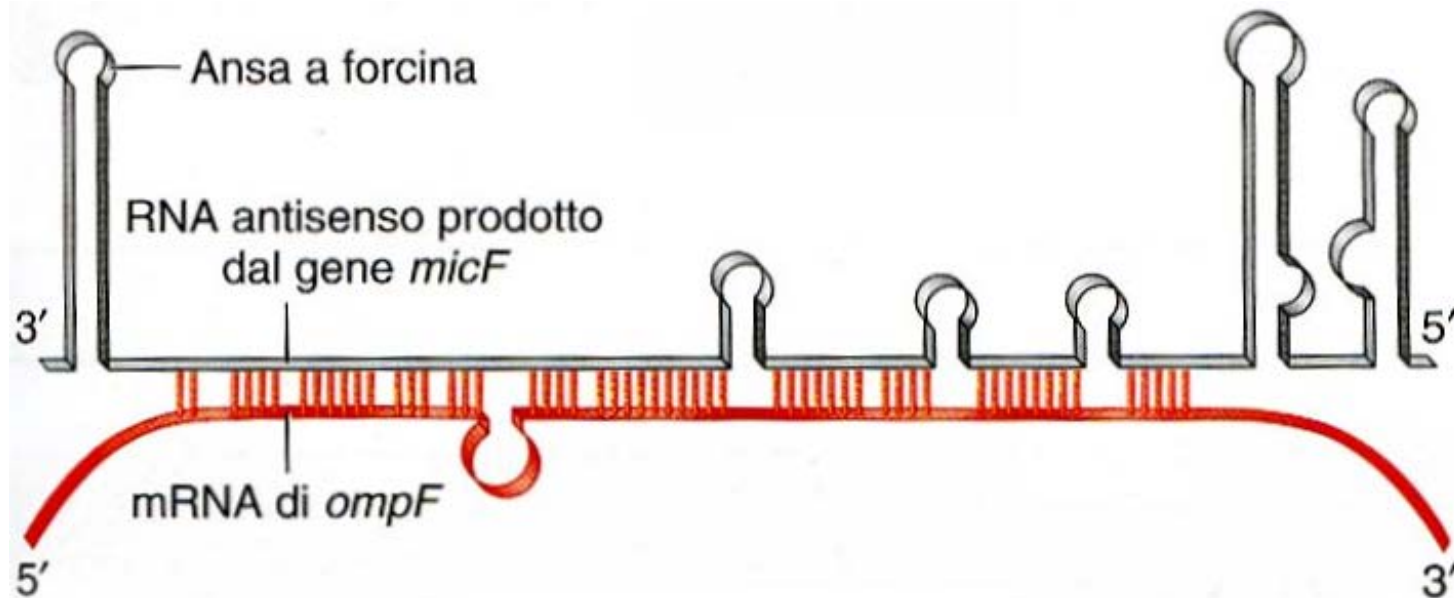


L'estremità N di OmpR è il dominio ricevente poiché possiede un residuo di acido aspartico che può essere fosforilato da EnvZ.

- A bassi livelli di osmolarità EnvZ è inattiva
- Ad alti livelli di osmolarità EnvZ si autofosforila su un residuo di istidina
- **EnvZ-P (hist-P) fosforila OmpR**
- **OmpR-P (asp-P) regola la trascrizione inibendo la trascrizione di *ompF* e attivando la trascrizione di *OmpC***

Controllo negativo da sRNA: regolazione della porina OmpF

Oltre alla proteina OmpR l'espressione del gene *ompF* è regolata da un RNA antisenso chiamato MicF (mRNA interfering complementary RNA).



RNA MicF è complementare alla sequenza d'inizio della traduzione del mRNA di *ompF*. Quando RNA MicF si appaia all'mRNA di *ompF* ne impedisce la traduzione

La risposta allo shock termico HEAT SHOCK

Serve per fronteggiare i danni dovuti all'innalzamento temperatura

Scoperta inizialmente in *Drosophila* poi si vide che era diffusa in molti organismi.

In *Bacillus subtilis* circa 200 geni sono attivati durante la risposta heat shock.

Molti geni HSP sono chaperon molecolari (DnaK o GroEL) o proteasi ATPdipendenti come Lon , Clp ClpA

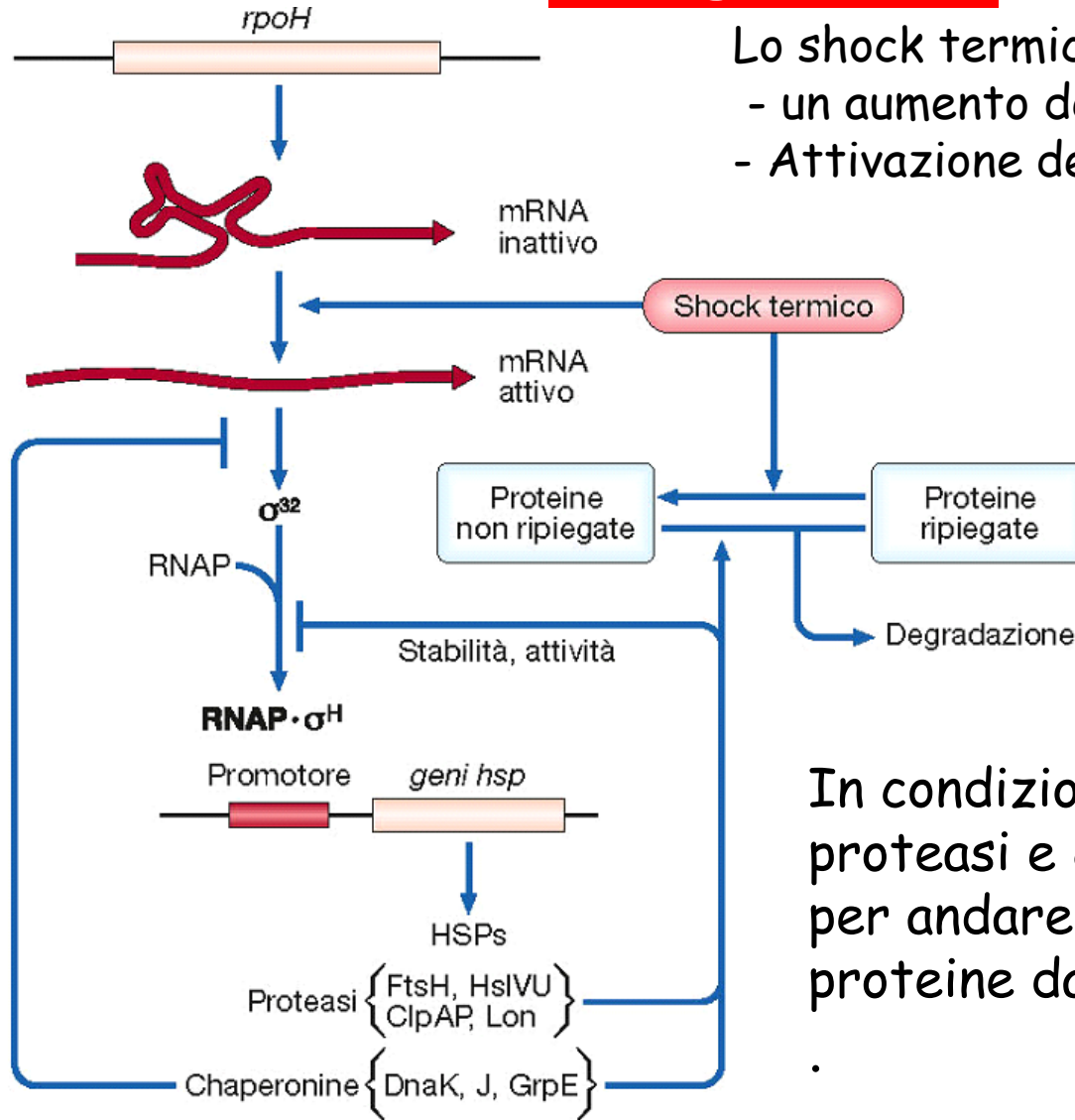
Svolgono un ruolo importante nel folding e nel riciclo delle proteine sia in condizioni normali che in stress.

I geni heat shock sono organizzati in diversi reguloni, ognuno regolato a livello trascrizionale da un proprio regolatore, che può essere sigma alternativo, attivatore o repressore trascrizionale.

Il regulone σ^H

Lo shock termico induce sia

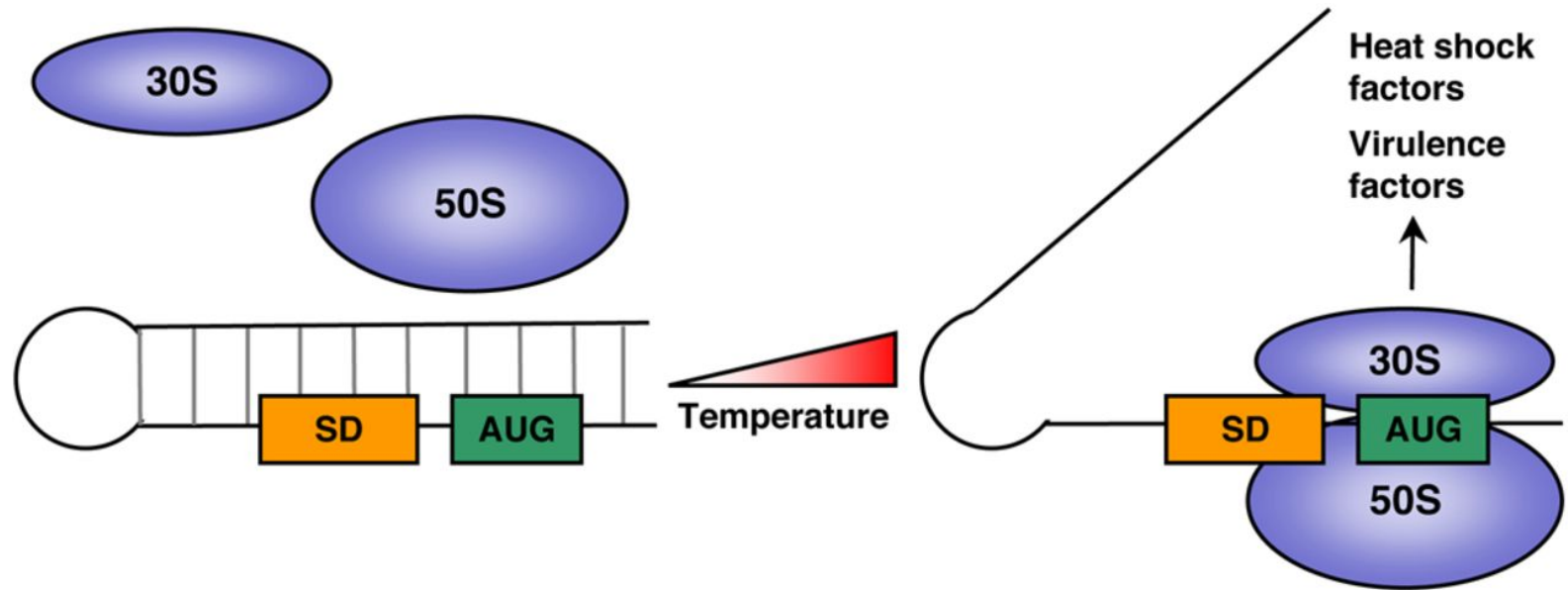
- un aumento della stabilità di σ^H
- Attivazione della traduzione del mRNA di σ^H



A bassa temperatura il livello di σ^H è mantenuto basso ad opera di proteasi che lo degradano e di chaperonine (DnaK-DnaJ-GrpE) che interagendo con σ^H gli impediscono di legarsi alla RNA polimerasi.

In condizione di shock termico le proteasi e chaperonine liberano σ^H per andare a degradare o rifoldare le proteine danneggiate.

Sigma H fattore specifico dei geni per lo shock termico

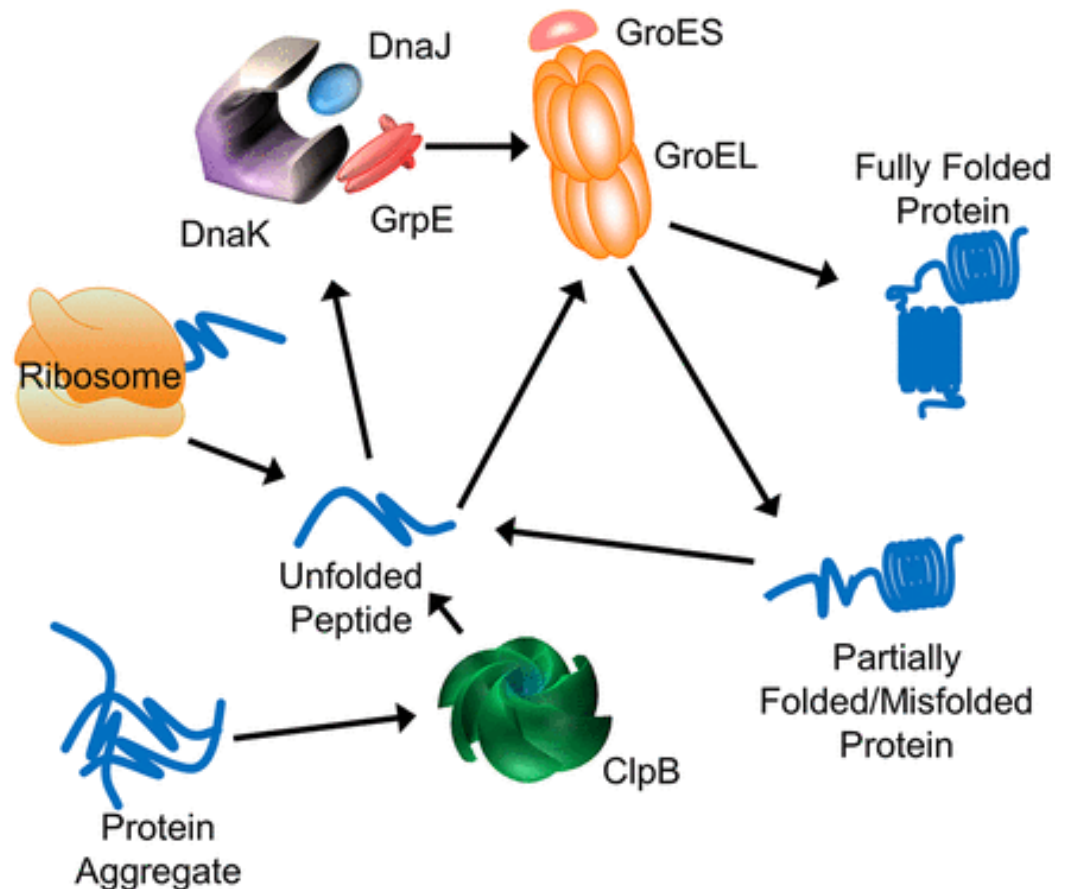


La traduzione del mRNA di σ^H sarebbe facilitata dalla perdita di una struttura secondaria del mRNA (5'UTR) che funge da termosensore

In assenza di shock termico i geni per le proteine heat shock sono espressi a basso livello

Rapido aumento della sintesi dopo stress

Spegnimento della espressione circa 10 minuti dopo cessazione stimolo.



La risposta stringente

È un fenomeno geneticamente programmato

In condizioni di improvvisa carenza di aminoacidi si ha

- un blocco di alcuni processi fondamentali della cellula quali inizio della replicazione, trascrizione degli RNA ribosomiali, tRNA e di molti operoni
- attivazione di operoni catabolici e biosintetici.
- induzione molto elevata del ppGpp guanosina 3'5' bispirofosfato definito *MAGIC SPOT*

ppGpp è una molecola segnale detta come allarmone

- Segnala uno stato fisiologico della cellula
- Come cAMP, controlla numerosi operoni
- permette la sopravvivenza in condizioni difficili.

Con chi interagisce ppGpp?

- interagisce con la RNA polimerasi
- inibisce la trascrizione dai promotori degli RNA ribosomiali.

RelA e SpoT direttamente coinvolti nella regolazione intracellulare di ppGpp

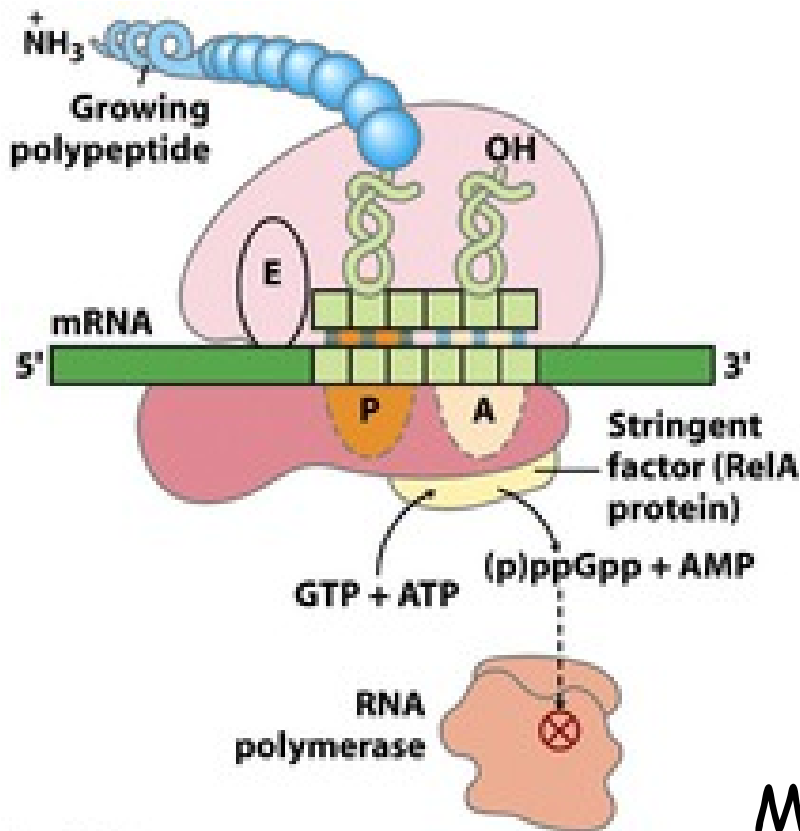


Figure 28-24
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

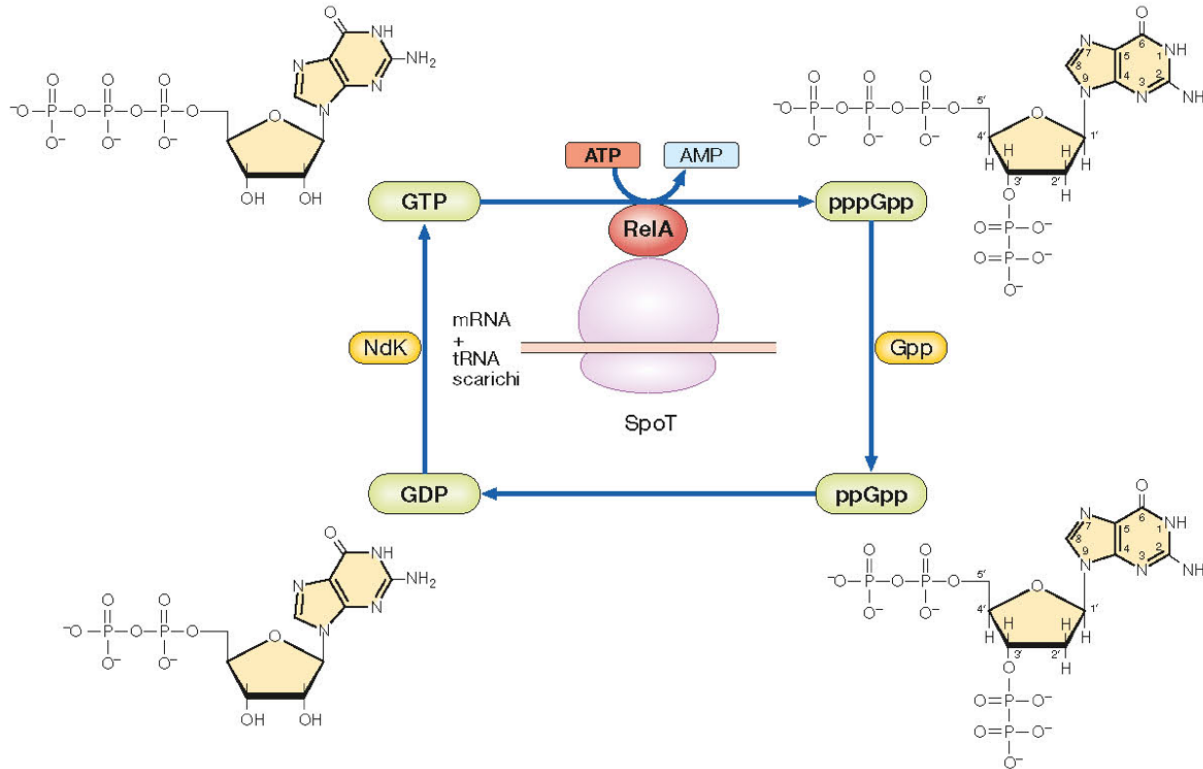
La carenza di AA comporta un accumulo di tRNA non caricati che si legano con debole affinità al sito A bloccandone l'attività.

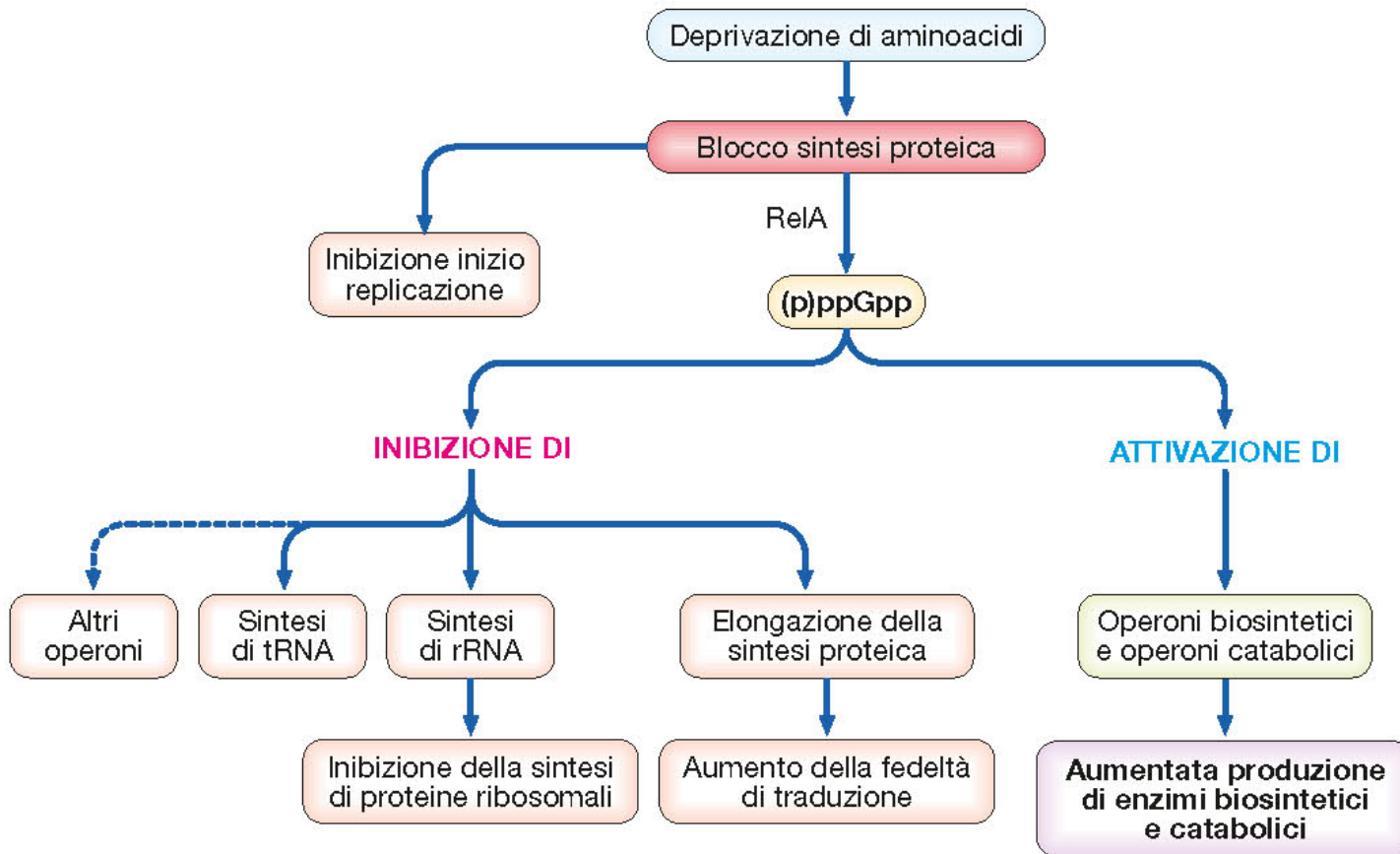
La proteina RelA stimolata dal 3' mRNA si lega al ribosoma determinando la sintesi di ppGpp

Mutazioni in *relA* hanno diversi fenotipi , in alcuni batteri come *M.tuberculosis* , i ceppi dimostrano ridotta virulenza.

RelA è una ppGpp sintetasi associata al ribosoma che risponde all'accumulo di tRNA non carichi.

SpoT è una proteina bifunzionale ppGpp sintetasi ed una idrolasi e regola il livello di ppGpp in risposta a molti stimoli.





Sei interessato ai diversi aspetti della Microbiologia ??

I nostri corsi specialistici nelle LM

Genetica dei Microrganismi (prof. F. Ascenzioni)

Microbiologia Cellulare e Vaccinologia (Prof. ML. Bernardini)

Microbiologia molecolare e genomica microbica (Prof. B. Colonna- A. Carattoli)

Virologia Molecolare (Prof. Grossi)

Microbiologia ambientale (Prof. Colonna - E.Di Domenico)

Microbiologia molecolare e genomica microbica

B.Colonna A.Carattoli

**Insegnamento del Corso di Laurea in Biotecnologie Genomiche, Industriali e Ambientali
Selezionabile come esame a libera scelta per le LM in Biologia e Tecnologie cellulari (BTC),
Genetica e Biologia Molecolare (GBM), Biotecnologie mediche e farmaceutiche**

Programma del corso

Genomica microbica

- Genoma dei batteri e analisi dati di sequenza
- Genoma minimo e genoma sintetico: verso il batterio artificiale
- Origine ed evoluzione del genoma di batteri patogeni modello:
 - Microbioma intestinale: analisi genomica e metagenomica
 - Microbioma alimentare e salute dell'uomo
- Il resistoma: evoluzione delle antibiotiche resistenze

Microbiologia molecolare

- Controllo epigenetico nei batteri
- Differenziamento nei batteri: modelli e regolazione
- Piccoli RNA e regolazione genica nei batteri
- L'immunità nei batteri, le sequenze CRISPR e la resistenza ai batteriofagi
- Nuove strategie antibatteriche: farmaci mirati e terapia fagica
- Biologia sintetica: concetti di base e potenziali applicazioni

Sistemi CRISPR-CAS : un sistema di resistenza ai fagi

Dalla ricerca di base sulle interazioni batteriofagi/ batteri alle applicazioni per l'editing genomico al

Premio Nobel per la Chimica 2020

Jennifer Doudna

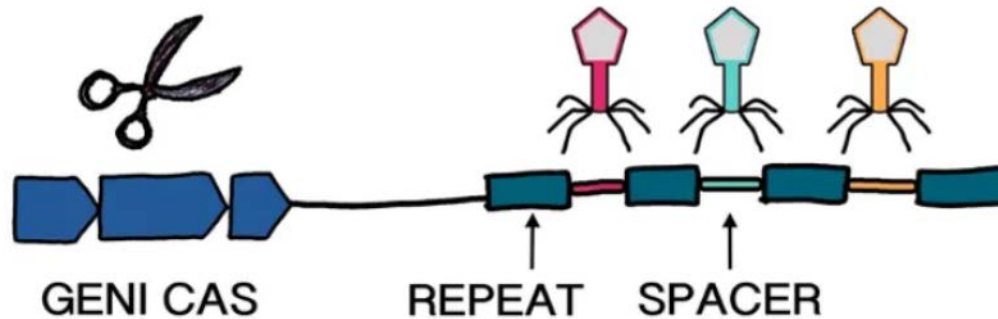


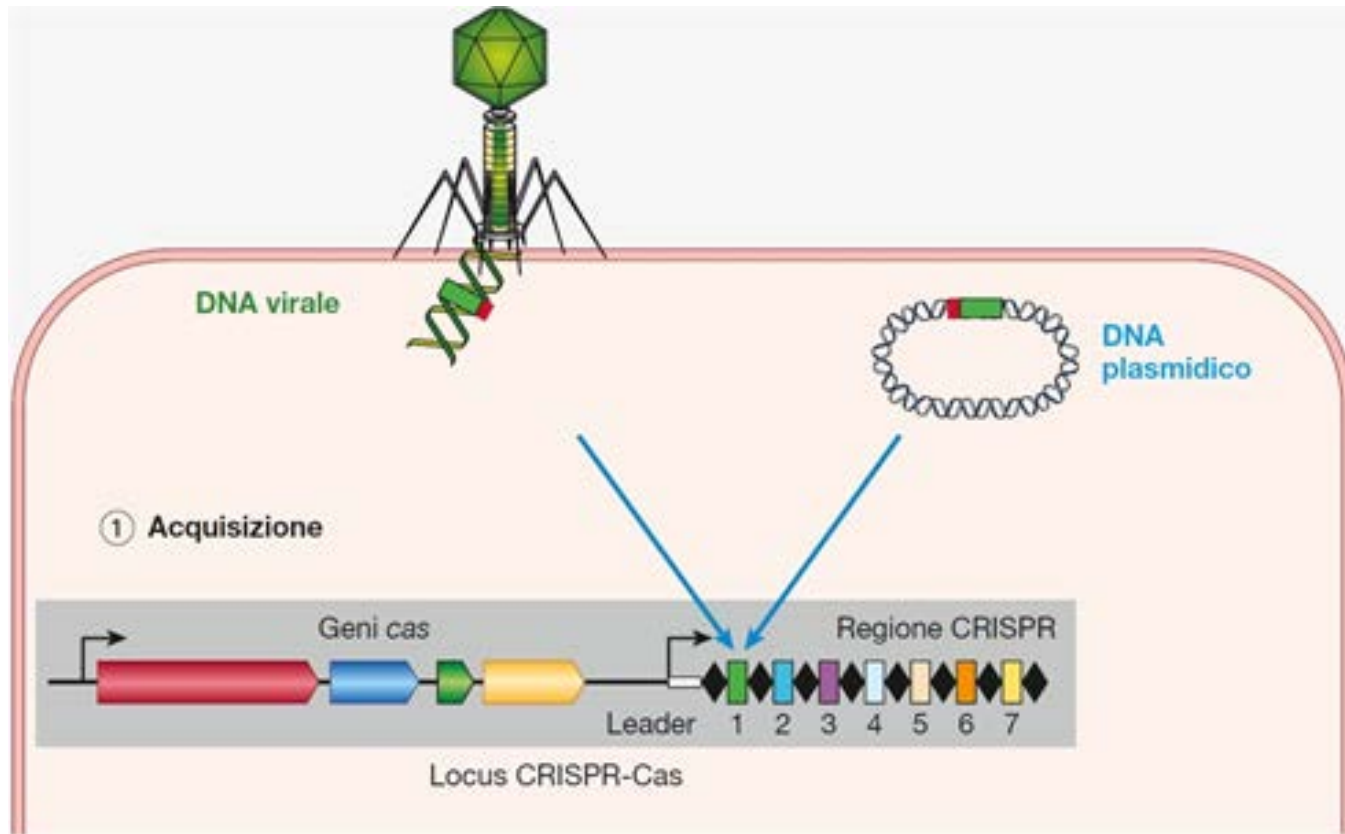
Emmanuelle Charpentier

Le regioni CRISPR sono essenzialmente delle banche di memoria di sequenze fagiche ostili.

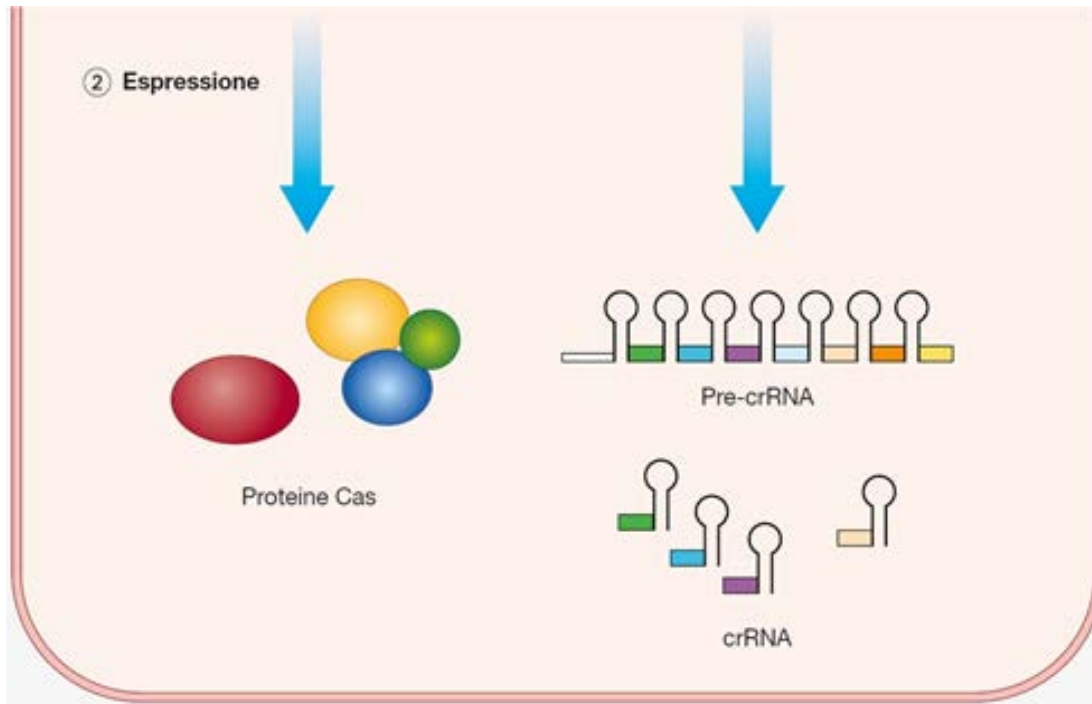
Sono quindi regioni presenti nel genoma della gran parte dei batteri (70% nei Batteri, 90% degli Archea)

Un locus CRISPR è costituito dalla ripetizione di diversi frammenti fagici (SPACERS) alternate con sequenze ripetute identiche (REPEATS)
Il sistema CRISPR conferisce resistenza ai fagi che contengono nel proprio genoma una sequenza identica o strettamente correlata a quella contenuta nei CRISPR.

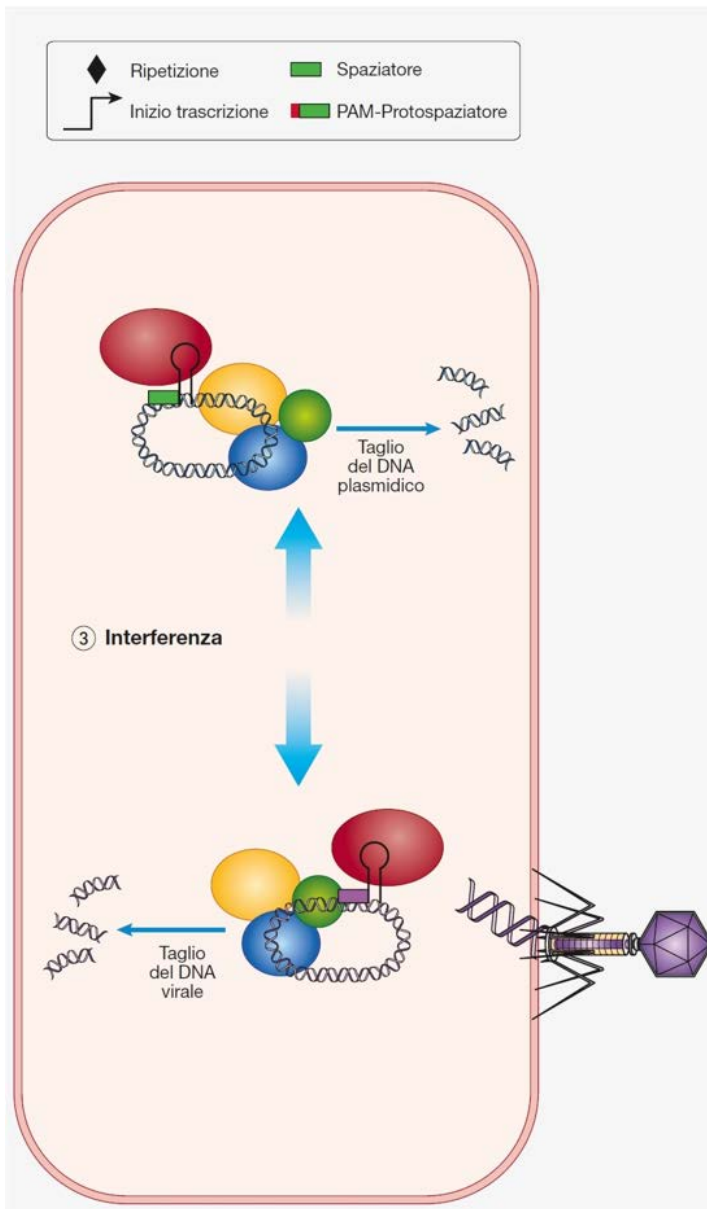




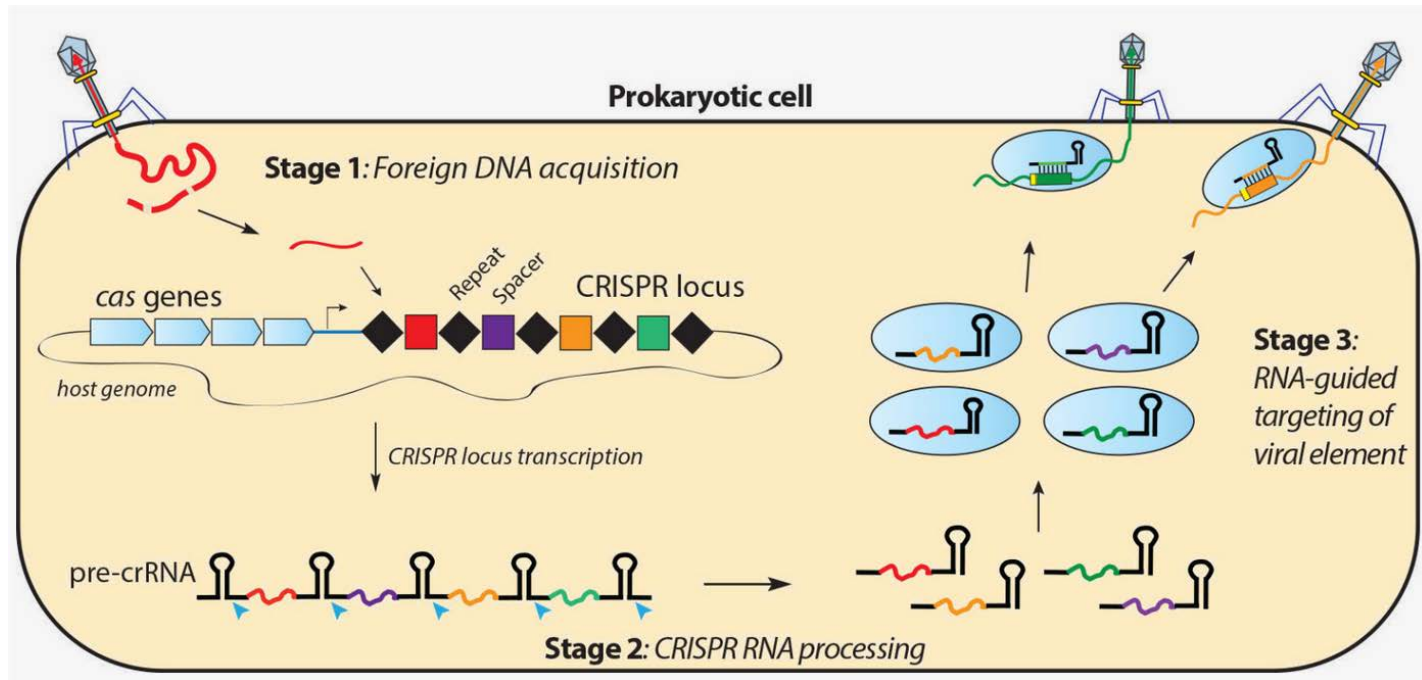
Adattamento: Acquisizione degli SPACERS: durante l'infezione fagica segmenti di acidi nucleici dell'elemento invasore vengono incorporati a valle della sequenza leader del CRISPR.



Espressione: Nella fase di processamento il locus è trascritto e processato in crRNA maturo contenente una sequenza REPEAT con un segnale di 8 nt ed un singola sequenza spacer.



Interferenza: Durante la fase effettrice i crRNA complessati alle proteine CAS portano alla degradazione il DNA complementare



Modello semplificato : la serie di SPACERS-REPEATS è trascritta in un lungo RNA ed i REPEATS assumono una struttura secondaria.

Le proteine Cas riconoscono la struttura secondaria e tagliano l'RNA in modo da produrre dei sRNAs ognuno dei quali contiene una sequenza SPACERS e 2 mezzi REPEATS. Gli sRNA complessandosi alle proteine CAS si appaiano al DNA fagico provocandone la degradazione.

Questo processo è mediato da 1 o più proteine CAS