

# Small RNAs in bacteria

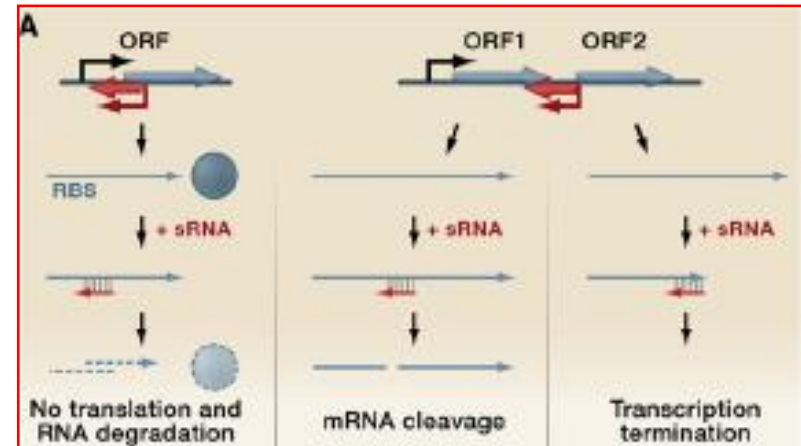
Discovered in 1981

Synthesized as discrete transcripts  
with dedicated promoters and terminators

Act as regulators through base pairing with mRNAs

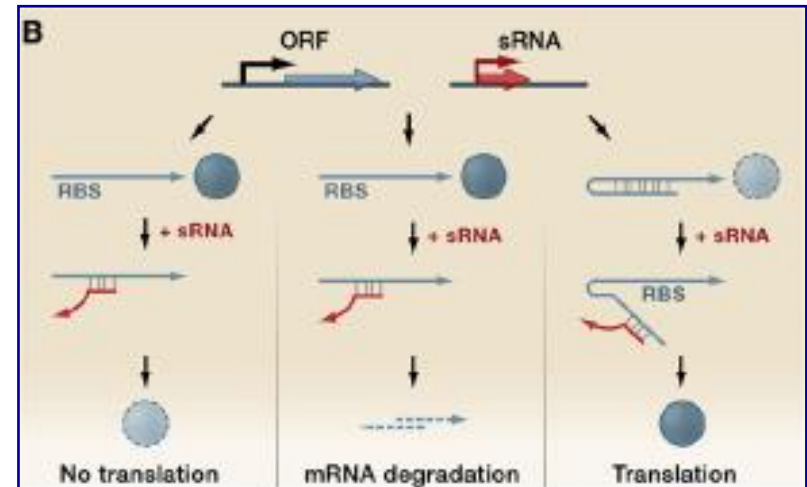
## Cis encoded sRNAs

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



## Trans encoded sRNAs

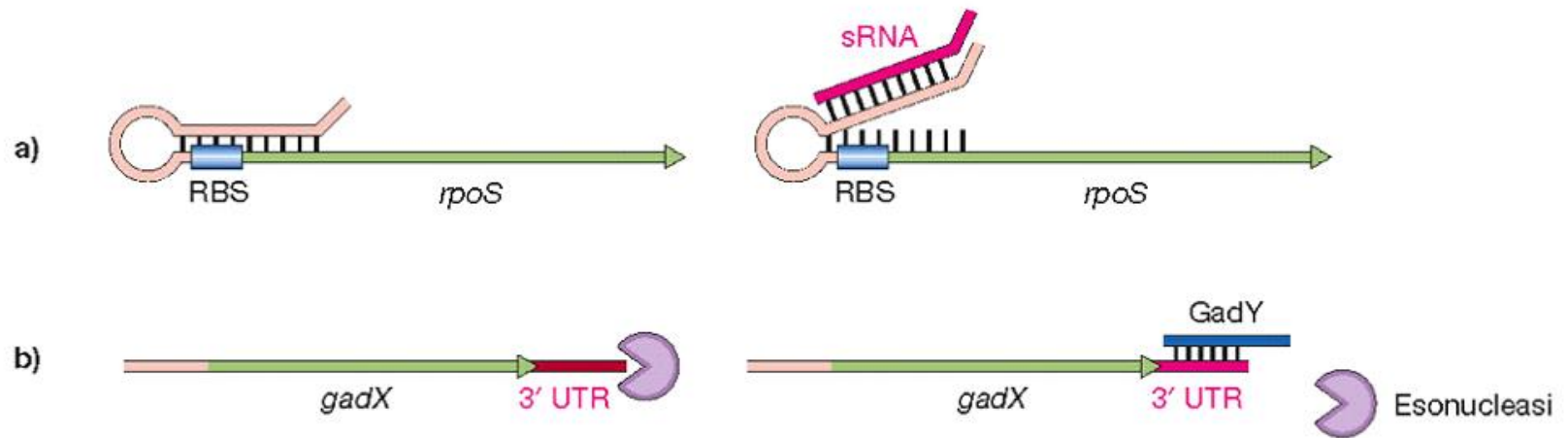
- are encoded far from their targets
- share only limited complementarity with their target mRNAs
- require RNA chaperones to facilitate the RNA-RNA interactions.



## 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
- Sono complementari a mRNA del gene bersaglio ma trascritti sull'altra elica, funzionano da **RNA antisenso**
- **Le interazioni RNA-RNA** favorite da una proteina molto abbondante chaperon degli RNA definita **Hfq**

# Regolazione positiva mediata dai piccoli RNA



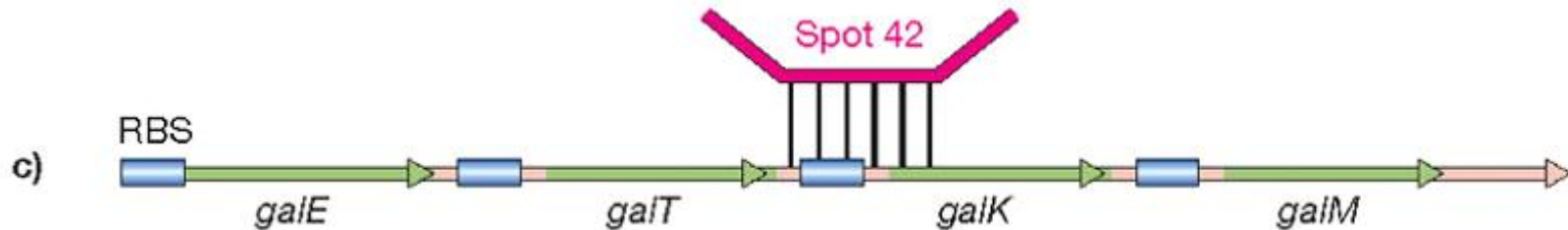
a) Nel caso del trascritto per gene per  $\sigma^S$  il sito di legame dei ribosomi (RBS) forma una struttura secondaria con una regione di mRNA a monte impedendo così l'accesso ai ribosomi.

Il legame di sRNA alla regione di appaiamento con la sequenza RBS apre la struttura permettendo la traduzione del mRNA  $\sigma^S$ .

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

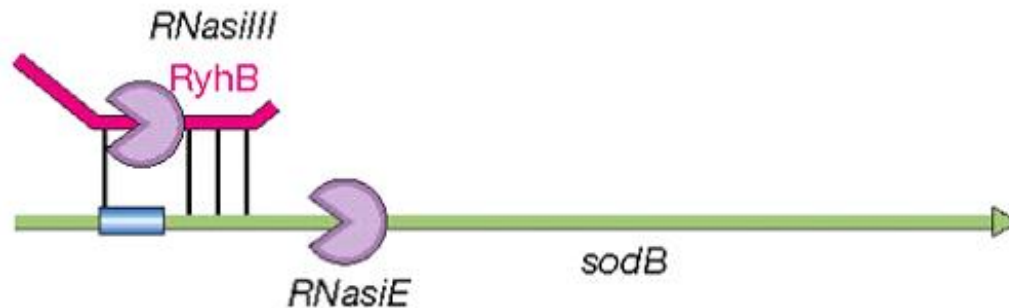
## L'operone galETK



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

## Controllo negativo mediato da RyhB

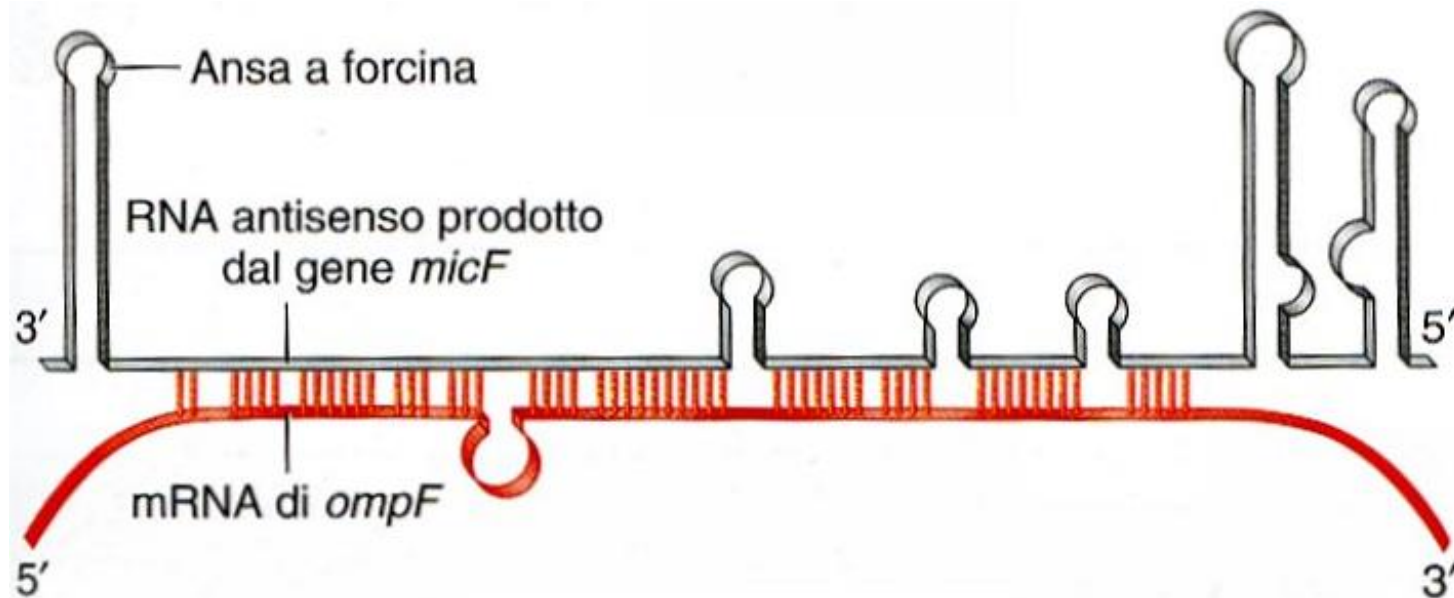


### Il piccolo RNA RyhB

- 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 RNasiIII

## 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.

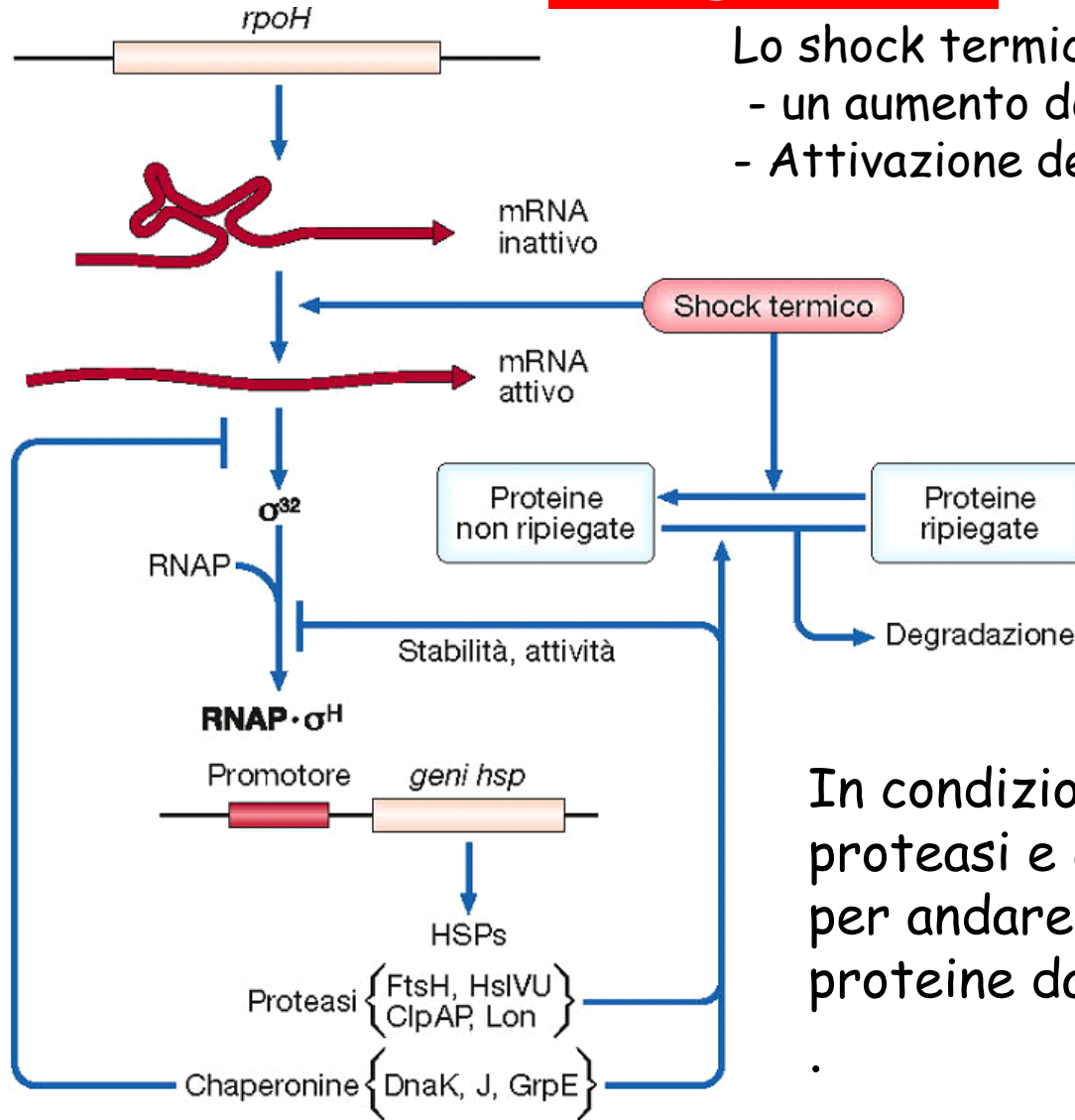
I geni heat shock sono organizzati in diversi reguloni ,ognuno regolato a livello trascrizionale da un proprio regolatore , che può essere sigma alternativo, attivatore o repressore trascrizionale.



# Il regulone $\sigma^H$

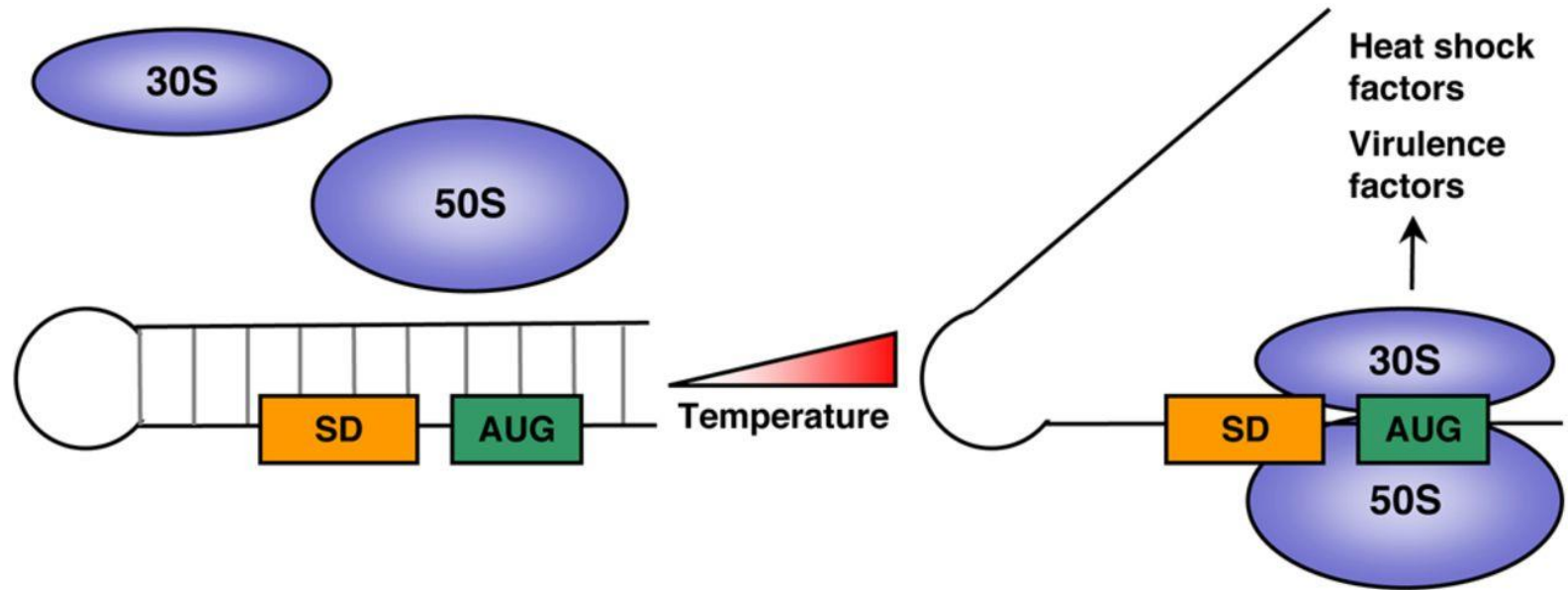
Lo shock termico induce sia

- un aumento della stabilità di  $\sigma^H$
- Attivazione della traduzione del mRNA di  $\sigma^H$



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

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

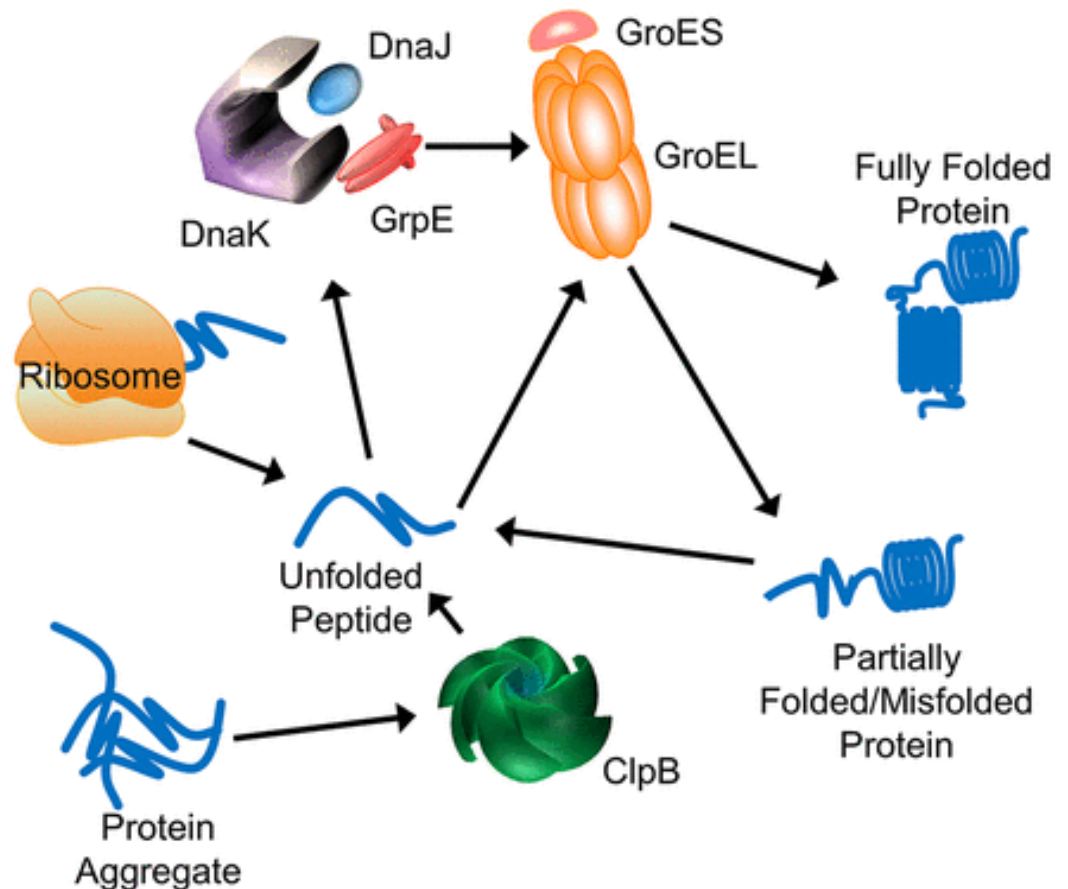


La traduzione del mRNA di  $\sigma^H$  sarebbe facilitata dalla perdita di una struttura secondaria del mRNA (5'UTR) che funge da termosensore

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.



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.

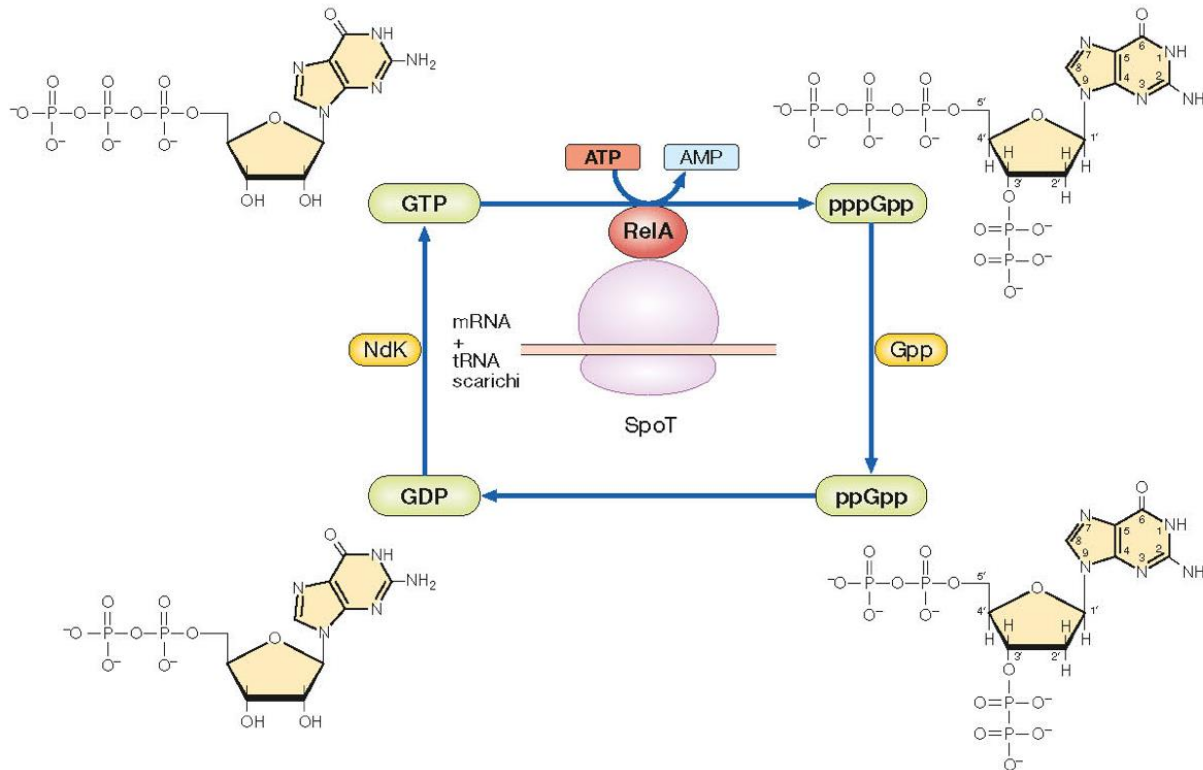
Con chi interagisce ppGpp?

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

RelA e SpoT direttamente coinvolti nella regolazione intracellulare di ppGpp

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.



## 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*

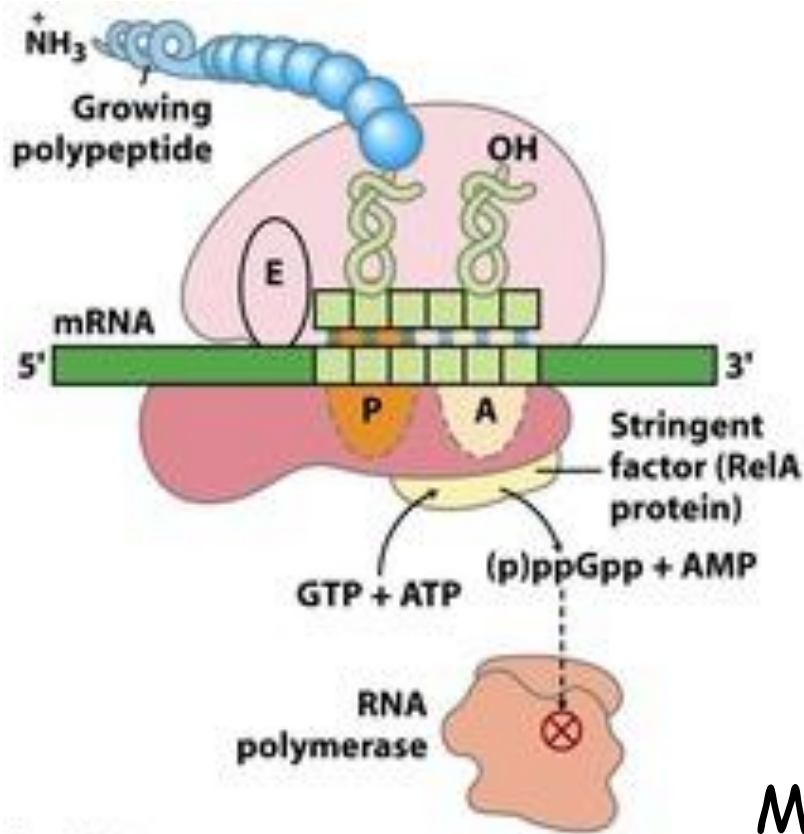
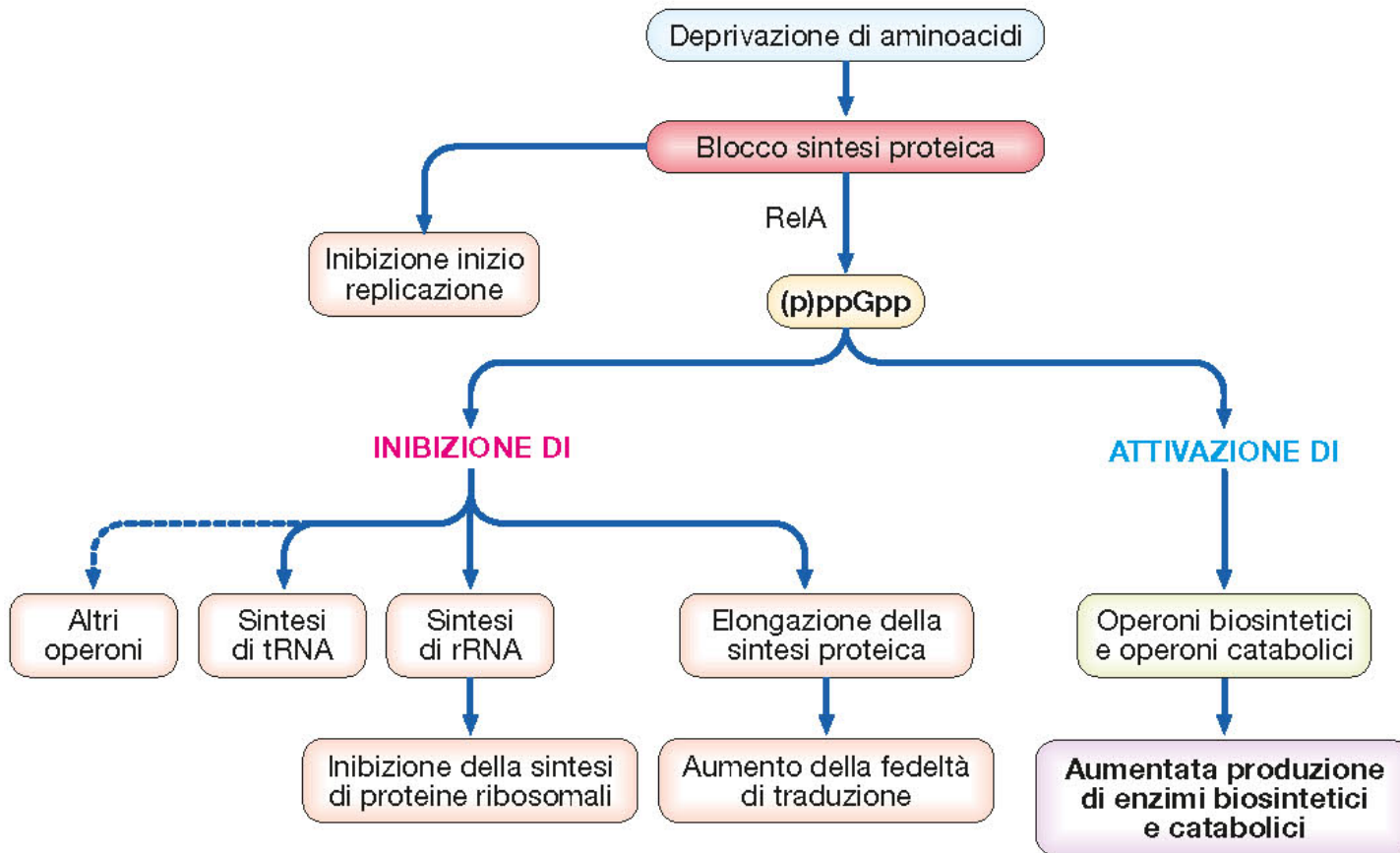


Figure 28-24  
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

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.





# *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

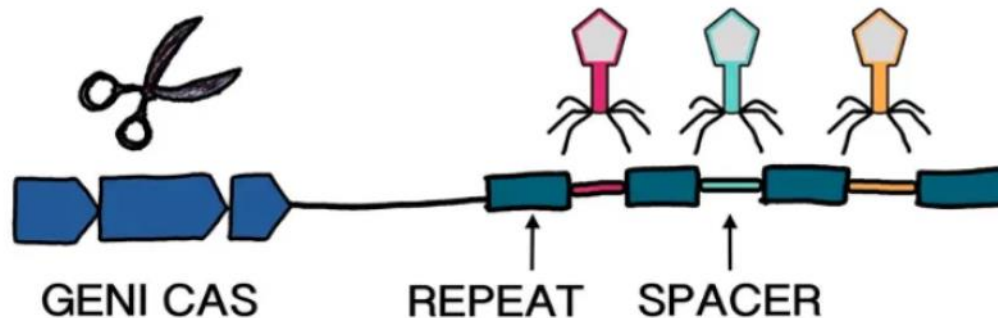


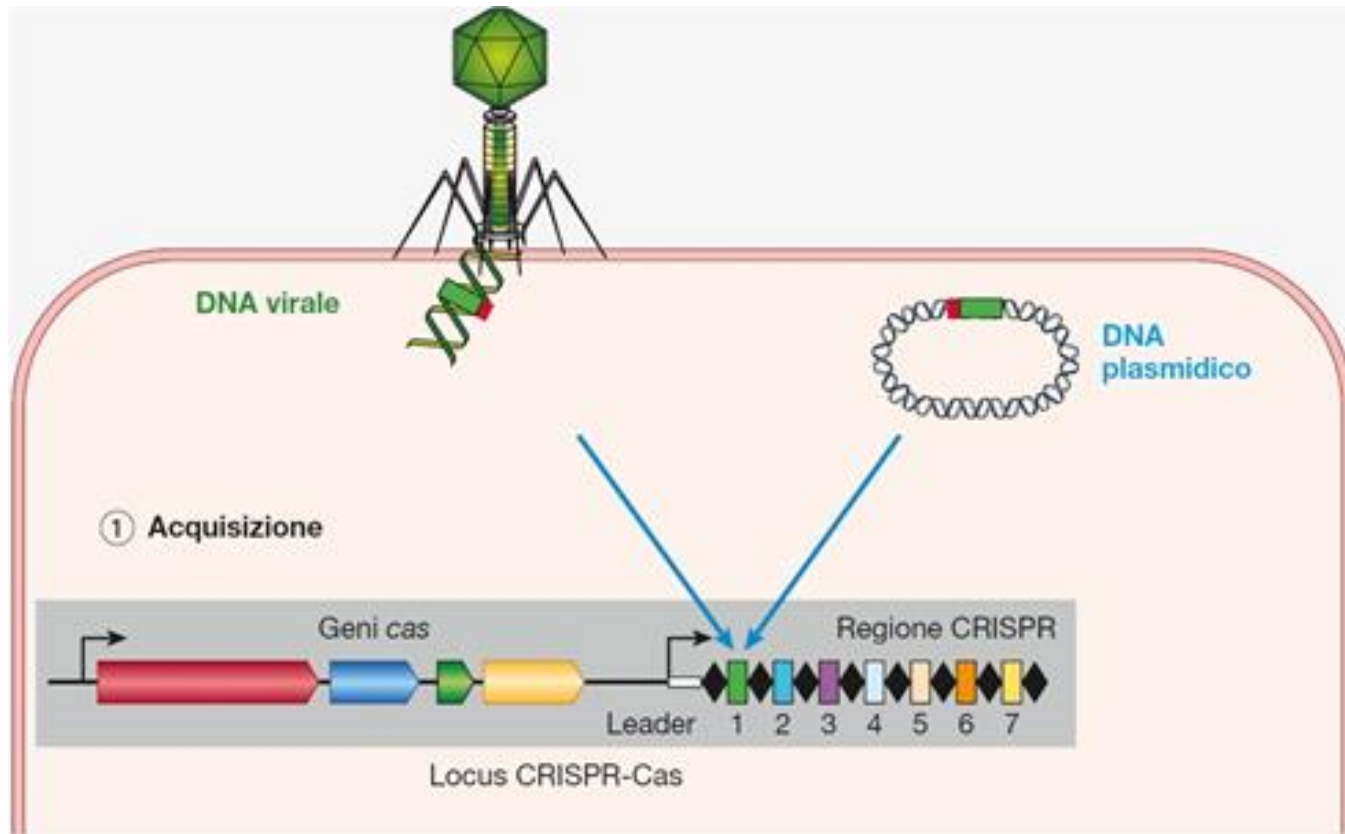
Emmanuelle Charpentier

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

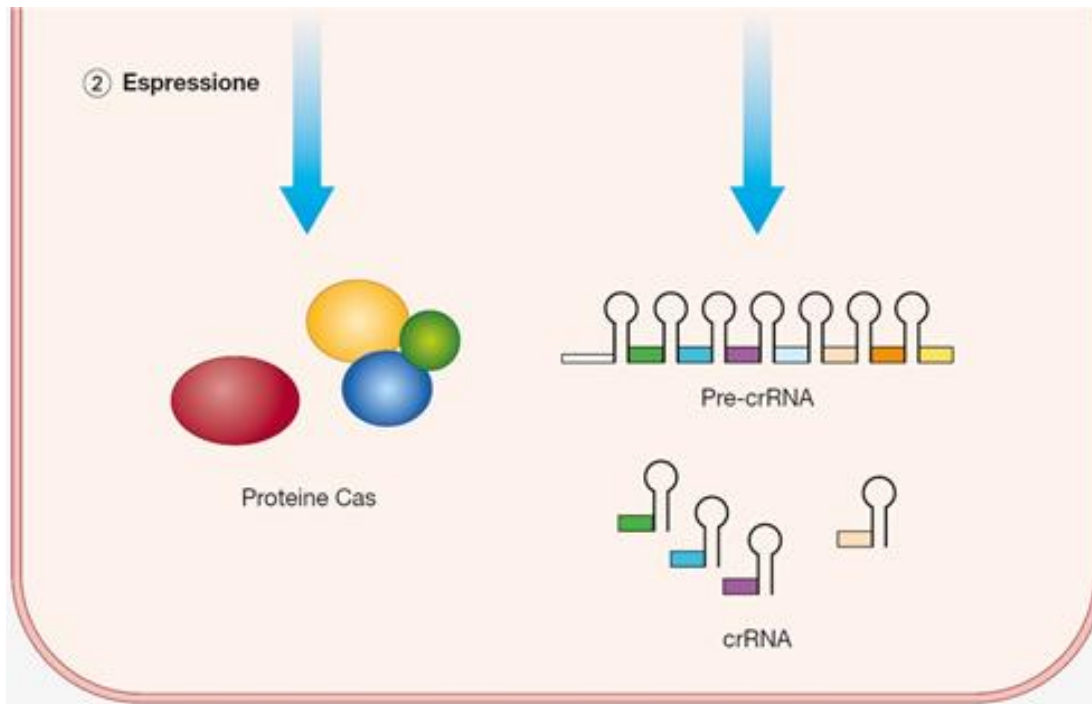
Sono quindi regioni presenti nel genoma della gran parte dei batteri (70% nei Batteri, 90% degli Archea)

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.

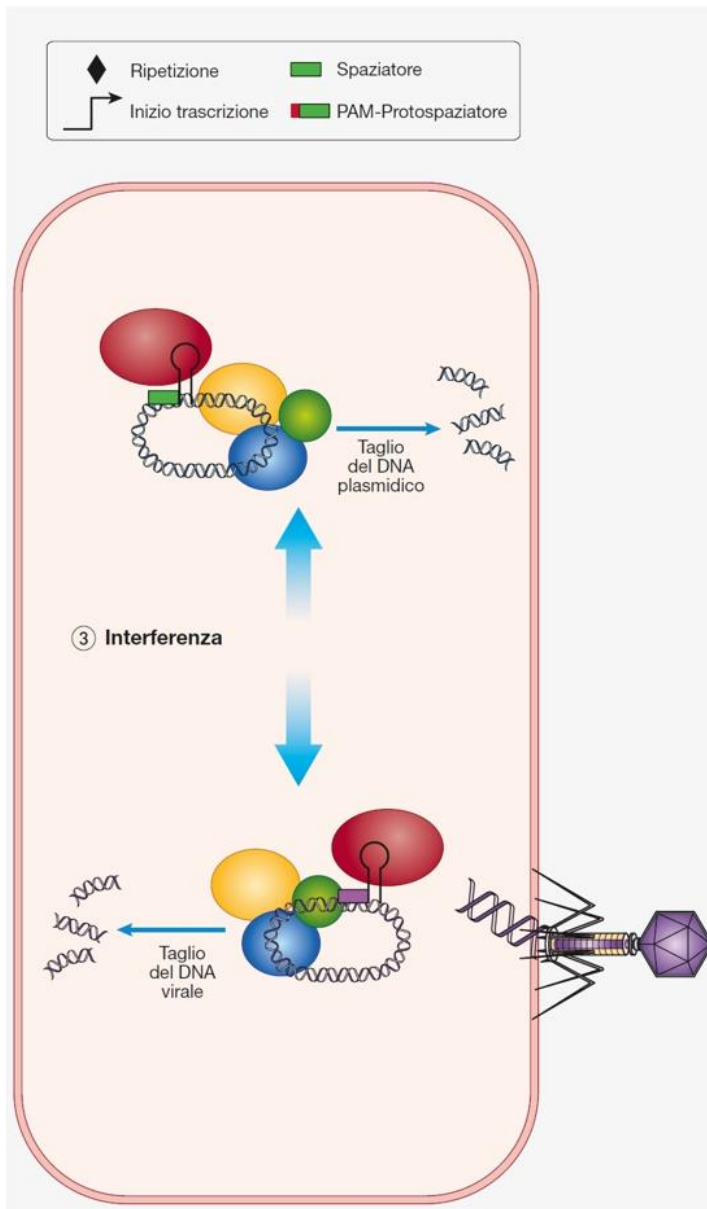




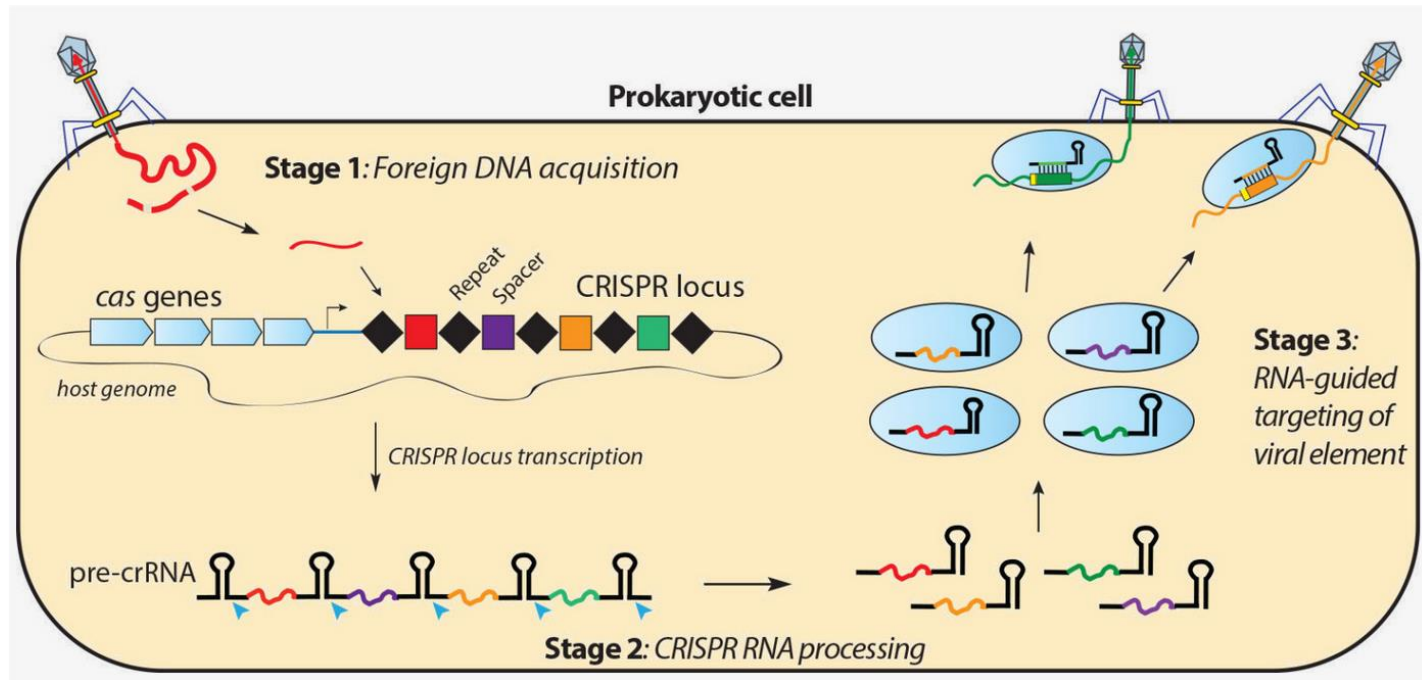
**Adattamento:** Acquisizione degli SPACERS: durante l'infezione fagica segmenti di acidi nucleici dell'elemento invasore vengono incorporati a valle della sequenza leader del CRISPR.



**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 effetttrice 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

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 - A. Carattoli )

# Microbiologia molecolare e genomica microbica

## Programma del corso

- Organizzazione del genoma: concetto di cromosoma e di plasmide
- Meccanismi di evoluzione: trasferimento genico orizzontale e perdita di materiale genetico
- Biologia sintetica: concetti di base e potenziali applicazioni
- Genoma minimo e genoma sintetico: verso il batterio artificiale
- Origine ed evoluzione del genoma di batteri patogeni modello: *Shigella*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*
- Controllo epigenetico nei batteri
- Differenziamento nei batteri: modelli e regolazione
- Microbioma intestinale: analisi genomica e metagenomica
- Microbioma polmonare: analisi metagenomica ed implicazioni nella fibrosi cistica
- Microbioma alimentare e salute dell'uomo
- Il resistoma: evoluzione delle antibiotiche resistenze
- 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
- I nuovi vaccini: dall'analisi genomica agli studi *in vivo*