



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CS. EXACTAS, FCO.-QCAS.
Y NATURALES

Dpto de Biología Molecular

*Vistas panorámicas desde el gen hasta
la cristalización de una enzima para
conocer su función*

TEMA 10

- Promotores bacterianos y regulación transcripcional.
- Características de promotores y su reconocimiento en los genomas bacterianos.
- Propiedades generales de los factores sigmas, Sigma 70, sigma 54 alternativo, etc.
- Sistemas de dos componentes. Proteínas que regulan la expresión génica (NtrC, CbrB, etc).
- Factores que controlan los promotores sin unirse al ADN.
- Sistema de control de proteínas inducidas por colina.

TEMA 10

-Promotores bacterianos y regulación transcripcional.

-Transcripción

-RNA Polimerasa

-Promotores

-Regulación

Transcripción en bacterias

- * Proceso de síntesis de RNA dirigido por DNA, donde sólo una hebra es copiada (molde).
- * Mecanismo celular por el cual la información genética contenida en el DNA es transferida a una molécula de RNA.

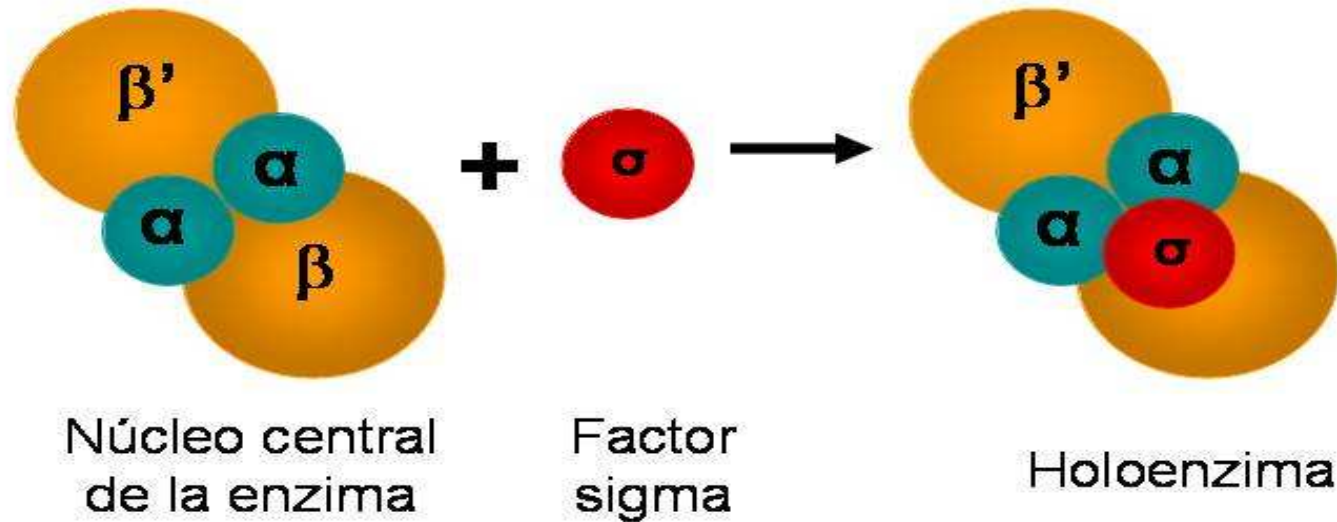
Transcripción en bacterias: 5 fases

- *preiniciación: factor sigma + RNAP
- *iniciación: burbuja entre -10 y +2
- *liberación del promotor: sale factor sigma
- *elongación: elongación del transcripto
- *terminación: por presencia de horquilla o dependiente del factor Rho

RNA polimerasa bacteriana (J. Hurwitz y S. Weiss)

- *Un solo tipo de RNA polimerasa para todos los transcritos
- *Holoenzima de unos 500 kd formada por cuatro clases de subunidades: β (156 kDa); β' (151 kDa); 2 α (idénticas de 37 kDa).
- * Polimeriza en sentido 5' -3' .
- *Actividad Catalítica: Une por enlace fosfodiéster el grupo 3' -hidroxilo de la cadena naciente y el fosforilo alfa del NTP entrante (ataque nucleofílico).
- *Procesativa: Desde el inicio de la transcripción no abandona el molde hasta la terminación.
- *No tiene actividad correctora. Tasa de error 10^{-4}
- *No necesita cebadores para iniciar la transcripción.

ARN polimerasa o Transcriptasa



Funciones

δ : Reconocimiento del promotor

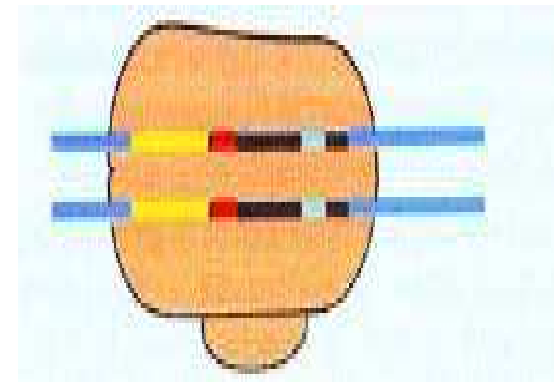
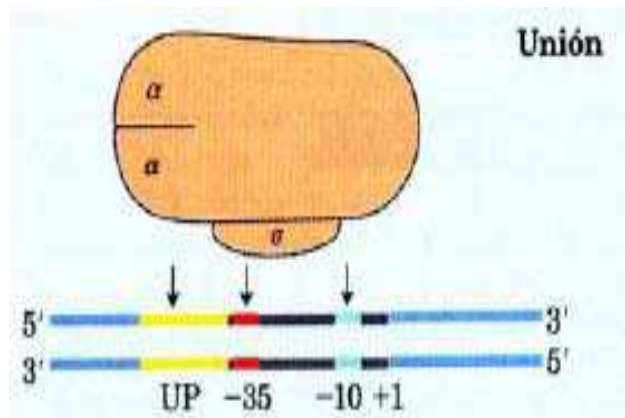
β y β' : Subunidades catalíticas

α : Mantener unida la enzima y permitir la unión de otras proteínas reguladoras

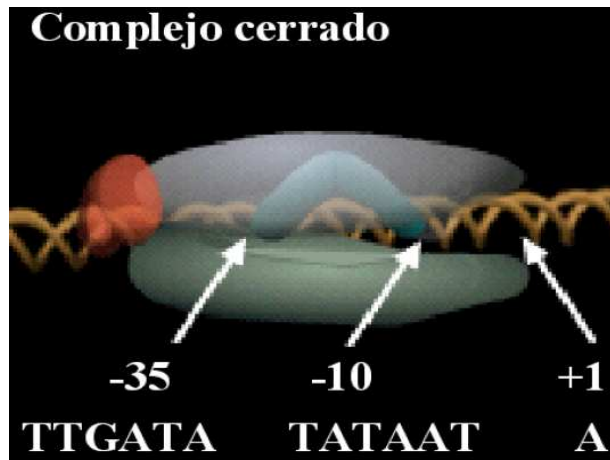
Iniciación: en secuencias promotoras o promotores

La RNA polimerasa se une al DNA de manera inespecífica y busca el sitio promotor desplazándose por la molécula de DNA.

- * Puede detectar las secuencias -35 y -10 sin desenrollar la doble hélice.
- * Estas características hacen que la búsqueda del promotor sea un proceso rápido.



- *La RNA polimerasa cubre la posición -55 a la + 20; la -35 es la de reconocimiento y la -10 indica el punto donde se produce la separación de las dos cadenas.
- * En concreto, cada RNA polimerasa unida desenrolla un segmento de DNA de 17 pb.



Centros promotores:

* Los promotores presentan diferentes eficacias en la iniciación de la transcripción: **fuertes o débiles.**

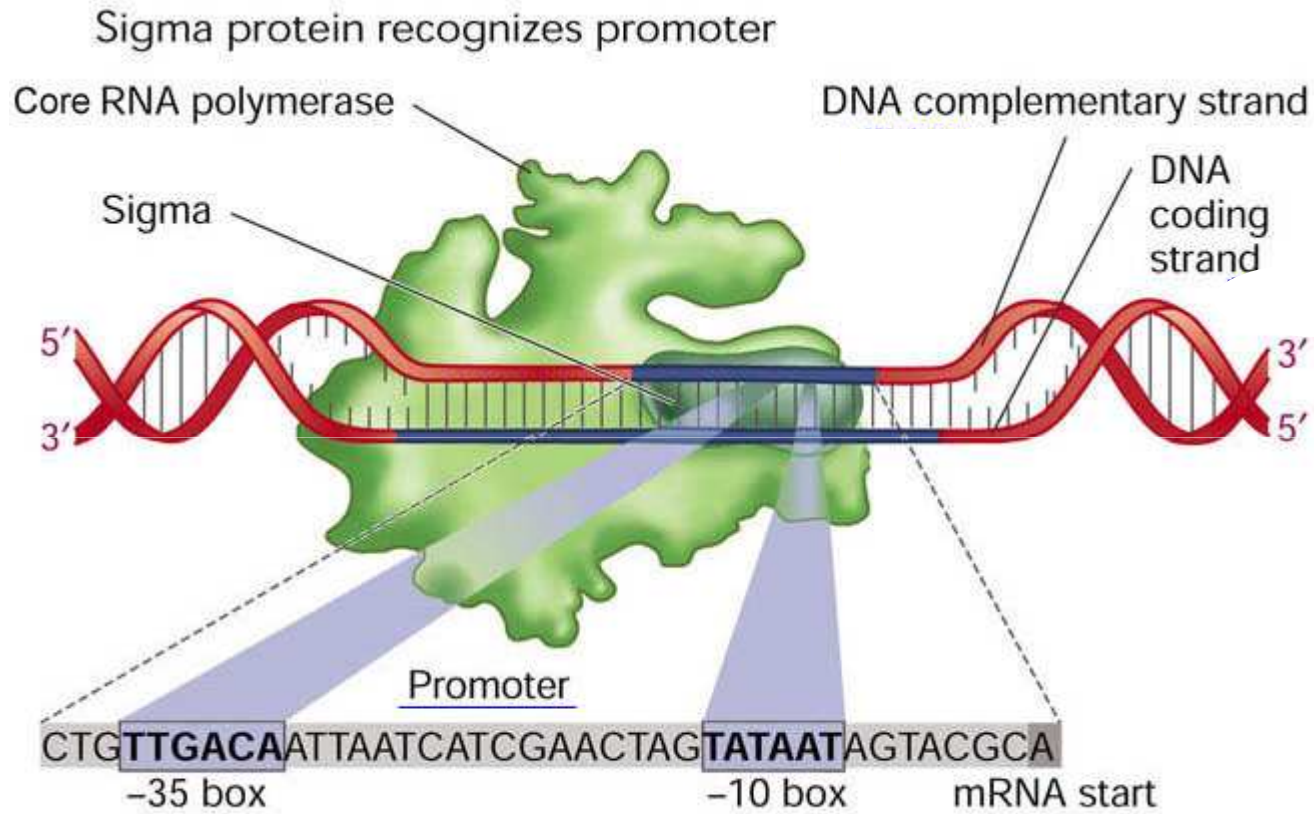
*1 transcripción cada 2 segundos a 1 cada 10 minutos

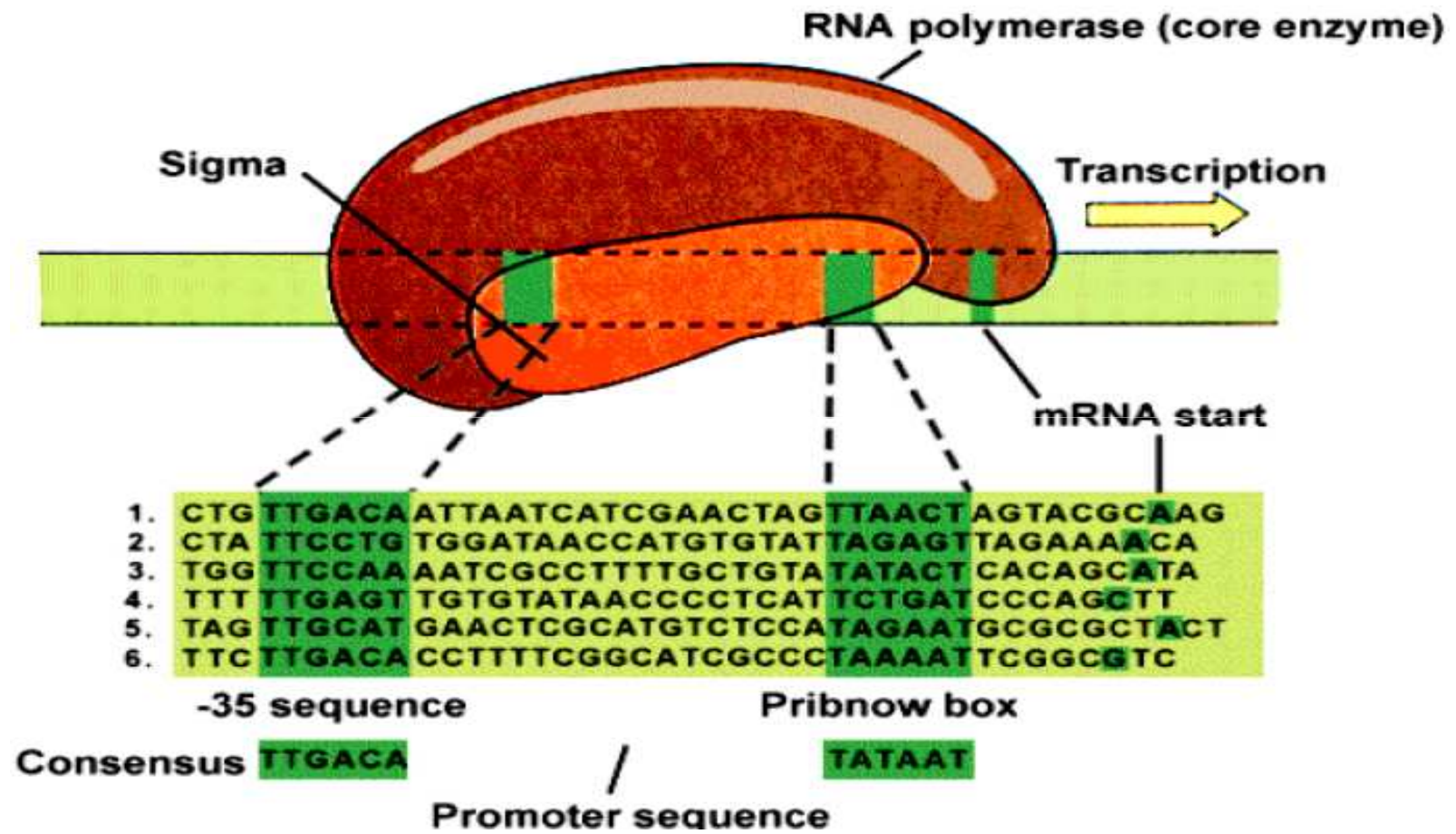
*Los promotores más fuertes tiene secuencias -35 y -10 que coinciden con las consensos.

* La distancia óptima entre ambas secuencias consensos es de 17 nucleótidos.

Promoter prediction

PPP	Promoter prediction tool	http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/ppp/
PromEC	Database of <i>E. coli</i> promoters	http://bioinfo.md.huji.ac.il/marg/promec
SAK	σ^{70} promoter analysis	http://nostradamus.cs.rhul.ac.uk/~leo/sak_demo/
Beagle	σ^{70} promoter analysis	http://eresearch.fit.qut.edu.au/Beagle/
		http:// Promscan.pl Perl script





Factores sigma

Familia de σ^{70} (RpoD): σ^{28} , 32, 38 y Fecl



Difieren en estructura y en el mecanismo para formar complejo abierto

Familia de σ^{54} (RpoN)

En *E. coli* existen 6 factores sigma alternativos regulando regulones específicos asociados a cambios ambientales o fisiológicos

σ^{28} : (fliA) flagelar, -35 CTAAA(15 pb)-10 GCCGATAA

σ^{32} :(rpoH) choque térmico -35 CCCTTGAA(13/15 pb)
-10 CCCGATNT

σ^{38} :(rpoS) en fase estacionaria y factores de virulencia (estrés)

ECF: factor σ alternativo en respuesta a cambios ambientales.

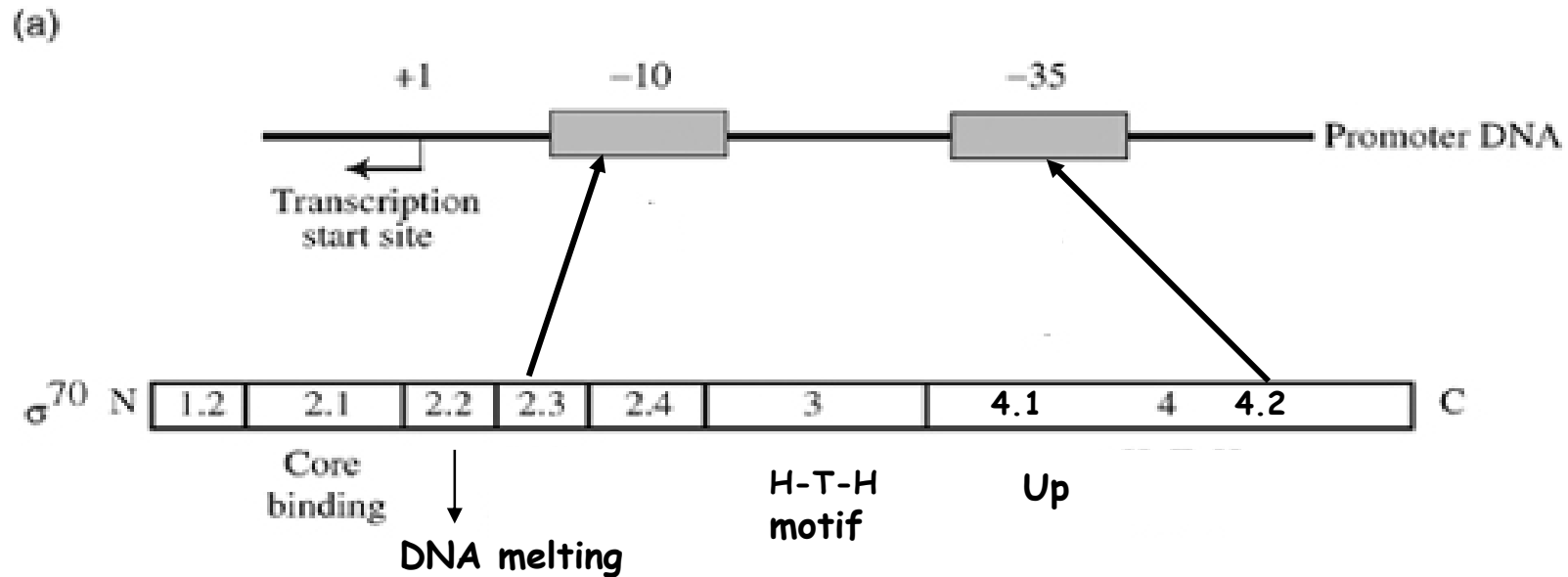
En *P. aeruginosa*: 24 factores σ (19 son ECF) y 550 reguladores transcripcionales. En *Bacillus*: 17 σ alternativos.

Función de los factores σ en general

- *Reconocer las zonas consenso del promotor
- *Inducir el ensamblaje de la RNAP (complejo cerrado)
- *Posicionar la RNAP en el promotor "target"
- *Relajar al DNA cerca del TSS (complejo abierto)



$\sigma 70$



Familia de proteínas σ^{70} :

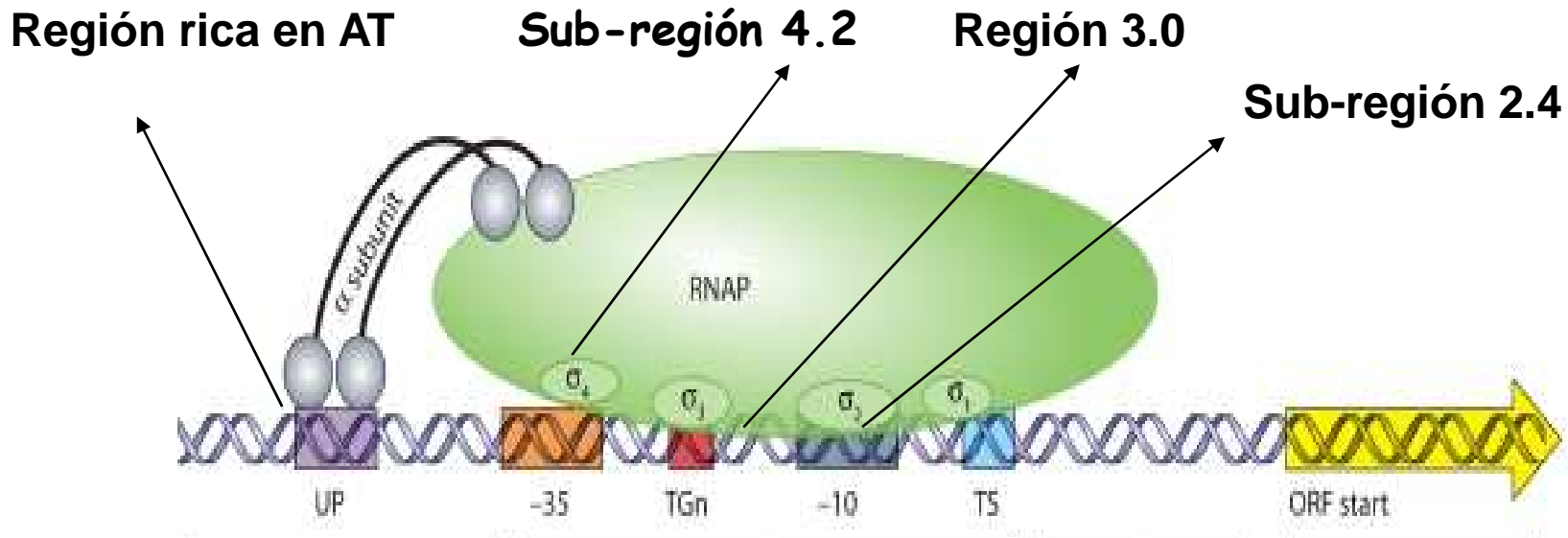
4 regiones conservadas: 1, 2, 3, 4; Se dividen en 4 grupos

Grupo 1: Todas las regiones conservadas, los promotores "housekeeping".

Grupo 2: pierden la subregión 1.1

Grupo 3: conservan región 2-4

Grupo 4: sólo regiones 2 y 4 e incluye la subfamilia divergente: factores que responden a señales ambientales (ECF)



En general de 100 analizados en *E. coli*

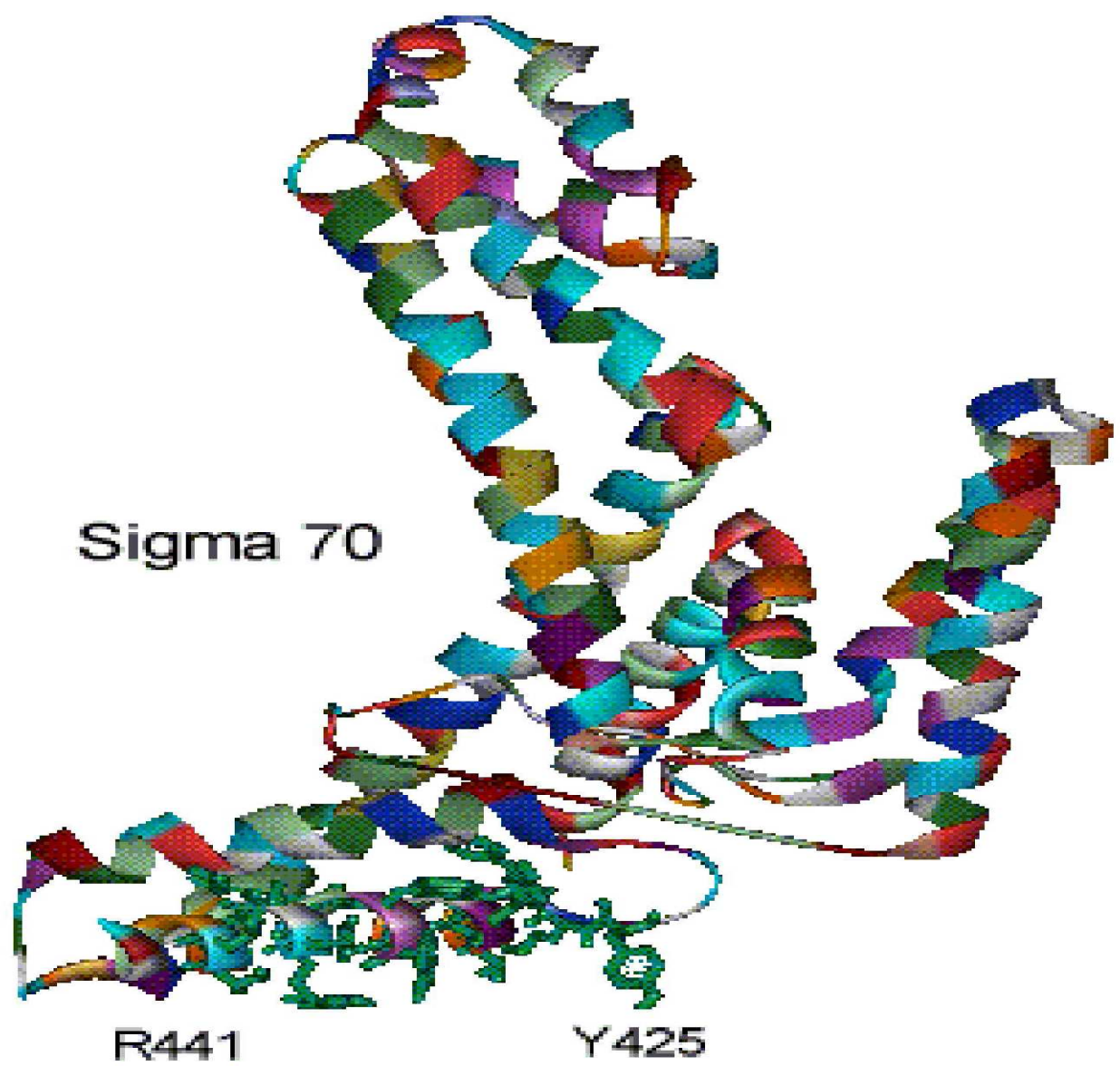
-35 T₈₂T₈₄G₇₈A₆₅C₅₄a₄₅

-10 T₈₀A₉₅t₄₅A₆₀a₅₀T₉₆

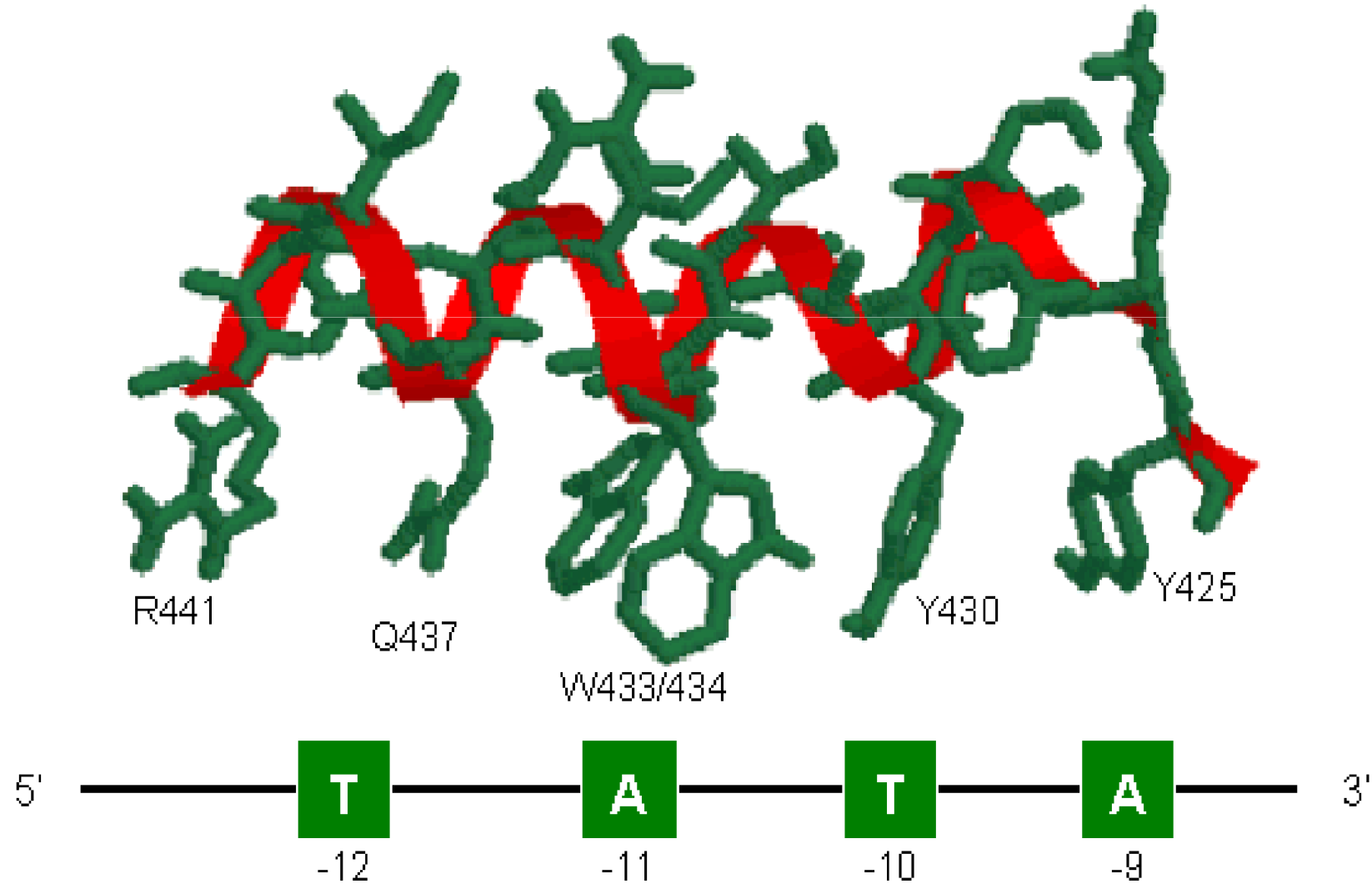
Secuencia consenso:

-35 (TTGACA) -10 (TATAAT) *E. coli*

-35 (TTGACC) -10 (TATaAAT) *P. aeruginosa*



Residuos de δ^{70} involucrados en el "melting" del DNA



Regiones consenso para promotores tipo δ^{70}

Gene	-35 region	Pribnow box (-10 region)	Initiation site (+1)
<i>araBAD</i>	GGATCCTACCTGACGCTTTT	TTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATA	ACCCGTTTTTT
<i>araC</i>	GCCGTGATTATAGACACTTTT	TGTTACGCGTTTTTGTTCATGGCTTTTG	CTCCCGCTTTG
<i>bioA</i>	TTCCAAACGTTGTTTTTTGTTG	TAAATTCGGTGTAGACTTGTAA	ACCTAAATCTTTT
<i>bioB</i>	CATAATCGACTTGTAAACCA	AATTGAAAAGATTTAGGTTTACAAGTCT	TACACCGAAT
<i>galP2</i>	ATTTATTCCATGTCACA	CTTTTCGCATCTTTGTTATGCTATGGTTA	TTTCATAACCAT
<i>lac</i>	ACCCAGGCTTTACACTTTA	TGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG	GAATTGTGAGCGG
<i>lacI</i>	CCATCGAATGGCGCAAAAC	CTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCC	CGAAGAGAGTC
<i>rmA1</i>	AAAAATAAATGCTTGACTCT	GTAGCGGGAAGGCGTATTATCACACCC	CCCGCGCCGCTG
<i>rmD1</i>	CAAAAAAATACTTGTGCA	AAAAAATTGGGATCCCTATAATGCGCCT	CCGTTGAGACGA
<i>rmE1</i>	CAATTTTTCTATTGCGGC	CTGCGGAGAACTCCCTATAATGCGCCT	CCATCGACACGG
<i>tRNA^{Tyr}</i>	CAACGTAACTTTACAGCG	GCGGCGTCATTTGATATGATGCGCCC	CGCTTCCCGATA
<i>trp</i>	AAATGAGCTGTTGACAATTA	ATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGCA	AGTTCACGTA

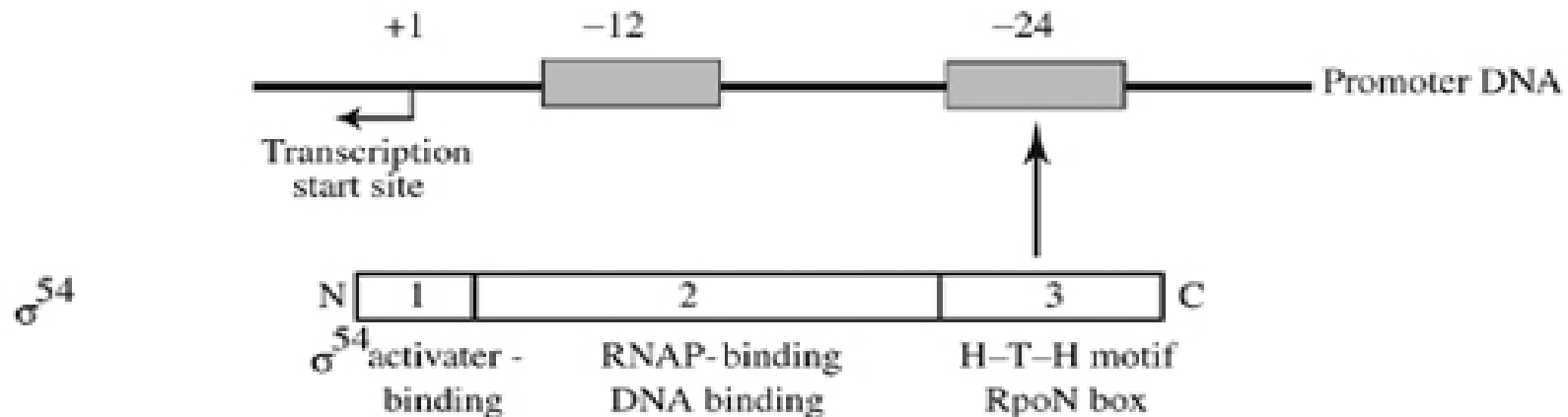
Consensus sequence:	-35 region	Pribnow box	Initiation site
	T C T T G A C A T ... [11-15 bp] ... T A T A A T ... [5-8 bp] ...		A 51 C T 55 G 48 42
	42 38 82 84 79 64 53 45 41	79 95 44 59 51 96	

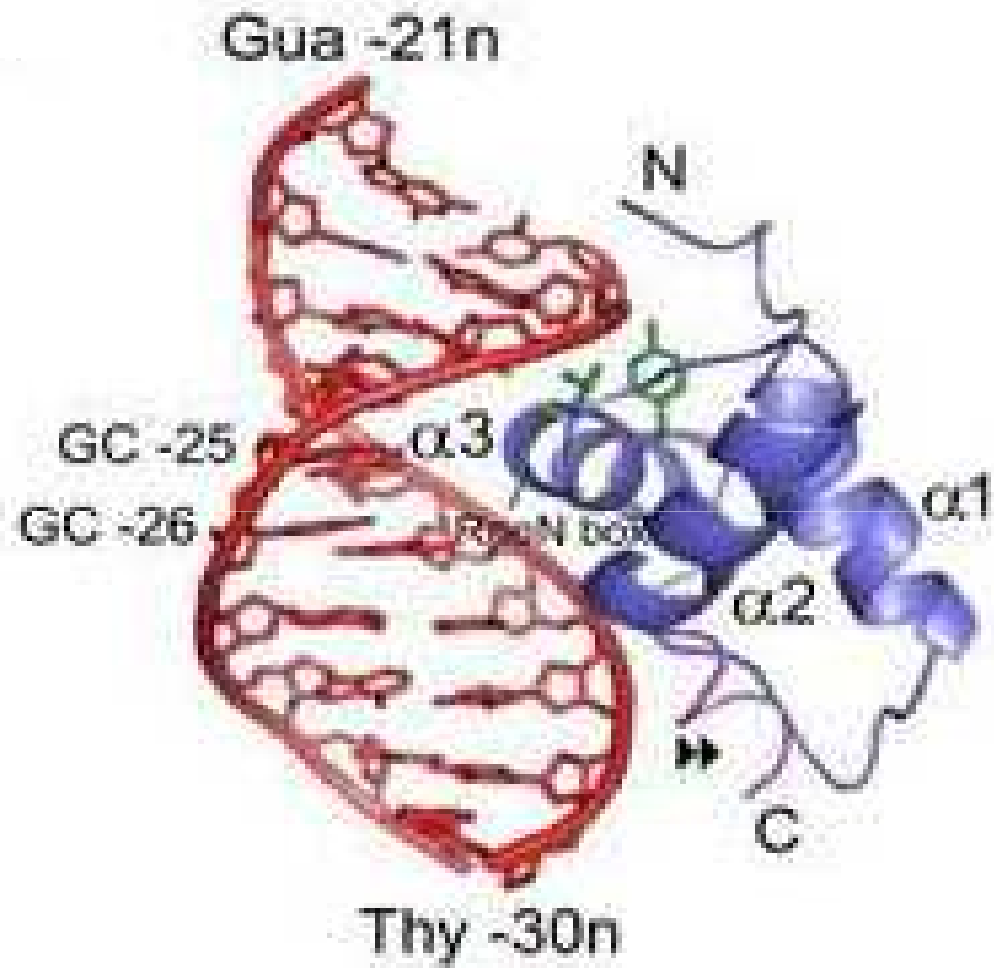
Promotores dependientes de sigma 54

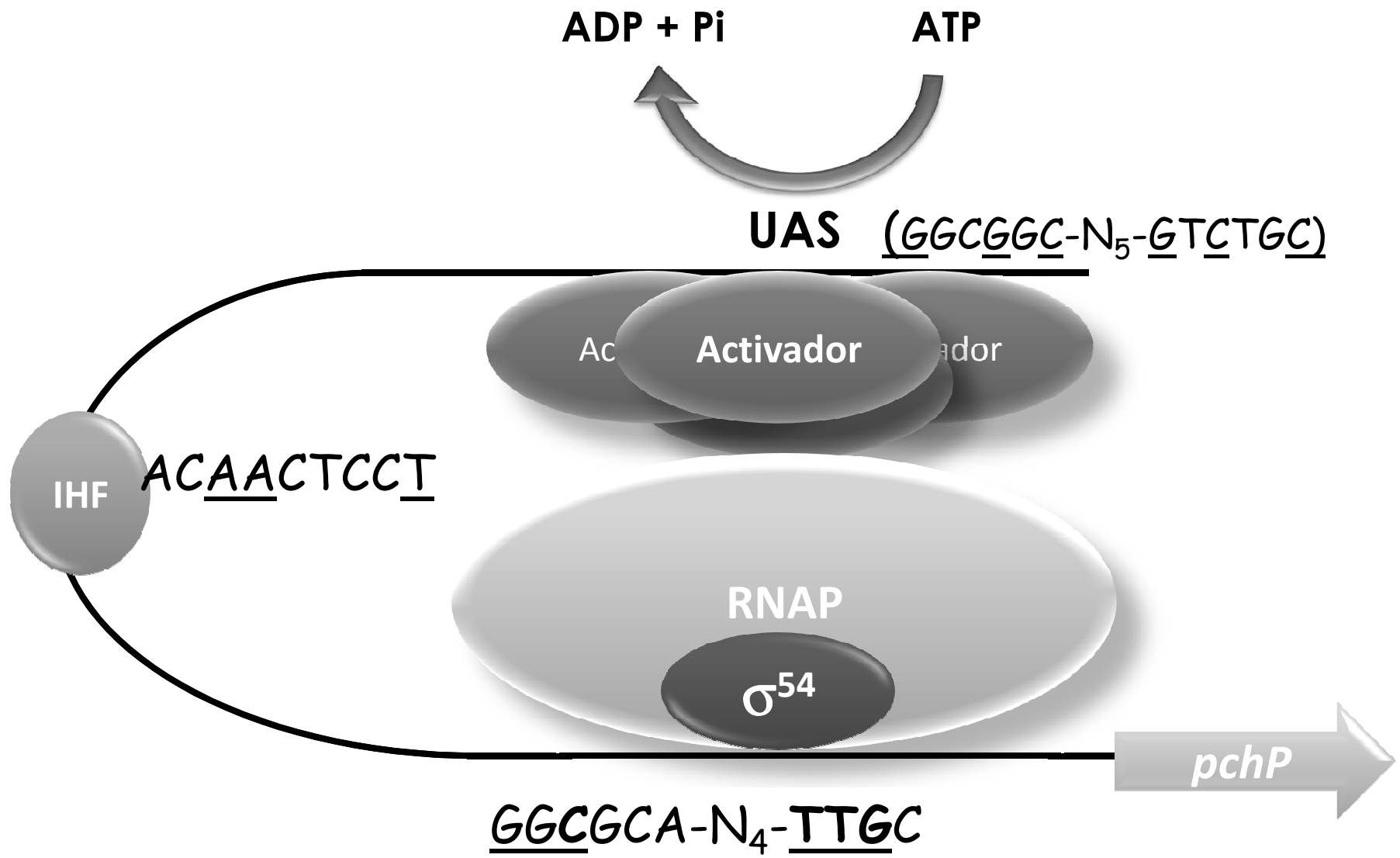
Secuencias consenso para δ^{54} o
RpoN

-12 (GC) -24(GG)

TTGC-N4-GGCGCA







Factores sigma con funciones extracitoplasmamáticas (ECF)

- *Pequeñas proteínas regulatorias, diferente en secuencia con respecto a la mayoría de los factores sigma.
- *Se co-transcriben con uno o mas reguladores negativos
- *En general, los reguladores negativos son proteínas transmembrana que funcionan como factor anti-sigma.
- *Los anti-sigma/sigma son sistemas de dos componentes

Bacillus subtilis: 7

Mycobacterium tuberculosis: 10

Caulobacter crescentus: 13

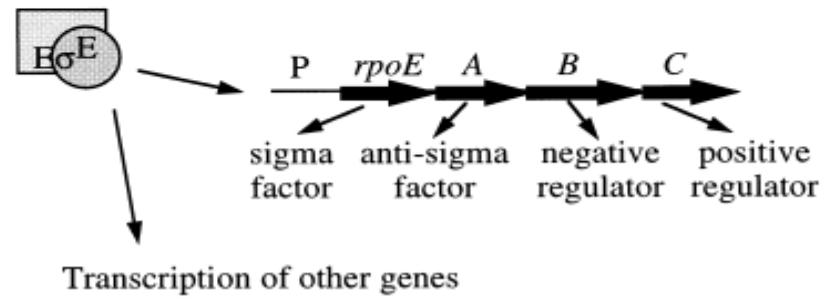
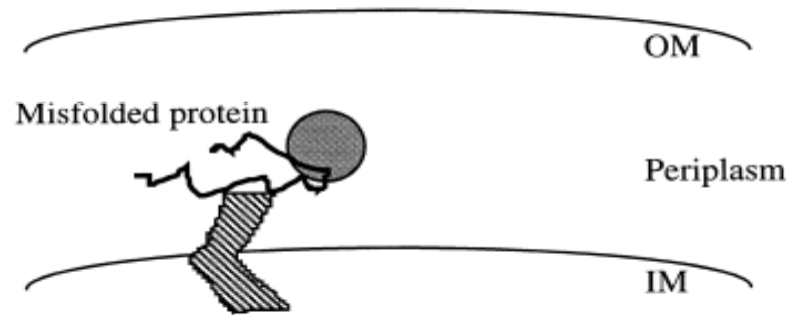
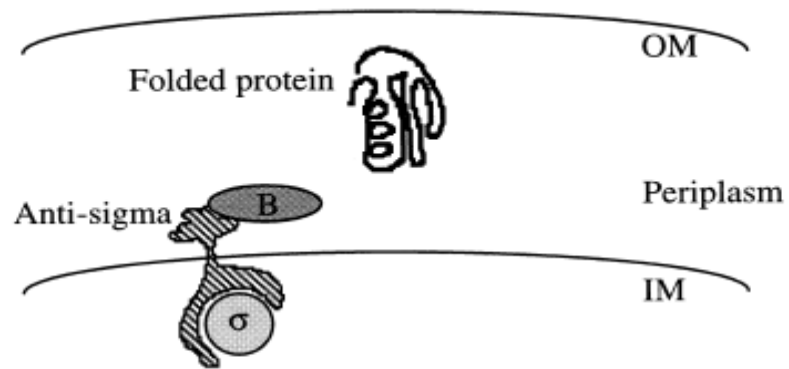
Pseudomonas aeruginosa: 19

Streptomyces coelicolor: 50

Ejs: biosíntesis de alginatos y carotenoides. Transporte de Fe (*P. aeruginosa*); Respuesta al shock térmico (*E. coli*).

Secuencias consenso de promotores dependientes de δ^E .

	-35 box	nt spacing	-10 box
<i>E. coli</i>			
rpoHP3	GAACTT	16 bp	TCTGA
htrA	GAACTT	16 bp	TCTGA
rpoEP2	GAACTT	16 bp	TCTGA
fkpAP2	AAACTA	16 bp	TCTGA
ompKP2	GAATTT	16 bp	TCTTA
<i>P. aeruginosa</i>			
rpoHP3	GAACTT	16 bp	TCAGA
algU	GAACTT	16 bp	TCTAT
algD	GAACTT	16 bp	TCCTA



Factores transcripcionales (TFs)

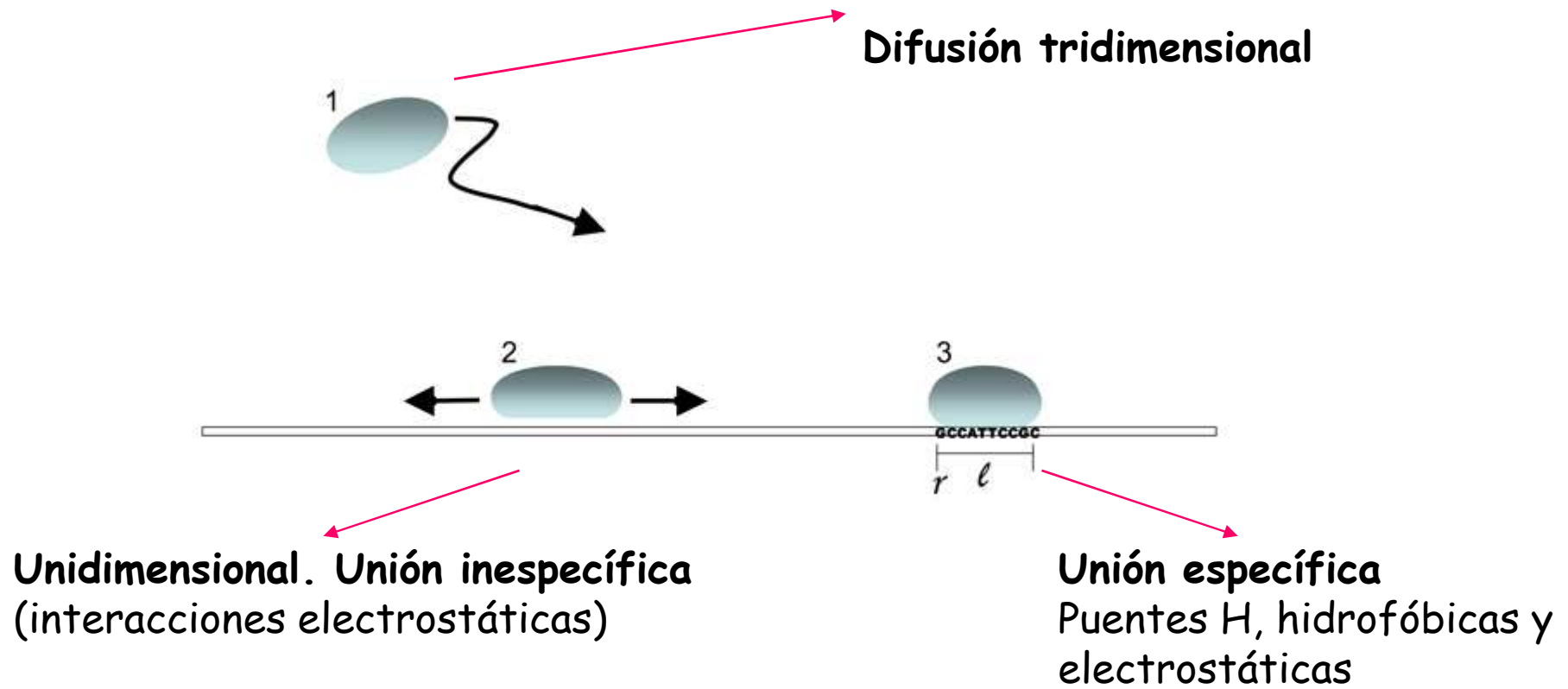
*Junto a factores σ guían a la RNAP hacia un promotor específico. Selectividad.

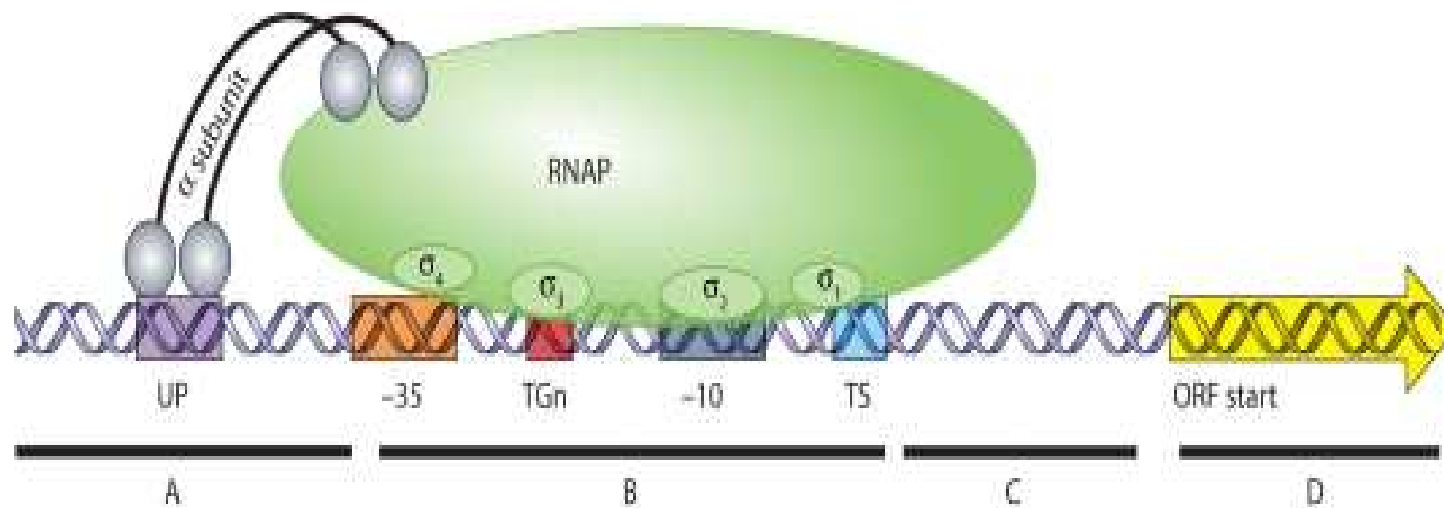
*Controlan la transcripción: activando o reprimiendo. (Regulación de la expresión génica).

*Sus TFBSs ocupan de 12 a 20 pb y en general son secuencias repetidas o palíndromes.

*En general son homo dímeros y tienen la estructura de hélix-turn-helix.

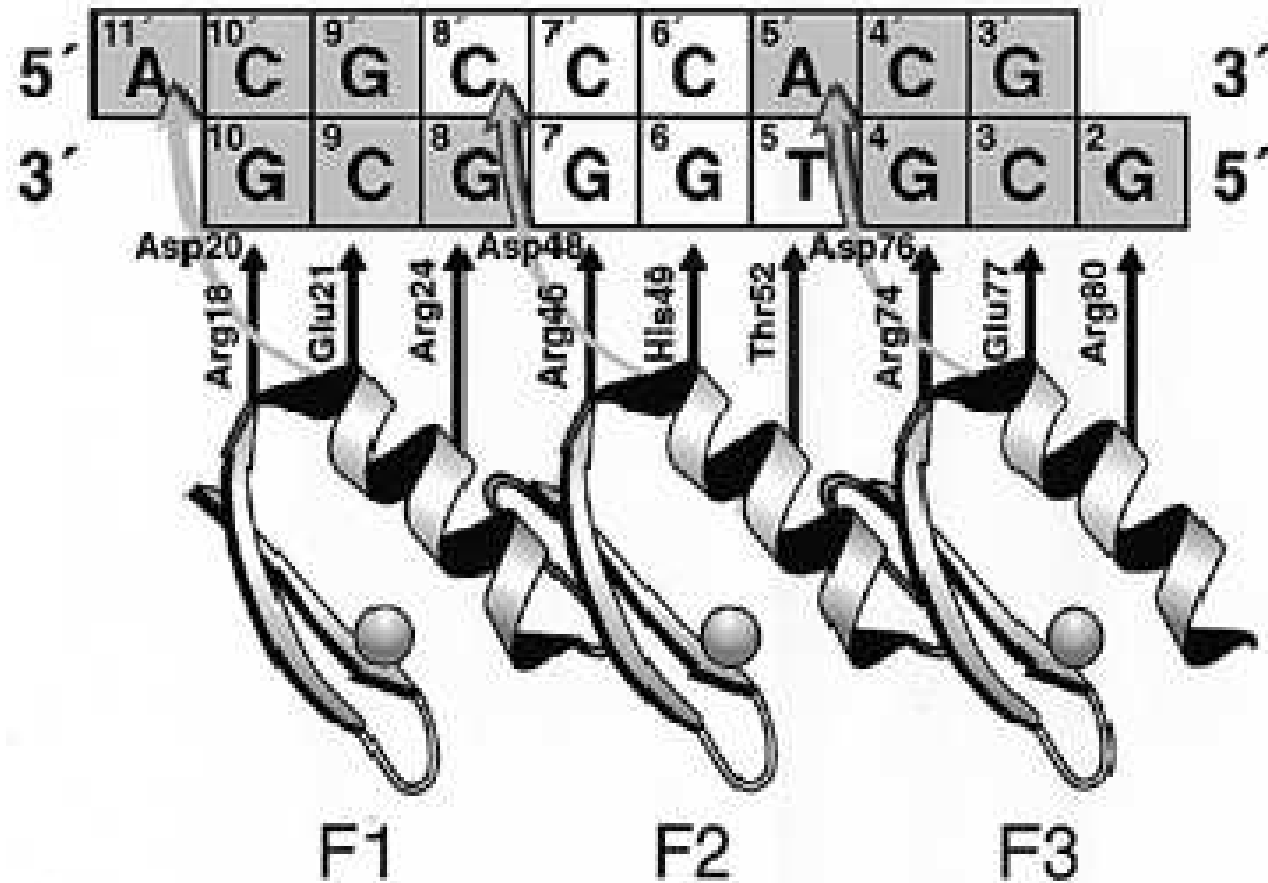
Estado termodinámico de los TFs





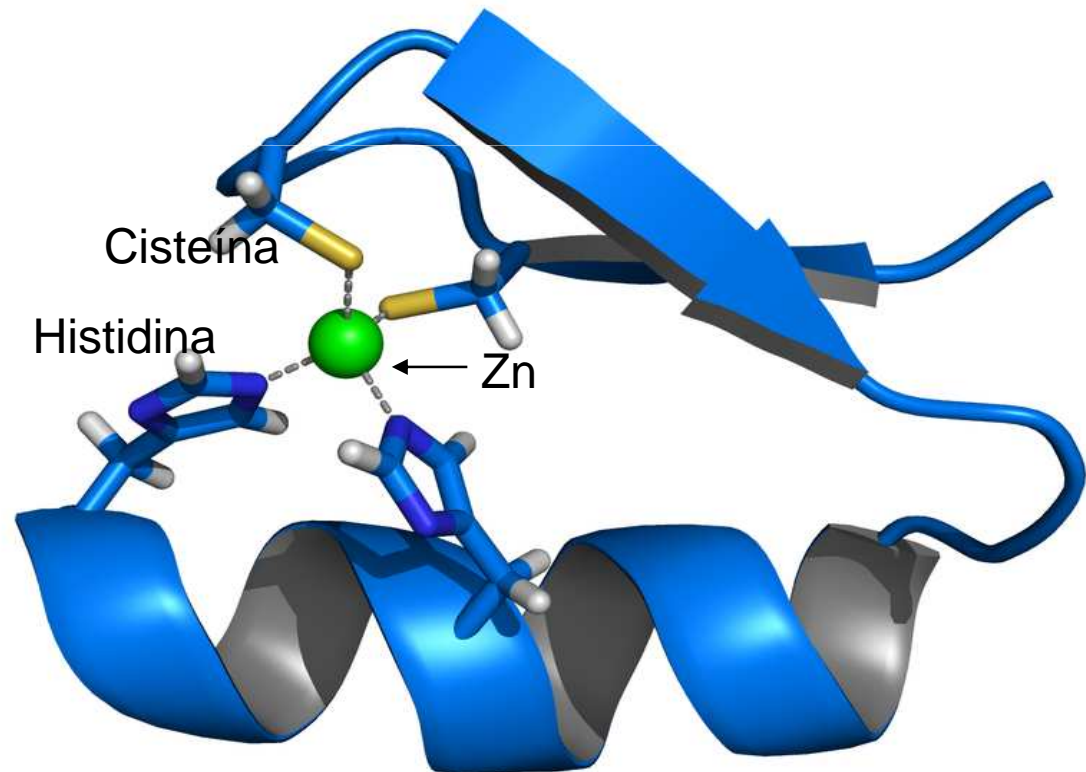
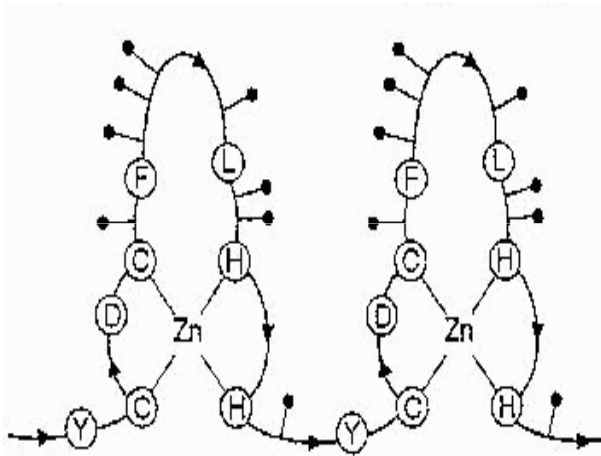
Type	Mechanism	Action	TF binding			
			upstream (A)	core promoter (B)	downstream (C)	ORF (D)
repression	Steric hindrance	No RNAP binding		+		
repression	Roadblock	No transcription elongation			±	+
repression	DNA looping	No RNAP binding	+		+	±
repression	Activator modulation	Prevents activator binding	±	±		
activation	Class I	Interaction α subunit RNAP	+			
activation	Class II	Facilitates σ factor binding	+			
activation	DNA conformational change	DNA helix twist		+		
activation	Repressor modulation	Prevents repressor binding	±	±	±	±

Proteína regulatoria interaccionando con surco mayor del DNA

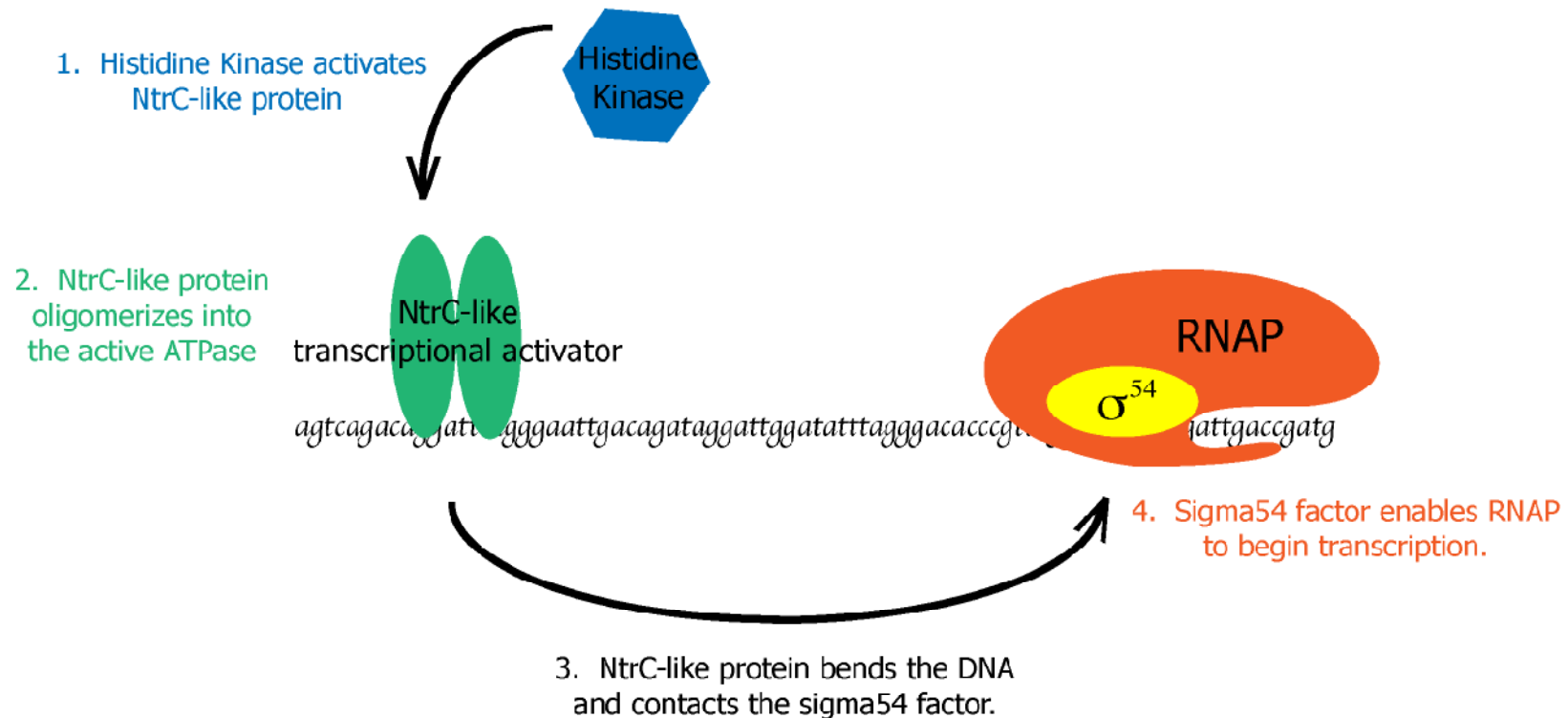


Choo, *Nucleic Acids Research*, 1998

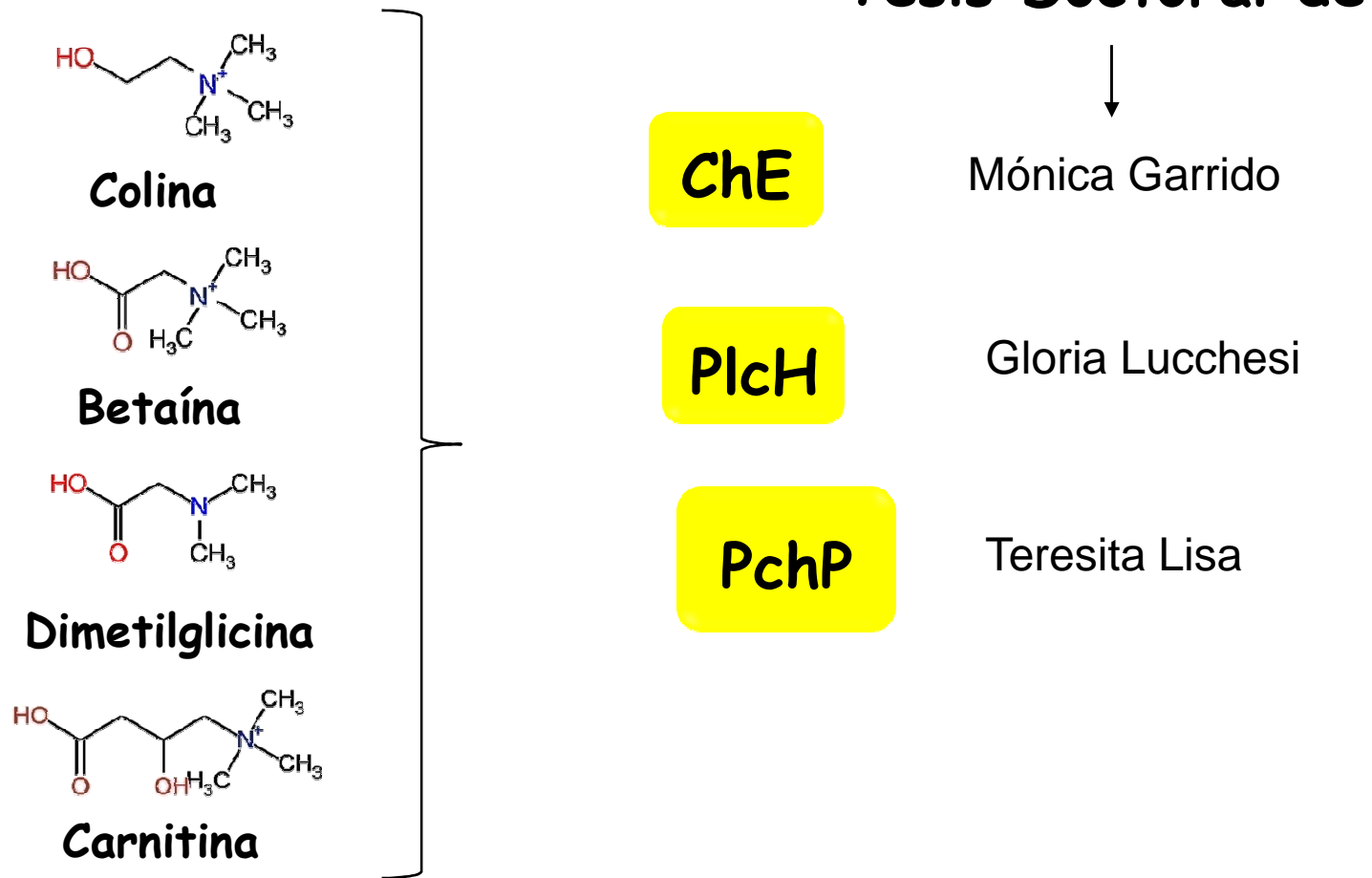
Estructura "dedos de Zn"



Sistemas de dos componentes. Proteínas que regulan la expresión génica (NtrC, CbrB, etc).

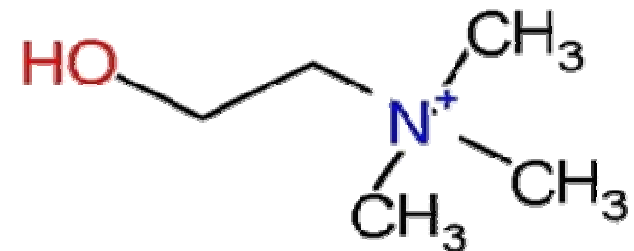
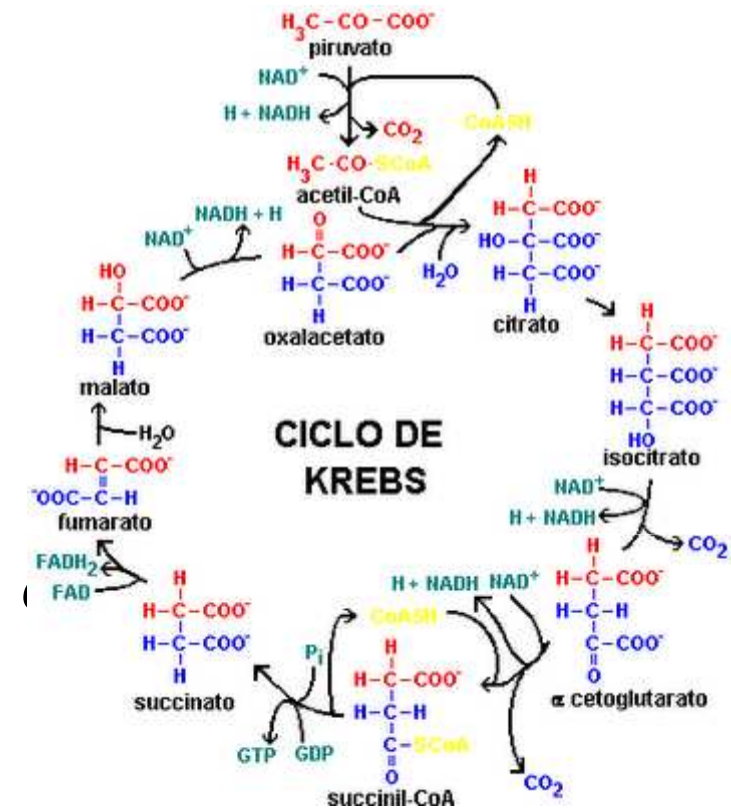


Cuando *P. aeruginosa* consume colina, betaína, dimetilglicina, o carnitina produce AchE, PlcH y PchP



Pseudomonas aeruginosa

- Bacteria Gram-negativa
- Patógeno oportunista
- Resistente a amplio espectro de antibióticos.
- Gran versatilidad metabólica
- Infecciones pulmonares crónicas en pacientes con Fibrosis Quística.
- Capáz de utilizar **colina** como única fuente de C y N y como osmoprotector.



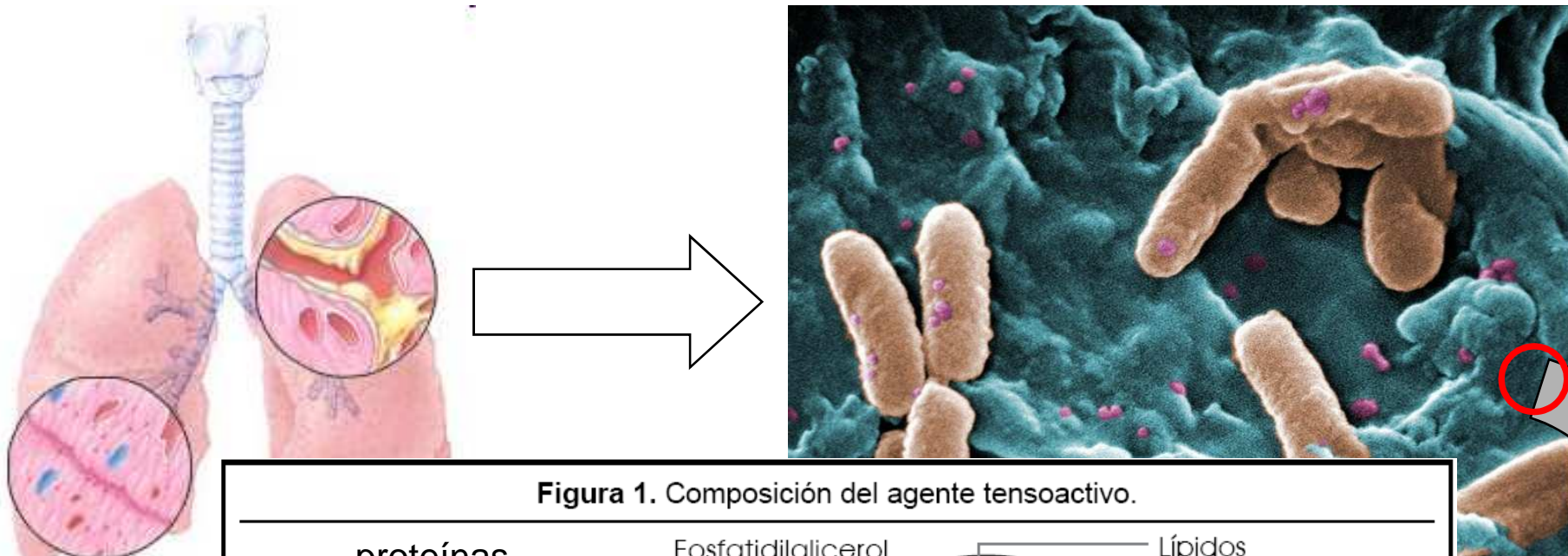
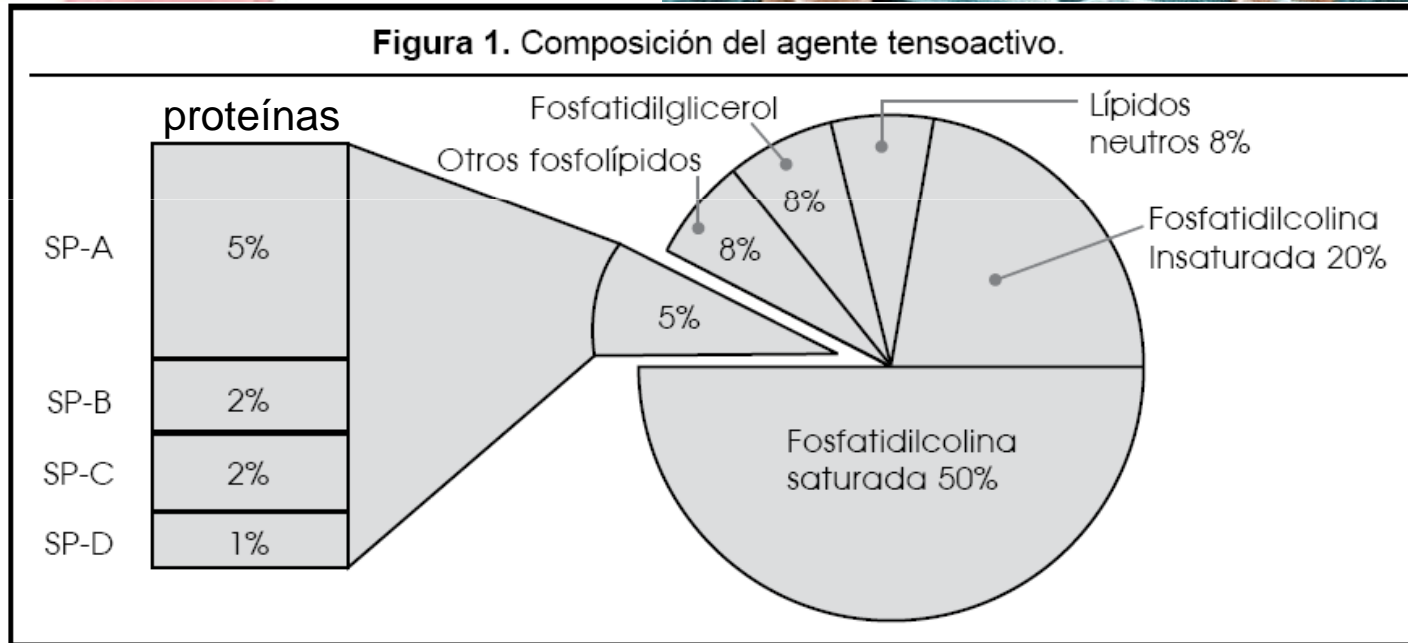
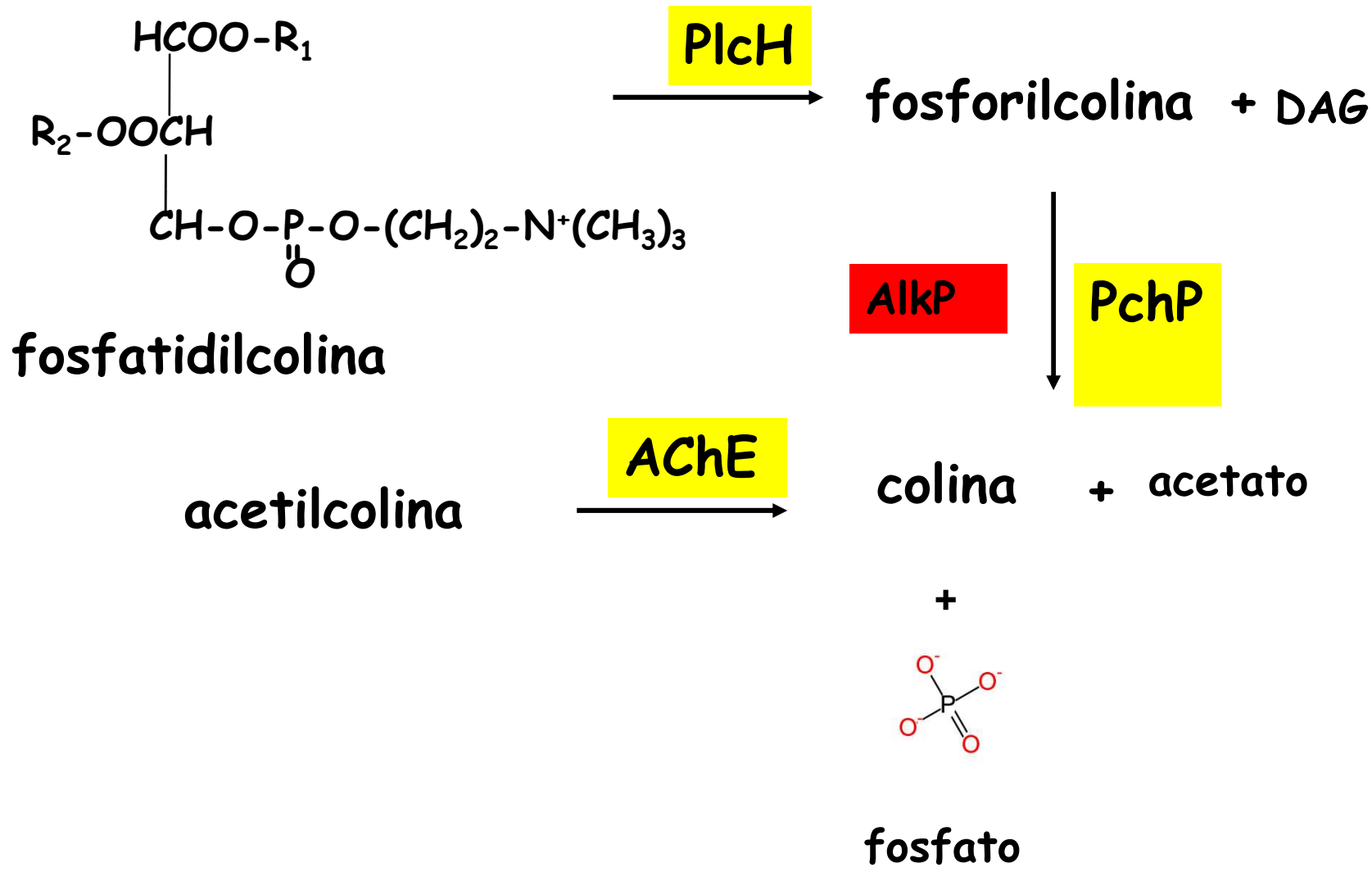


Figura 1. Composición del agente tensoactivo.



Fosfatidilcolina es considerado el principal componente tensoactivo, al proporcionar estabilidad alveolar y disminuir la tensión superficial



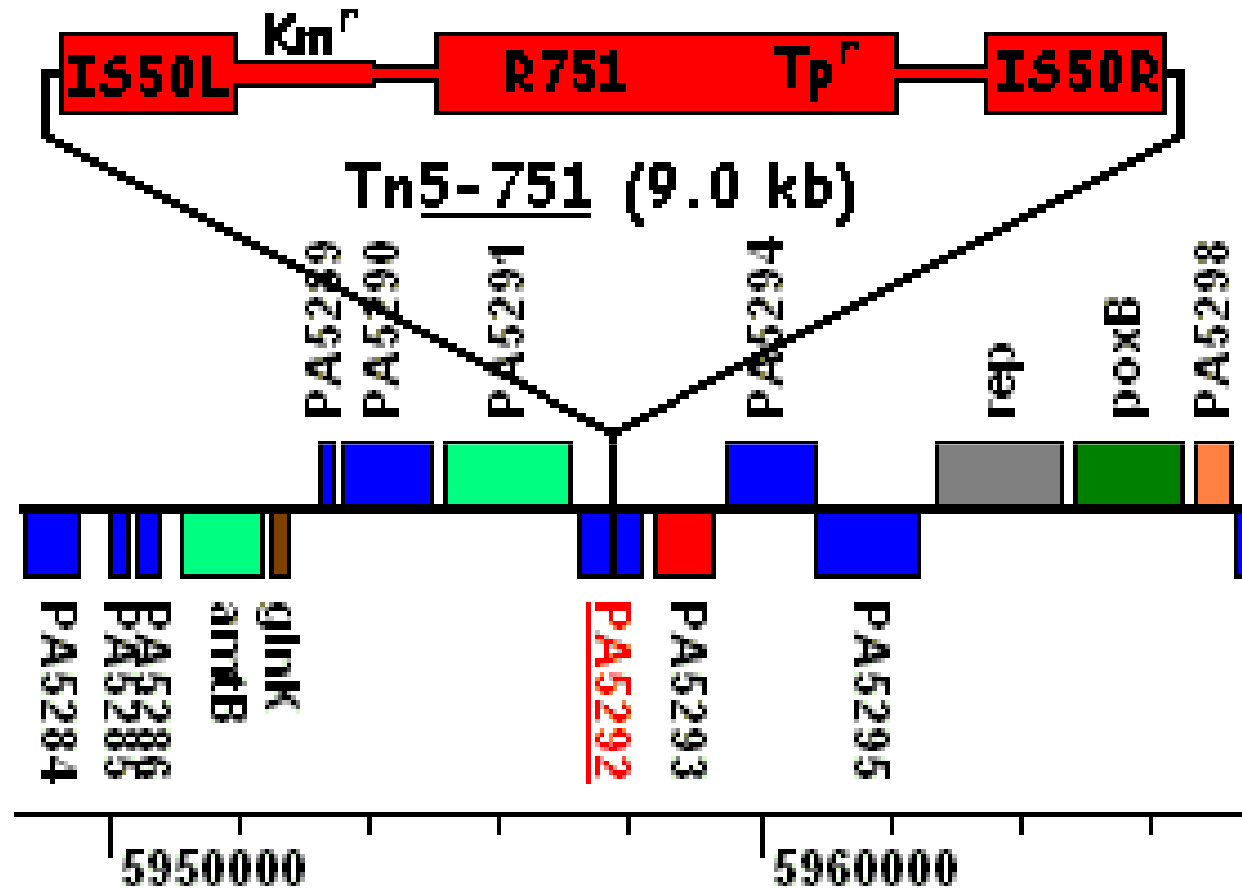
Objetivos del laboratorio :

- Localizar el gen que codifica para PchP
- Localizar el gen que codifica para ChE
- Estudiar la regulación a nivel transcripcional de *pchP*, *achE* y otros genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de colina: PA5398 (*cbcX*), PA5380 (*gbdR*).
- Sobreexpresar las proteínas para estudios bioquímicos y biofísicos.

Objetivo 1

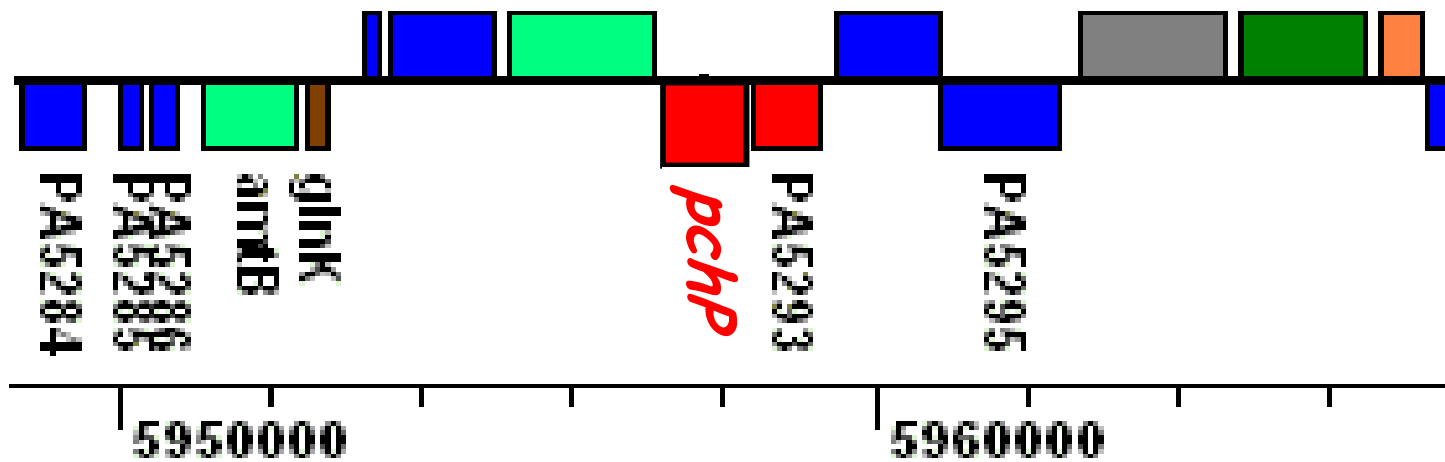
- Localizar el gen que codifica para PchP
- Estudiar la regulación del gen *pchP*
- Sobreexpresar la proteína

Inserción de TN5-751 en el genoma de PAO1



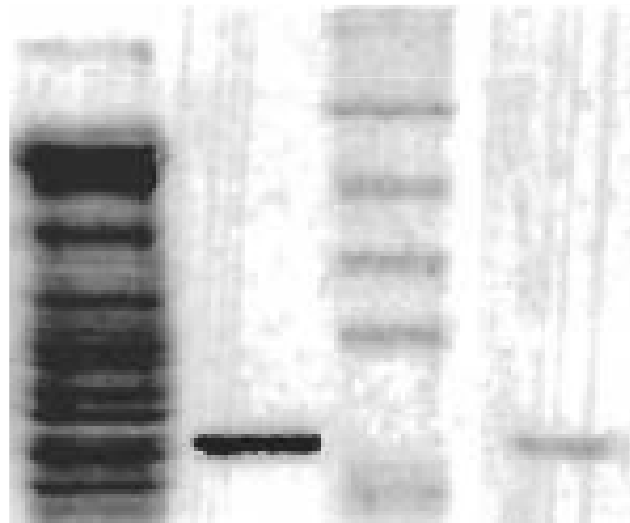
➔ Cepa PchP(-)

PA5292 → *pchP*

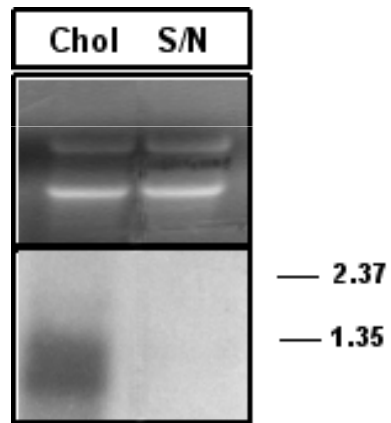
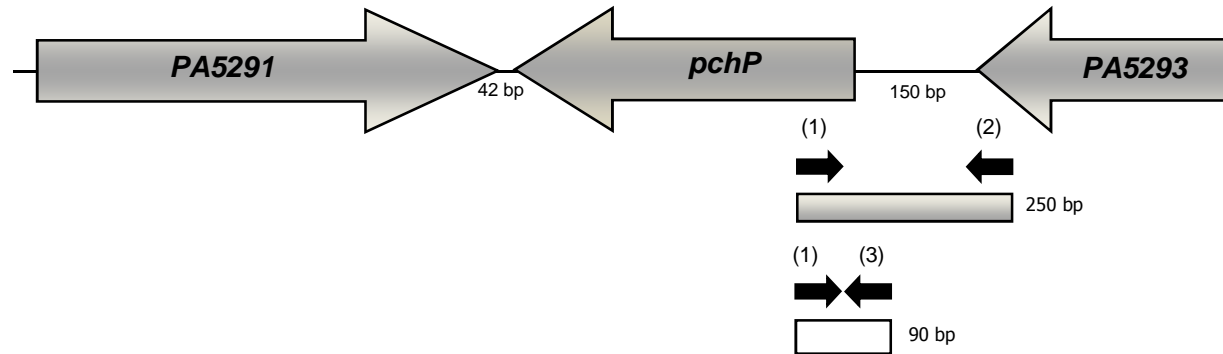


Sobre-expresión de PchP recombinante

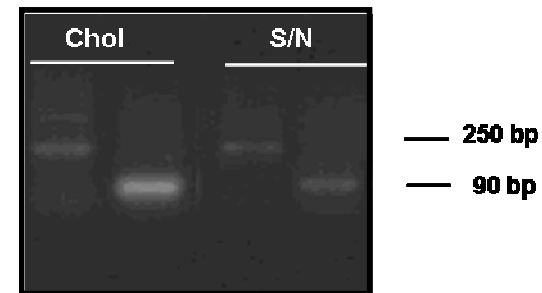
Coomassie Brilliant Blue Western blot



Contexto genómico de *pchP*



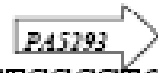
Northern blot



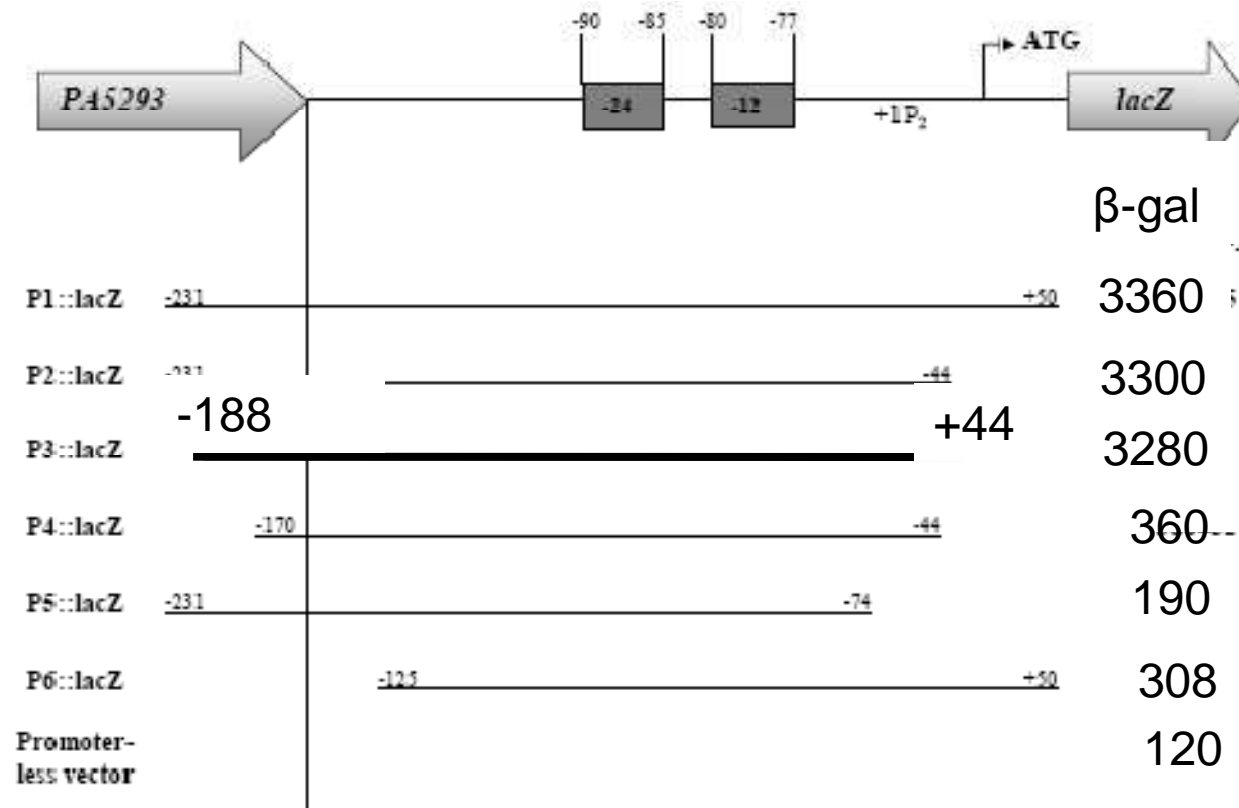
RT-PCR

Análisis de la secuencia intergénica PA5293-PA5292

5958489	GGAAOGCTTCCAGCGATTGCGCGACTT CCTCCTCGCGGAGGT	-191
5958447	<u>GGCGCGGATGCGTCTGCCCCGTCTCGACGCGGCTCGCGCTGACG</u>	-149
	EBP	
5958405	COGCOGGACA <u>ACTCCTGGCGCTGACGOGA</u> CGTTACAGGTOGC	-107
	LHF'	
5958363	TGCCGTGCTGGGCGCGGGCGCAGGGT TTGCGCTAGGGTCGTT	-65
	-24 -12	
5958321	GGTCGTTG CCTGTGCGGAGCGGCAGGGGACGGAGCTTCCTTC	-23
	+1P2 +1P1	
5958279	CAACCGCCCAAGGAA <u>CCCGCCATGAC</u> CTTCGCCAAAGGAAT	+20
	SD	
5958237	ACTCGCCGCGCTGGCGCTCGCCGCGCAGTCGGCCAGG	+59



Región mínima necesaria para expresar el promotor de *pchP*



Mutaciones sitio dirigida para sustentar que el promotor *pchP* es del tipo σ^{54}

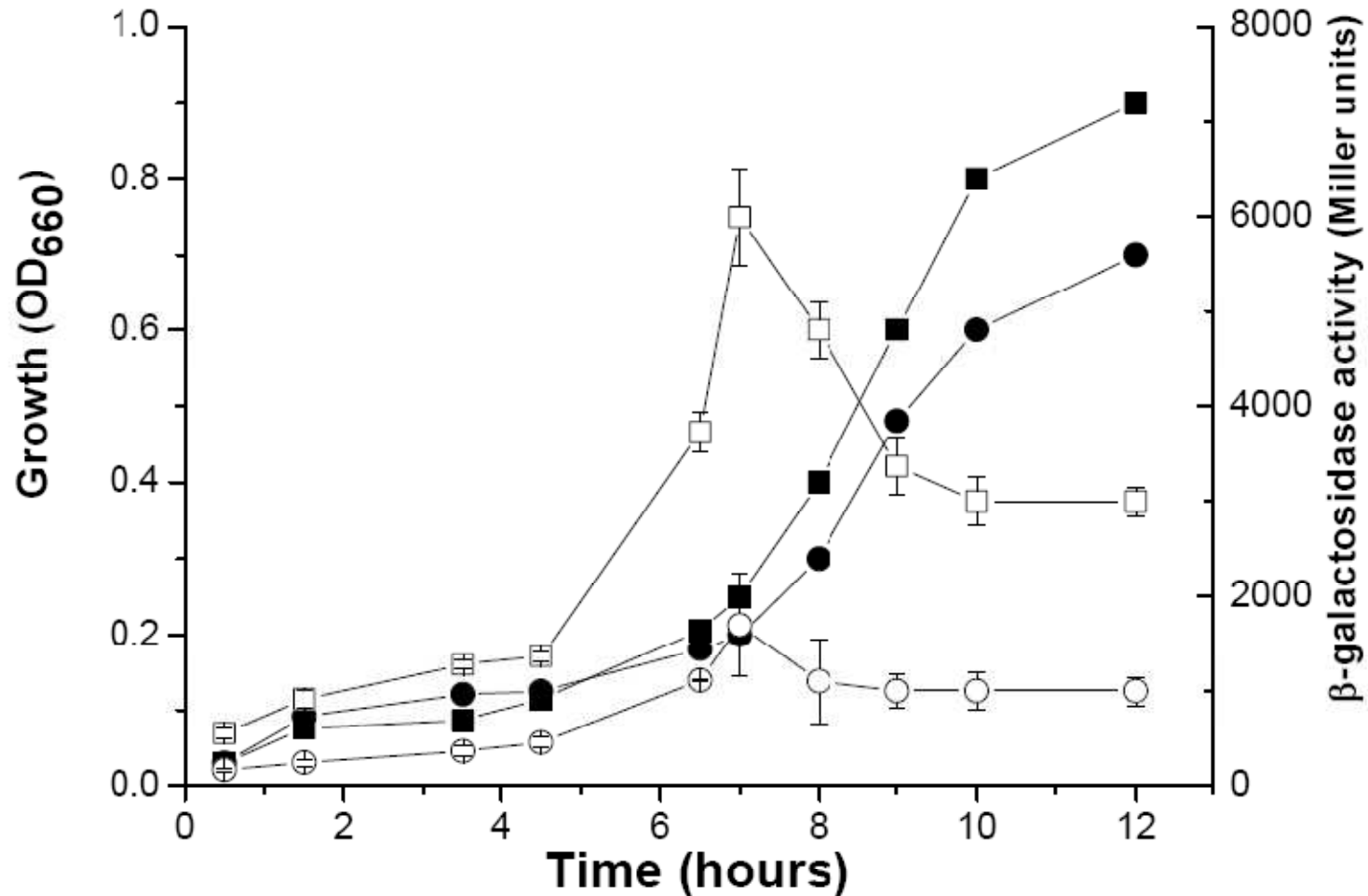
-Secuencia -24/-12: -90(GGCGCA-N₄-TTGC) -77

-90(GGCGCA-N₄-~~TTGC~~) -77

-IHF: -141 (ACAACTCCT) → -141(ACCCCTCCT)

-EBP (NtrC): -190 (GGCGGC-N₅-GTCTGC) -174

Cinética de la expresión del promotor en PAO1::lacZ y $\Delta\sigma^{54}$::lacZ, crecidas en colina (C y N)



Objetivo 2: Localizar el gen de AchE

- Mutaciones al azahar.
- Homología con otras AchE de diferentes orígenes.
- Purificar la proteína, secuenciar.

Inicios de los aspectos moleculares de PPX de *P. aeruginosa*

- Localización de la región promotora.
- Expresión del promotor, *p5241*, durante el crecimiento.
- Respuesta de *p5241*
 - a colina y otros compuestos nitrogenados
 - al stress osmótico

Parte molecular

De PchP:

Tesis doctoral de María Julia Massimelli

Tesis doctoral de Paola Beassoni

Trabajo Final de María Virginia Buchieri.

Trabajo Final de Agustina Llanos.

De PlcH:

Tesis doctoral de Marina Forrellad

Trabajo Final de Milagros Zafra

De AchE, CbcX, GbdR y PPX:

Diego Sánchez (Tesis doctoral)

Lucas Gallarato (Tesis doctoral)

Federico Santander (T. Final)

Emiliano Primo (T. Final)

Colaboración de: **Dr Enrique Morett y Leticia Olvera**

Colaboraciones

Cinética de PchP de diversas *Pseudomonas*:

Dr Carlos E. Domenech

Dra Paola Beassoni

Lisandro Otero (Tesis doctoral)

Mauricio Oyola (T. Final)

Christopher Kilmurray (T. Final)

Bioinformática y relación estructura función de proteínas:

Dra Paola Beassoni

Cristhian Boetsch

Cristalización de PchP:

Lisandro Otero-Armando Alberts de la Cruz