

Implicación del pequeño ARN SuhB en la represión catabólica de los genes de degradación de tetralina en *Shingopyxis granuli* estirpe TFA

Inmaculada García-Romero (igarrom@upo.es), Eduardo Santero y Belén Floriano

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica. Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide, ctra. Utrera Km 1, 41013 Sevilla (España)

Introducción

Shingopyxis granuli estirpe TFA es una α -proteobacteria capaz de utilizar el solvente orgánico tetralina como única fuente de carbono y energía (1). Los genes estructurales (genes *thn*) se organizan en tres operones principales (operón B, C y M; Fig. 1) que se inducen en presencia de tetralina (2,3). Formando parte del operón C se encuentran los genes reguladores *thnR*, que codifica un regulador tipo LysR, y *thnY*, que codifica un co-activador de ThnR. En ausencia de tetralina, el operón *thnRY* tiene una expresión basal desde un promotor interno constitutivo. Además, la expresión de los genes *thn* está sujeta a represión catabólica por fuente de carbono preferencial, como el β -hidroxibutirato (β -HB), no conociéndose los elementos que intervienen en este fenómeno. Los únicos mutantes obtenidos hasta el momento que muestran una desrepresión parcial de los genes *thn* están afectados en la síntesis del gránulo de reserva de polihidroxibutirato. El software Infernal 1.1 predice en el genoma de TFA un gen que codifica un pequeño ARN perteneciente a la familia RF00519 (SuhB) que sólo se ha descrito hasta el momento en α -proteobacterias. El papel de SuhB en la regulación de los genes *thn* en TFA se describe en este póster.

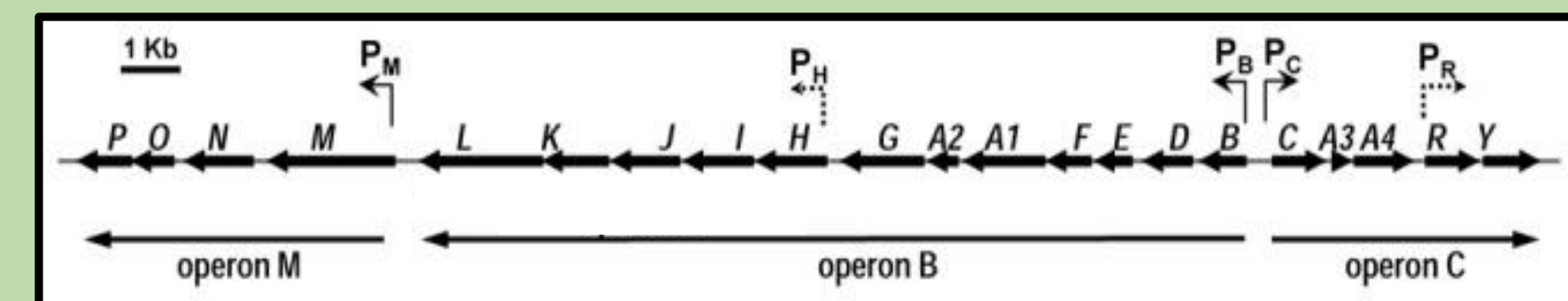


Figura 1. Organización génica de los genes *thn* estructurales y reguladores en el genoma de TFA, imagen obtenida de la referencia (4).

1. SuhB se expresa sólo cuando hay β -HB (fuente de carbono preferencial) en el medio de cultivo

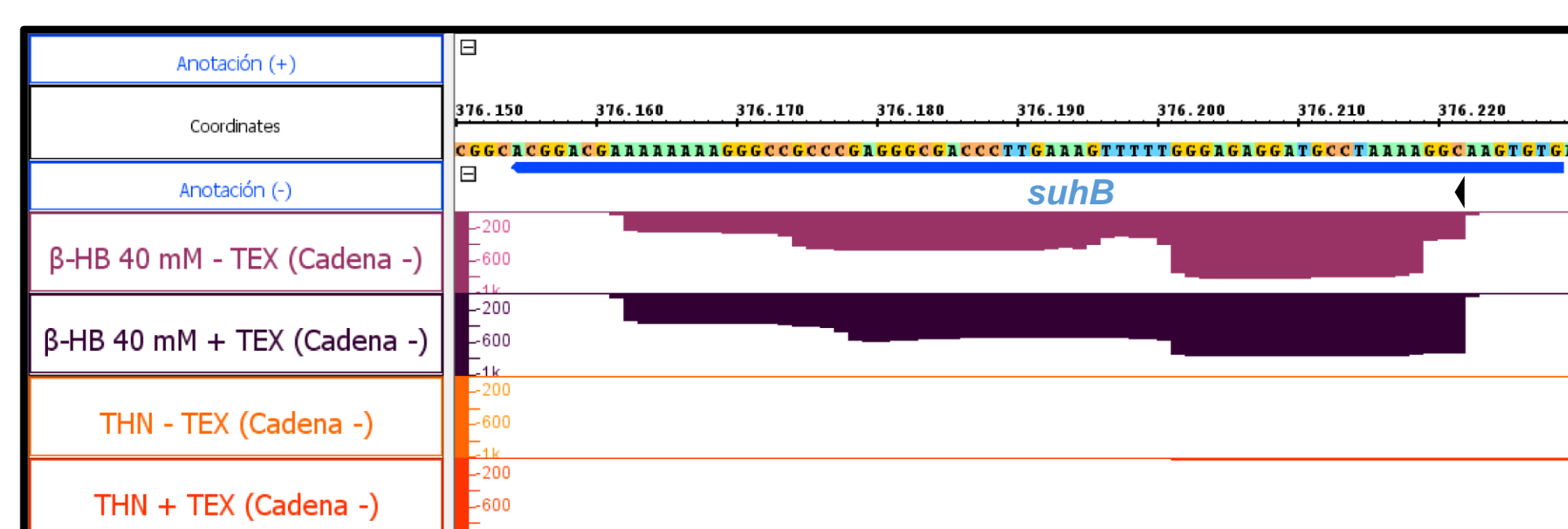


Figura 2. Expresión de SuhB (datos de dRNA-seq) en células de TFA creciendo exponencialmente en β -HB 40mM o en tetralina. Se muestran los resultados de las muestras tratadas y no tratadas con TEX como se describe en (5). Se indica con una flecha negra la predicción del inicio de la transcripción por TSS-Predator y en azul la predicción de SuhB por Infernal 1.1, que es algo mayor que el transcrito detectado por Northern blot (ver Fig.4).

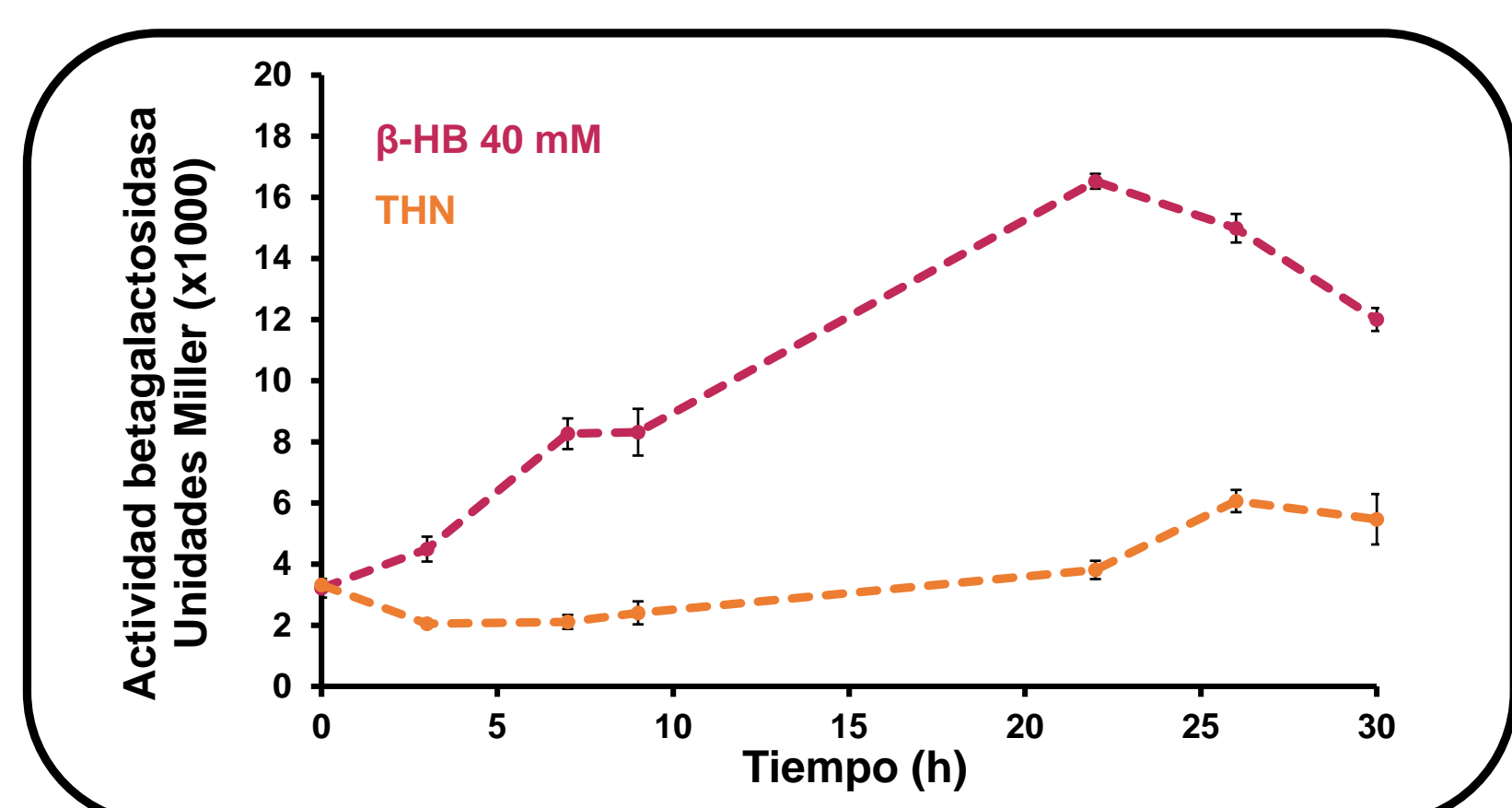


Figura 3. Expresión de una fusión transcripcional *suhB::lacZ*, insertada en el genoma de TFA, durante el crecimiento en tetralina o en β -HB 40mM.

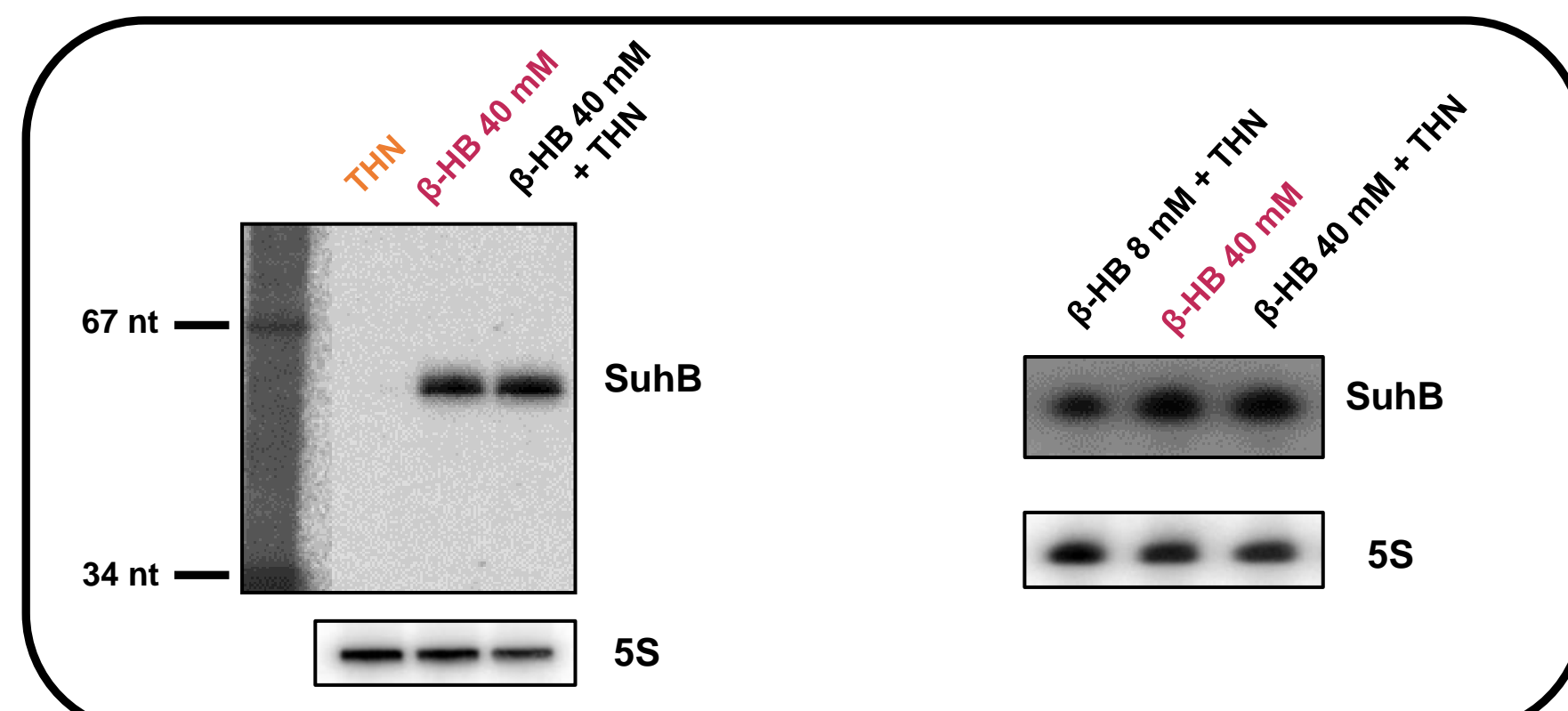


Figura 4. Detección de SuhB mediante Northern blot usando 5 μ g de ARN aislado de células de TFA en crecimiento exponencial en las distintas condiciones. Se muestra como control el ARNr 5S.

2. Desrepresión parcial de los genes *thn* en un mutante Δ *suhB*

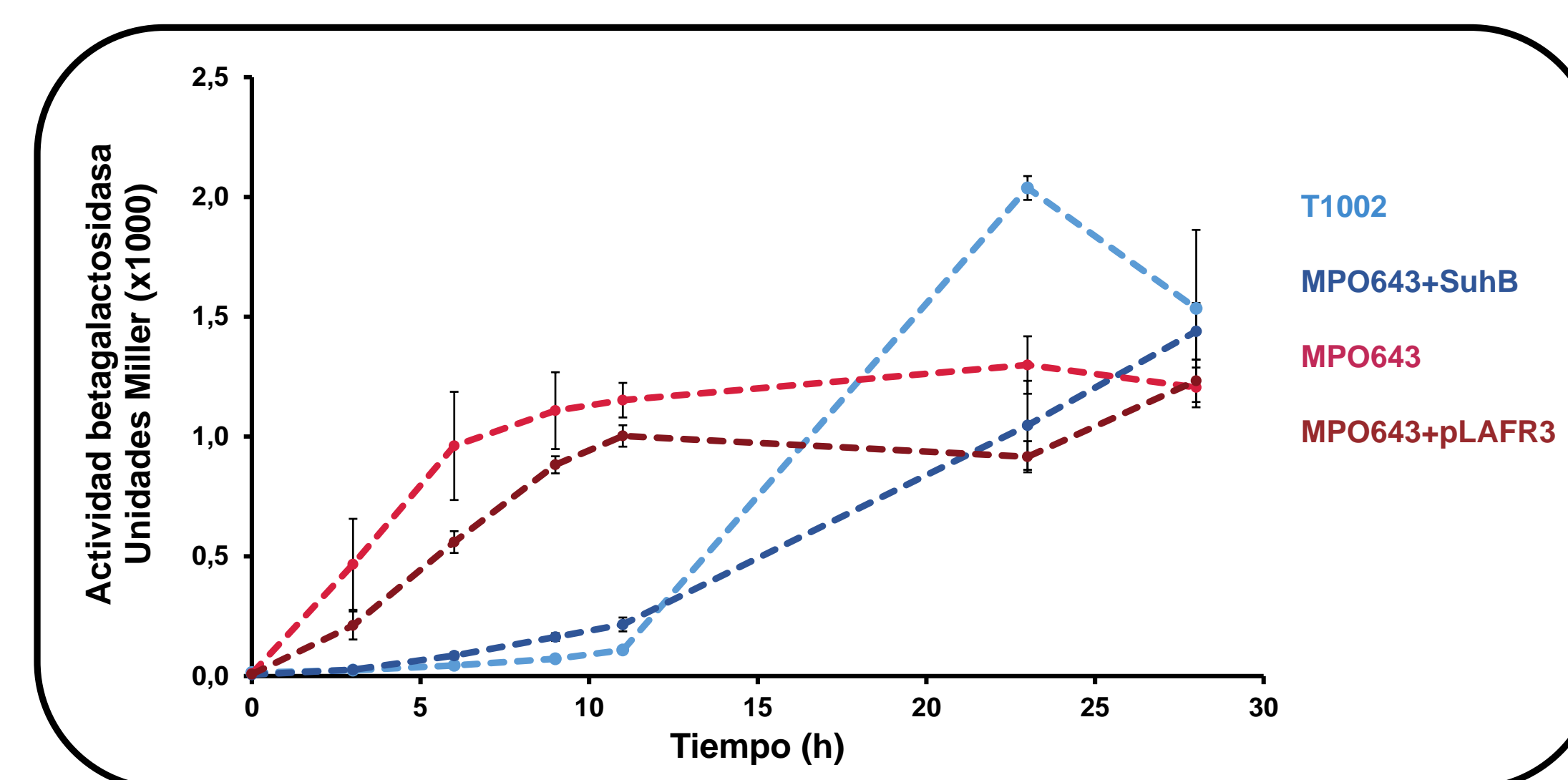


Figura 5. Expresión de una fusión traduccional *thnC::lacZ*, insertada en el cromosoma, en células de T1002 (TFA silvestre) y MPO643 (Δ *suhB*) y de MPO643+SuhB (expresado en *trans* desde su propio promotor en el vector pLAFR3) y MPO643+pLAFR3 creciendo en β -HB40mM+THN.

3. El 5' ARNm de *thnR* se predice como diana de SuhB

Gen ID	Energía (kcal/mol)	Descripción
SGRAN_0863	-20,1645	Proteína de fago
SGRAN_2804	-17,3418	Activador tipo LysR (ThnR)
SGRAN_1169	-16,4538	Proteína conservada
SGRAN_3690	-16,2232	Proteína no caracterizada
SGRAN_1703	-16,1985	Proteína no caracterizada

Tabla 1. Genes con mejor energía de interacción (< -16 kcal/mol) con SuhB según IntaRNA, usando la secuencia comprendida entre 150 pb aguas arriba y 150 pb aguas abajo del inicio de la traducción de todos los genes de TFA.

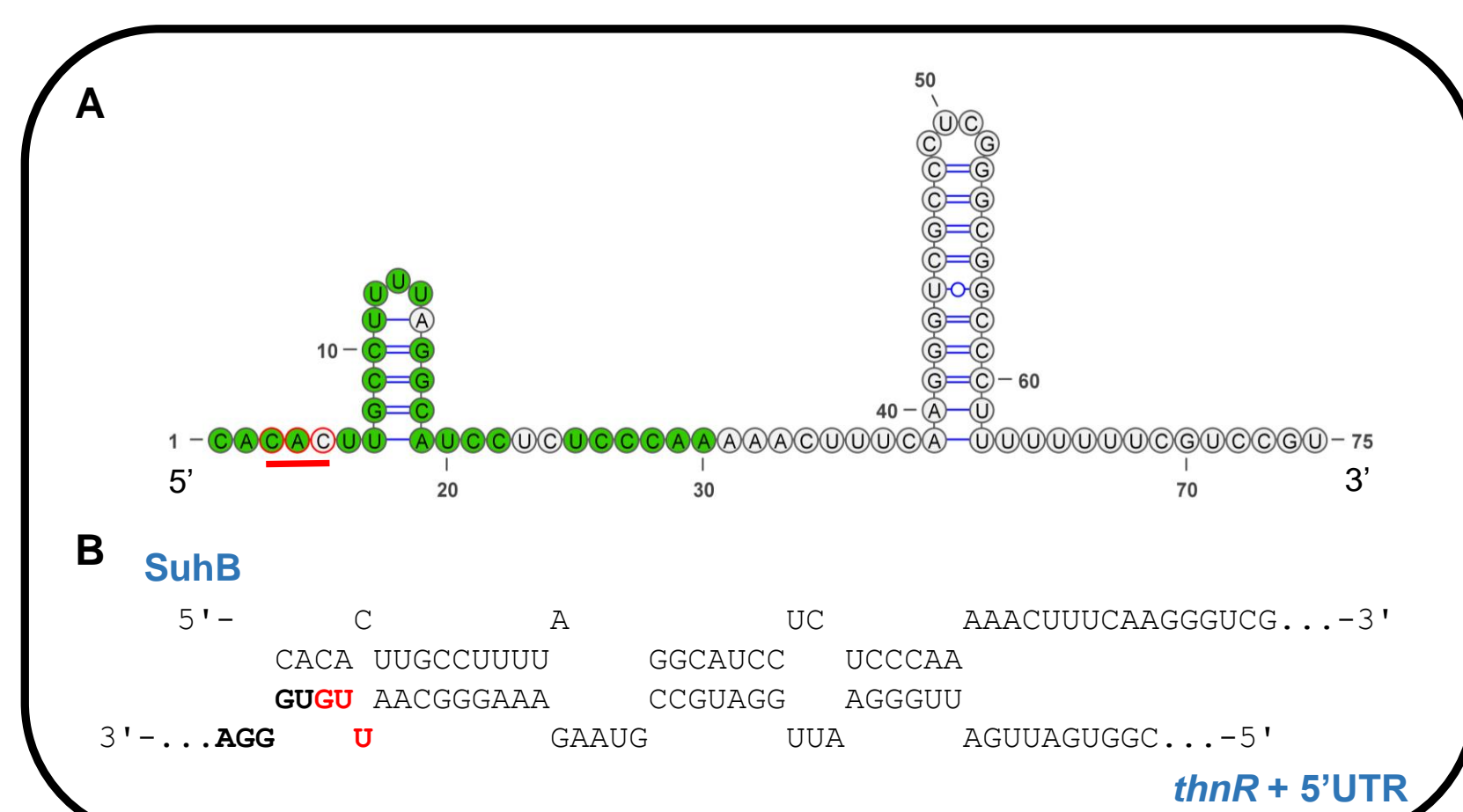


Figura 6. (A) Estructura de SuhB predicha por RNAfold, en verde se marcan los nucleótidos que interaccionan con *thnR*. En rojo se marca la región de SuhB donde se une el inicio de la traducción de *thnR*. (B) Interacción entre 5' UTR de *thnR* y SuhB predicha por IntaRNA. En rojo se marca el codón de inicio (UUG) de *thnR*.

4. La cantidad de ThnR aumenta en ausencia de SuhB

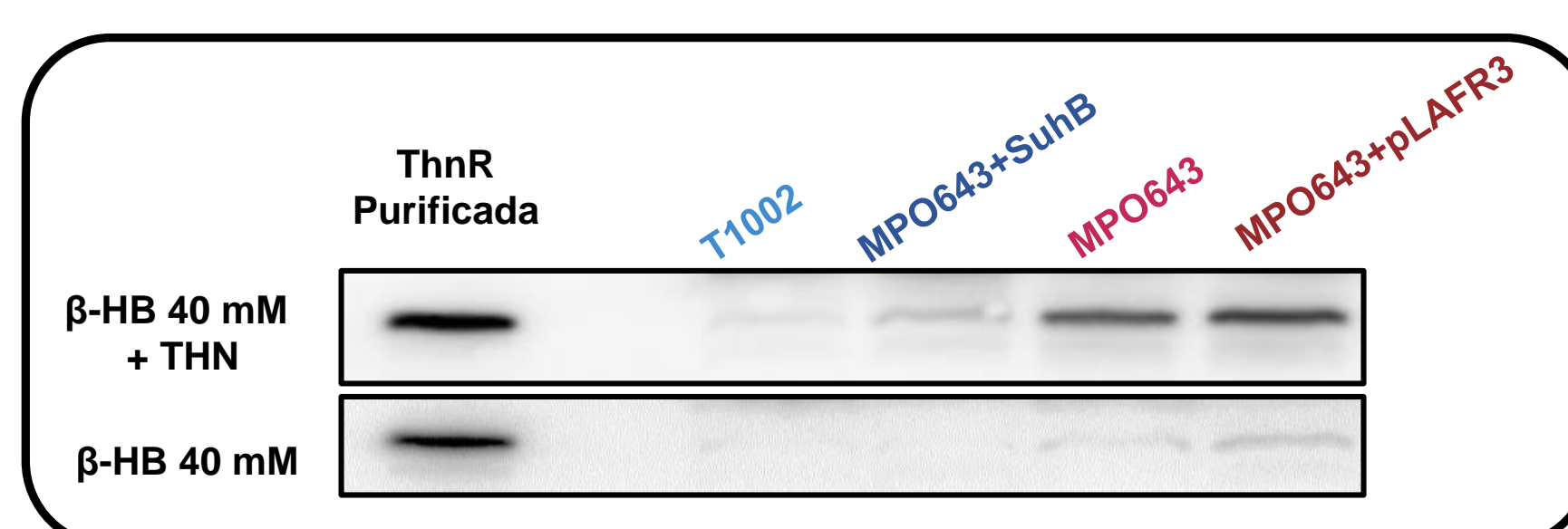


Figura 7. Detección de ThnR mediante Western Blot en las estirpes de la Figura 5 a las 10 horas de crecimiento en β -HB 40mM+THN o en β -HB 40mM.

5. SuhB interacciona *in vitro* con el 5'UTR de *thnR*

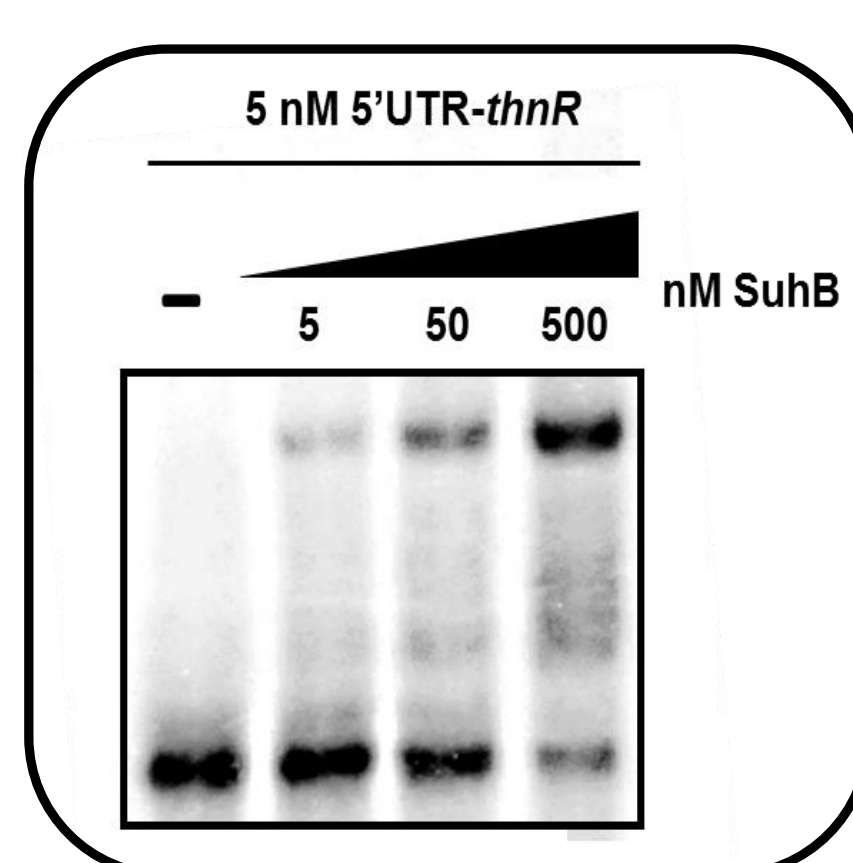


Figura 8. EMSA entre SuhB y *thnR*. Los ARNs (112 nt de *thnR* y 62 nt de SuhB) se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* con polimerasa de T7. Se marcó radiactivamente el 5' de *thnR* y se incubó con SuhB durante 60 min. Las mezclas se resolvieron en gel al 5% de acrilamida. La imagen se obtuvo usando un Typhoon 9410 tras ~14 horas de exposición.

6. SuhB y el 5' UTR de *thnR* co-inmunoprecipitan con Hfq

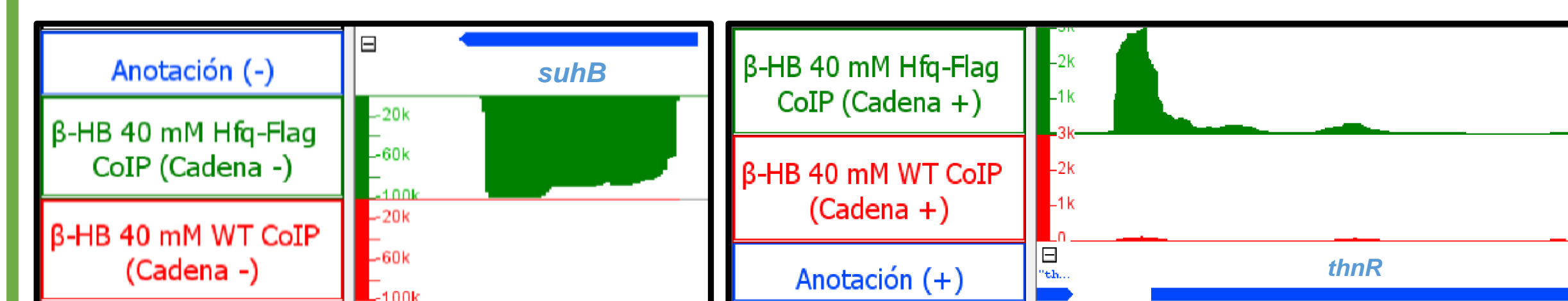


Figura 9. Cantidad de ARN de SuhB (izquierda) y del 5'UTR de *thnR* (derecha) co-inmunoprecipitado con Hfq_3xFlag (verde) y el control Hfq silvestre (rojo).

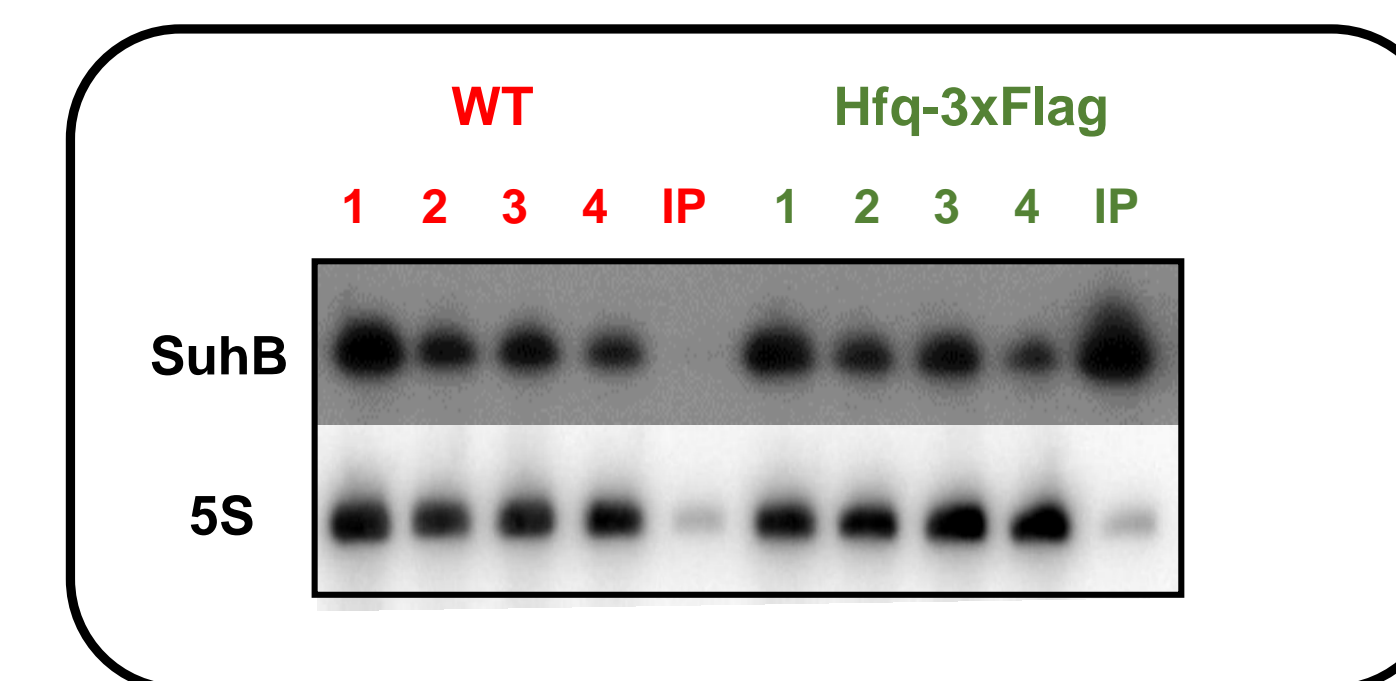


Figura 10. Detección de SuhB y ARNr 5S mediante Northern blot en el experimento de co-immunoprecipitación con anti-Flag. Cada muestra lleva 5 μ g de ARN aislado de 1, Células; 2, Lisado; 3, Tras incubación con anti-Flag; 4, Tras adición de Sefarosa-Proteína A; IP, Muestra inmunoprecipitada.

Conclusiones

- La expresión de SuhB en TFA depende de la fuente de carbono empleada.
- SuhB reprime parcialmente la expresión de los genes *thn* en condiciones de represión catabólica. La predicción *in silico* y el ensayo de EMSA sugieren que SuhB podría estar bloqueando el sitio de unión al ribosoma del ARNm de *thnR* impidiendo su traducción en presencia de β -HB.
- Hfq podría estar favoreciendo la interacción entre SuhB y el ARNm de *thnR*.
- Además de SuhB, otros elementos deben estar implicados en la represión catabólica de los genes *thn* ya que éstos se desrepresan parcialmente y en menor medida que en un mutante en la polimerasa de gránulos de PHB.

Referencias

- García-Romero I. *et al. BMC Genomics*. 2016;17:93. doi:10.1186/s12864-016-2411-1.
- López-Sánchez A. *et al. Mol. Microbiol.* 2009;73(6):1086-1100. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06834.x.
- Rivas-Marín E. *et al. Scientific Reports*. 2016;6:24538. doi:10.1038/srep24538.
- Ledesma-García L. *et al. PLoS One*. 2013; 12:8(9):e73910. doi: 10.1371/journal.pone.0073910.
- Dugar G. *et al. PLoS Genet*. 2013;9(5):e1003495. doi:10.1371/journal.pgen.1003495.

Perspectivas futuras

- Analizar la expresión de SuhB en otras fuentes de carbono para dilucidar si su inducción depende de la presencia de una fuente preferencial de carbono o sólo de β -HB.
- Estudiar los elementos que regulan la expresión de SuhB.
- Establecer experimentalmente qué nucleótidos son clave para la interacción entre SuhB y *thnR*.