



华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

细菌细胞中转录的空间组织机制

文献翻译： 王宇星、吴慧敏、孙冬青
PPT制作： 王宇星、吴慧敏、孙冬青
展示： 孙冬青



背景介绍



遇到问题：

在体外研究的转录结构和机制与体内具体的细胞现象无法联系起来

问题原因：

活体细菌细胞内环境复杂（异质性）
体外环境简单（同质性、混合均匀）

生物分子的亚细胞定位有影响



转录的空间组织机制

含义：

转录组份的胞内定位以及它们对转录活性的动态响应

功能：

不同分子组分的空间组织可能会提供一个新的体内转录调控方式



参与转录的4种主要分子

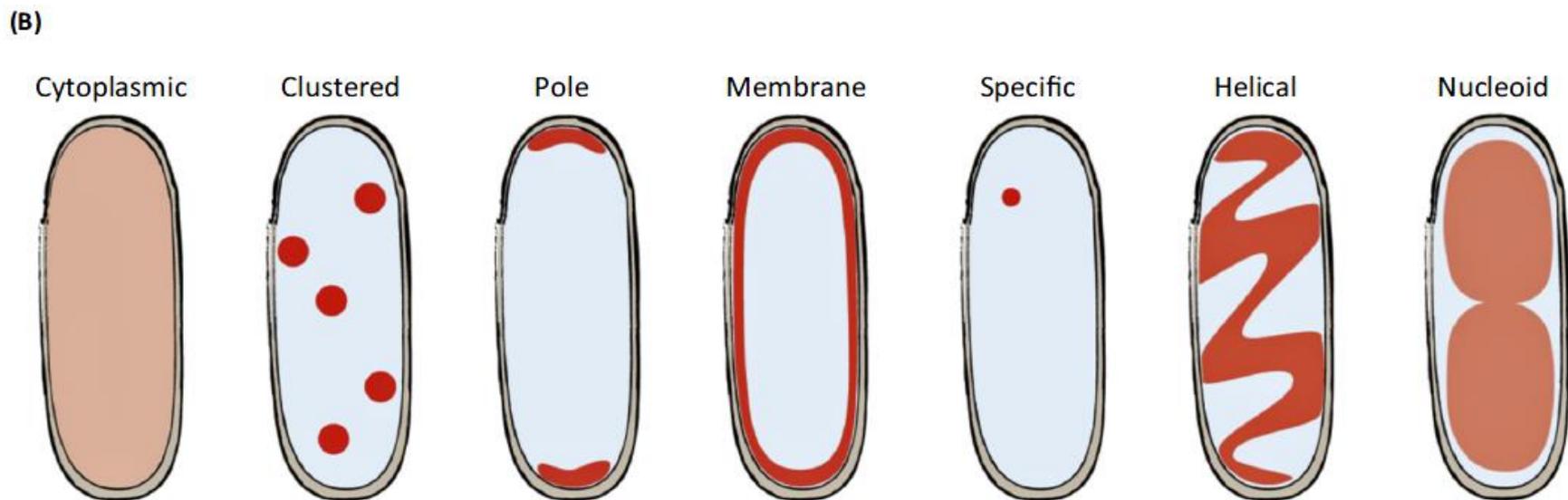
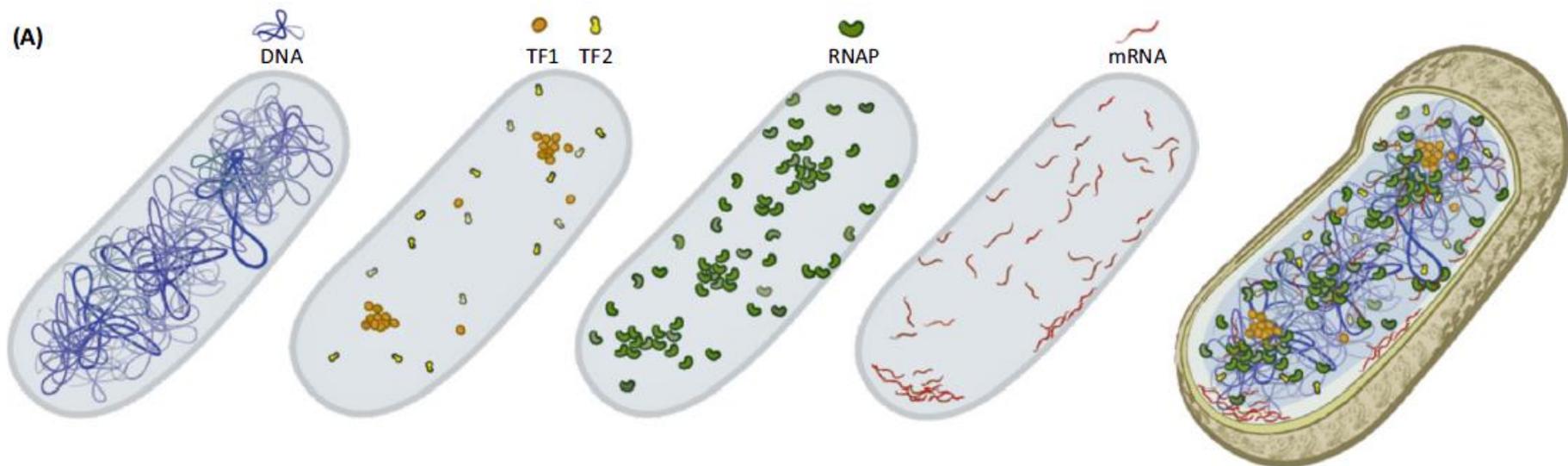
gene

转录因子

RNA聚合酶

RNA

转录的空间组织



技术、方法支持



单分子、单细胞成像技术以及高通量、大规模生化方法

Table 1. Summary of microscopy and biochemical methods used in detecting the spatial organization of transcription^a

Name	Target	Detection principle	Strength	Limitation	Refs
3C and derivatives	DNA	Fixation and cross-linking of genome interactions; detection is by PCR, immunoprecipitation, and/or sequencing	Capturing native interactions in one reaction High-throughput, large-scale detection of long-range genome interactions	Interaction frequencies inferred from cross-linking efficiency; low resolution (>10 kb)	[33]
FROS	DNA	Tandem arrays of DNA-binding sites are inserted chromosomally; detection is by binding of fluorescent protein fused to DNA-binding proteins	Live cell compatible Strong signal:noise ratio if hundreds of binding sites are used Enables tracking of chromosome positions in real time Orthogonal systems available: <i>lacO</i> -Lacl; <i>tetO</i> -TetR; <i>parS</i> -ParB	Tight binding of fusion proteins on DNA may be detrimental to cell physiology	[41]
RNA stem-loop motif-phage protein system	RNA	Tandem arrays of RNA stem-loops are inserted into genes of interest. Detection is by the binding of fluorescent protein fused to phage proteins that bind to the stem-loops	Live cell compatible Strong signal:noise ratio if multiple binding sites are used Enables the tracking of real-time RNA production and diffusion Orthogonal systems available: MS2-MCP; PP7-PCP; boxB-lambdaN	Tight binding of phage proteins on RNA stem-loops may alter RNA stability or inhibit translation	[94,104–106]

技术、方法支持



smFISH	RNA	Multiple complementary short DNA oligonucleotides labeled with organic fluorophores hybridize to RNA of interest	Detecting native RNAs Able to achieve single RNA molecule detection	Requires fixation; hybridization efficiency varies depending on sequence	[107,108]
PALM	Protein	Photoactivatable fluorescent protein fused to protein of interest. Stochastic photoactivation of single molecules allows for sub-diffraction limited precision in determining the position of molecules	Live cell compatible 15–30 nm spatial resolution achievable	Functionality of fluorescent protein fusions need to be verified	[71]
STORM	Protein and nucleic acids	Antibodies and/or oligonucleotides labeled with photoswitchable fluorophores to detect protein or nucleic acids; blinking of dye molecules allows for subdiffraction-limited precision in determining position of molecules	15–30 nm spatial resolution achievable	Usually requires fixation	[72]
SMT	Protein and nucleic acids	Spatial positions of fluorescently tagged single molecules are tracked at various time points	Enables measurement of diffusion behavior and binding and/or unbinding kinetics	Fluorophore bleaching and/or photoblinking limits length of tracking trajectories	[109]

^aAbbreviations: 3C, Chromosome Conformation Capture; FROS, fluorescent repressor-operator system; smFISH, single-molecule fluorescence *in situ* hybridization; PALM, photo-activated localization microscopy; STORM, stochastic optical reconstruction microscopy; SMT, single-molecule-tracking.

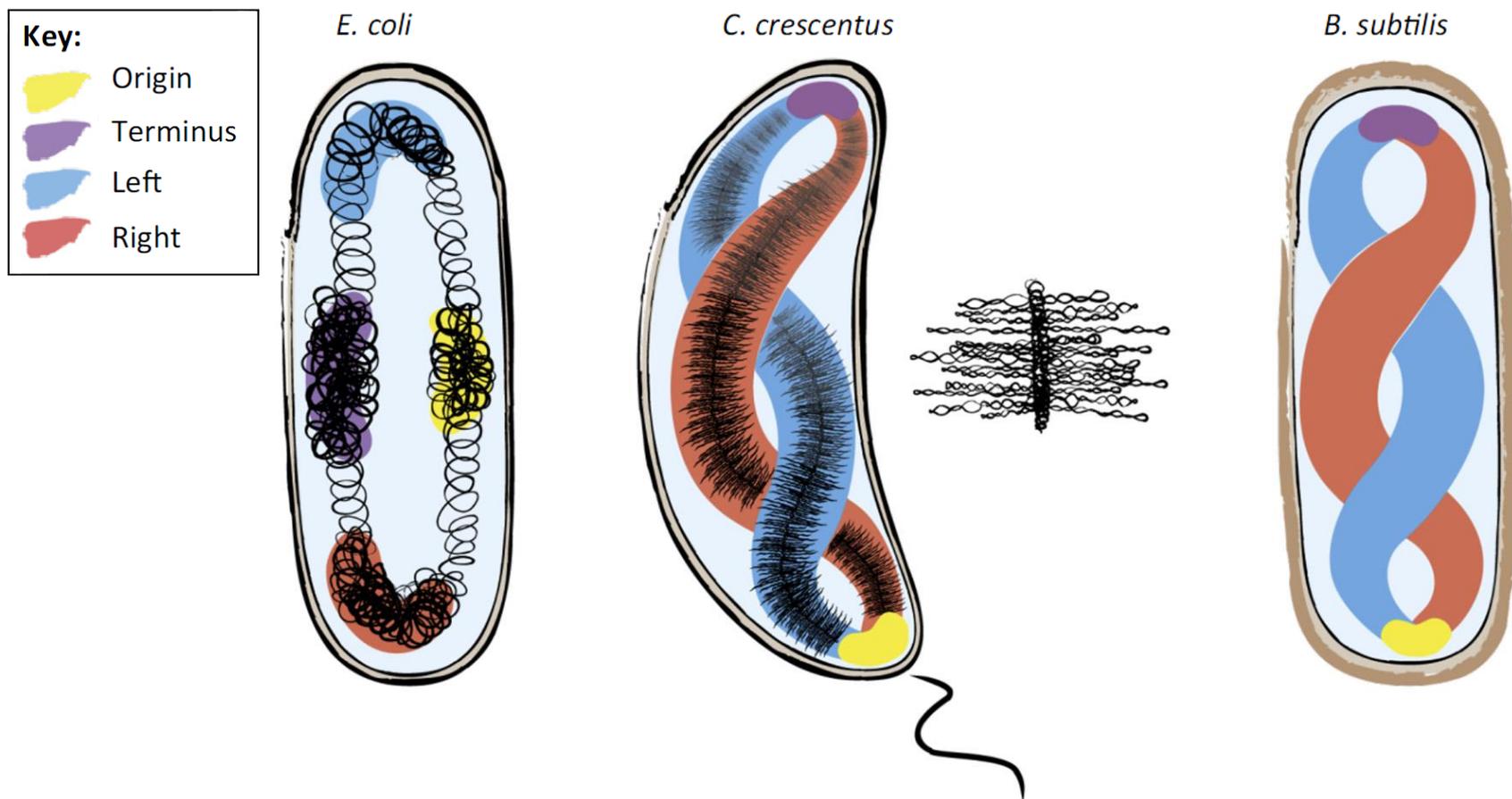
The background features a large, light green watermark of the China Agricultural University logo. The logo is circular and contains the university's name in Chinese characters (中国农业大学) and English (CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) around the perimeter. In the center, there is a stylized emblem with the year '1898' at the bottom.

1 基因的组织：

空间聚类 v s 动态再定位

细菌细胞的独特结构

拟核：双链环状的DNA分子紧密缠绕成的致密的不规则小体





组织拟核区——转录

用利福平处理

?

用利福平处理过的细胞的拟核区表现出明显的膨胀（利福平是一种抗生素，能够通过结合RNAP的 β 亚基从而限制启动子上的RNAP）。

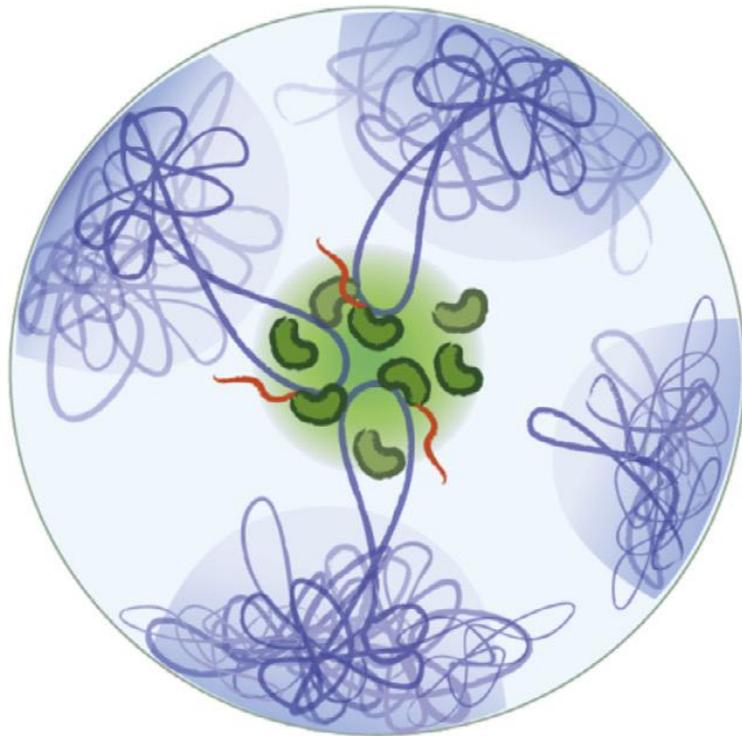
基于染色体构象捕获（3C）的方法

高表达的基因建立并维持着特定的染色体结构域。

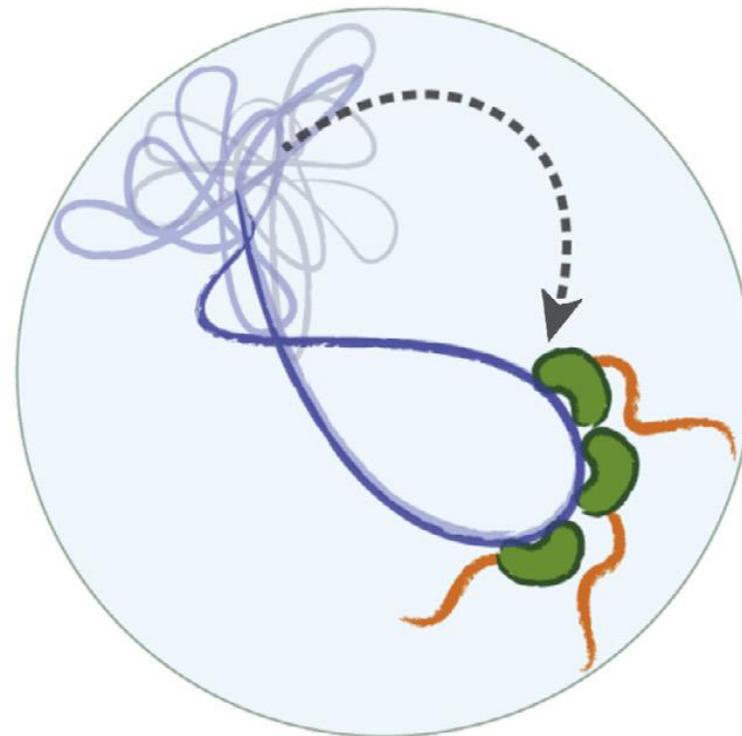
拟核区结构和转录活性的联系

表明基因是根据他们的转录活性在空间上被组织起来的，而不考虑它们在染色体上的线性顺序。

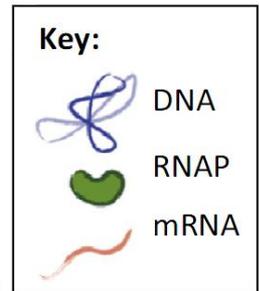
空间上组织基因的两种方式



受到相似调控的基因在空间上被聚集到一起



基因的细胞位置可能与其转录活性动态相关





基因的空间聚类

含义：

具有相关表达水平的、相距较远 ($>100\text{kb}$) 的基因成对出现（表明这些基因处在相似的环境里）。

功能：

具有将转录限制在局部区域的优点，在这些区域，高浓度的RNAP和转录因子能够确保快速响应并高效转录（这种情况与针对真核细胞提出的转录工厂理论相似）。

基因的空间聚类——最初观察



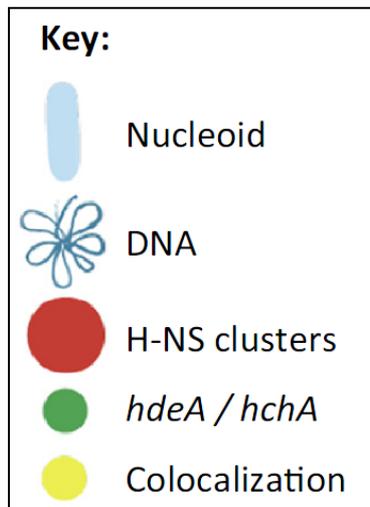
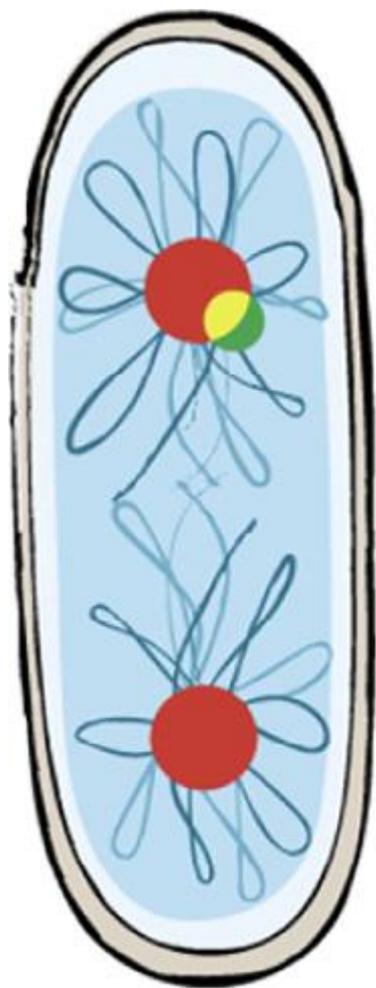
研究对象： 大肠杆菌细胞

实验条件： 在营养丰富的培养基上生长

现象： 功能性的RNAP-GFP融合物（绿色荧光蛋白，在 β' 亚基上标记，RpoC-GFP）在每条染色体上形成一个或两个密集的焦点

解释： 在快速生长的细胞中，核糖体RNA的合成是主要的转录活动，假定这些RNAP集点是参与rRNA合成的活性RNAP分子。此外，因为多个rRNA操纵子在染色体上彼此相隔很远，并且在快速生长的大肠杆菌细胞中，*rrn*操纵子的拷贝数能够达到50个，而观察到的RNAP焦点远远少于这个数目，这表明多个rRNA操纵子被聚在一起转录。

基因的空间聚类——实验证据1



研究对象：

大肠杆菌中核相关蛋白H-NS的空间分布

技术：

超分辨率的单分子成像技术

现象：

1. H-NS在每个染色体上平均形成两个簇
2. 双色共定位显示，这些簇与H-NS调控的基因共定位

推断： 基因聚类

基因的空间聚类——实验证据2



研究对象： 大肠杆菌多种gal操纵子亚细胞定位

技术： 荧光显微镜检测和3C

现象： 在稳定期，黄色荧光蛋白标记的GalR分子在细胞内形成了一个到三个点状的**聚集点**，3C实验检测到在染色体上相距几百kb的多个gal操纵子之间的**相互作用**。然而，在缺乏GalR的细胞中，这些相互作用被废除

推断： 这些操纵子的聚类与GalR的结合有关

基因的空间聚类——局限（技术限制）

- 用RNAP或转录因子的空间聚类推断其结合基因的空间分布
- 使用3C及其衍生的技术对这些基因的空间接近度进行研究，或通过联系在相同生长条件下已知的转录活性来推断。

局限： 这些基因的实际细胞定位或空间聚类都没有直接进行可视化，也没有与蛋白簇比较。



基因动态重定位

含义：

基因根据转录活性来改变的在细胞中的位置

功能：

基因移入或移出特定的亚细胞位置（传统的转录调控方式：转录因子的结合或解离）

基因动态重定位——最初观察



早期电子显微镜：

转录活跃的基因和RNAP主要定位于拟核表面而不是内部。

直观来看，RNAP和转录因子更容易接近拟核表面的基因而不是内部的。

基因动态重定位——实验证据1



研究： 大肠杆菌成像

技术： 荧光阻遏物-操纵子系统（FROS）对一个质粒DNA进行标记。

现象： 当质粒携带组成型启动子时，其在拟核朝向细胞极的边缘形成了一个清晰的焦点；启动子缺失的情况下，质粒在细胞质内随机扩散。

结论： 虽然质粒DNA没有整合到染色体上，转录活性可以影响基因的亚细胞定位。

基因动态重定位——实验证据2



研究： 大肠杆菌

现象： 编码不同膜蛋白的两个基因在诱导时向膜移动。

解释： 这种移动最有可能是由共转录翻译和蛋白质插入到膜中导致的，所以可能不是转录活性直接影响的。

基因动态重定位——矛盾产生



FROS、活细胞成像

DNA片段的细胞定位在很大程度上取决于它在染色体上哪个位置或哪个复制阶段，这与动态重定位基因的观点相反。

新月柄杆菌

当将染色体锚定序列 $parS$ 移动到新的基因组位置后，染色体会旋转，而全局基因表达谱并没有显著的变化。基因表达活性与特定的亚细胞位置无关。



如何理解矛盾？

一种可能：在响应转录活性时，基因的动态重定位是不必要的；拟核内部和表面一样易于转录。

实验证据：在一个小鼠细胞的成像研究中发现，活跃的转录也有可能发生在染色体内部深处。在这种情况下，可能是基因的细胞内定位不改变，但基因的局部环境发生变化以促进活跃的转录。

另一种可能：转录活性诱导基因亚细胞定位的变化不明显，不足以被基于FROS的方法检测到。

技术缺陷：传统上的FROS使用融合到DNA结合蛋白的荧光蛋白，这些DNA结合蛋白结合到数百个跨越几kb的结合位点的串联排列上；因此，长度相似的基因的细胞内位置的**准确性和精确性**在检测时会**受损**。（如果在检测1 μm 尺度的棒状细菌中在细胞的短轴位置发生的微小变化时，是尤其具有挑战性的）



问题的解决

直接以高分辨率观察基因亚细胞定位的方法

单分子成像研究使用了修改过的FROS策略来追踪活体大肠杆菌细胞中2.3kb DNA片段的位置和移动，精确度为40 nm。

结合直接观察活细胞中基因转录活性的方法

可以深入检查基因为了响应转录活性，是否以及如何如何在空间上组织起基因。

The logo of China Agricultural University is a circular emblem. It features a stylized green and white design in the center, possibly representing a flame or a plant. The Chinese characters '中国农业大学' are written around the top inner edge of the circle, and '1898' is at the bottom. The English text 'CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY' is written along the bottom inner edge.

2 转录因子的空间分布：

成簇 v s 随机扩散



转录因子TF

传统观念：

TF随机分布在细胞中，直到遇到一个特异结合位点，与其紧密结合来调节相关基因。

相反的观点

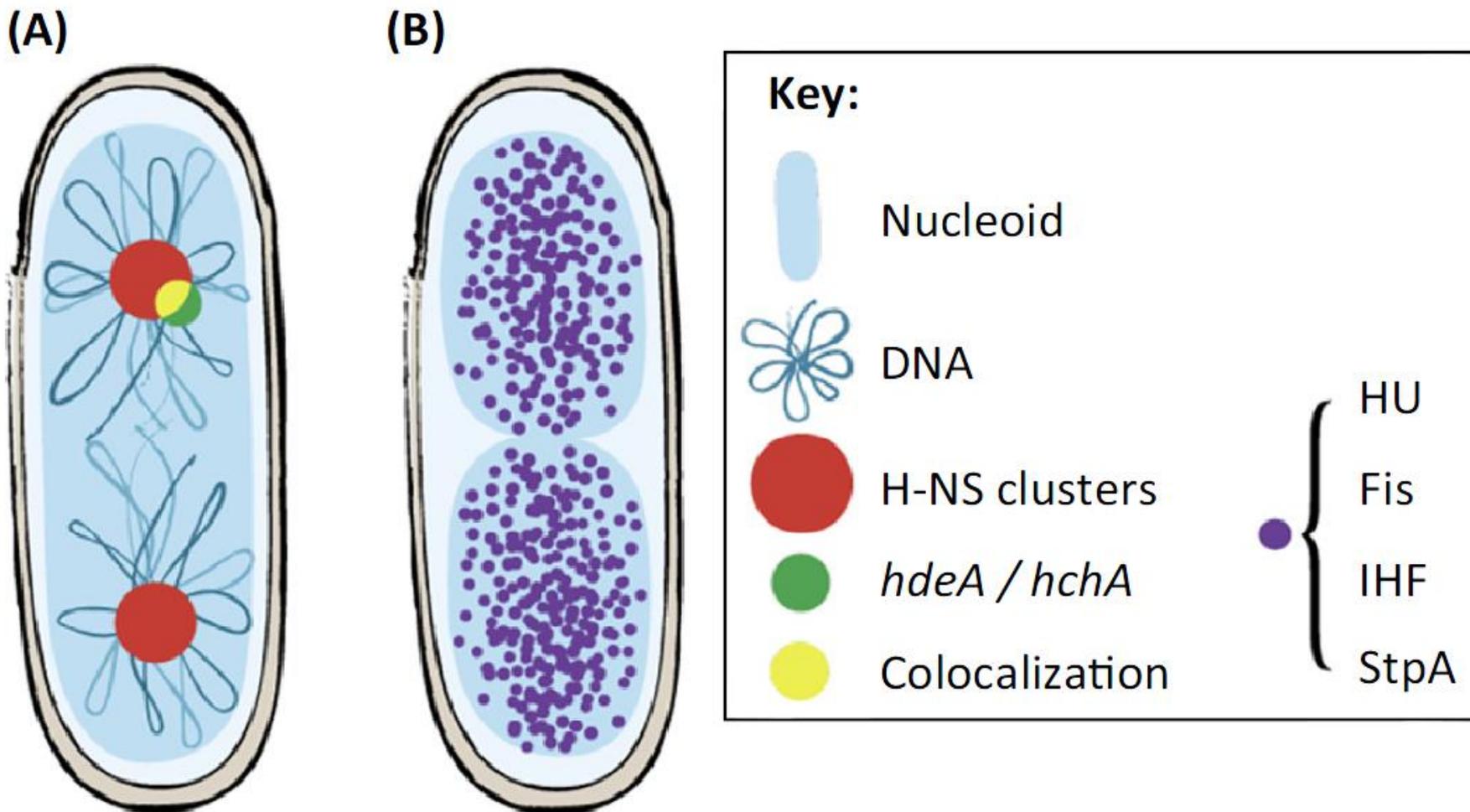
研究对象：缺乏LacI结合位点的大肠杆菌

现象：单分子研究发现LacI-Venus优先定位于其编码基因附近的区域。

解释：LacI-Venus基因在拟核内部转录和翻译

转录因子的不同空间分布

TF的空间分布应反映结合的DNA位点的空间分布。



TF空间成簇的决定因素——低聚化

- 二聚突变体GalR^{T322R}和H - NS^{L30P}消除了TF的成簇出现并减弱了对相应基因的调控。

GalR^{T322R}突变不影响蛋白质的DNA结合性能

H - NS^{L30P}似乎改变了DNA结合性能

因此，在突变体中成簇的消除不能仅仅归因于低聚反应。

- 此外，其他TF，包括HU，IHF，Fis和StpA，形成二聚体或更高阶的低聚体，但不在空间上成簇。

TF的低聚反应可能不足以使DNA位点聚集在一起



TF空间成簇的其他影响因素

- 细胞生长条件
- NAP的表达水平
- 染色体的超螺旋状态

例如，GalR的抑制可能是由GalR、HU和超螺旋DNA组成的更高阶的分子复合物介导的。有可能是，局部染色体结构以及其它蛋白质因子的结合共同作用，影响了TF分布模式的空间稳定性。



空间成簇的TF的功能

1. 增加TF的局部浓度，进而增强转录调节。
2. 以类似于真核生物增强子的方式，使远离启动子的DNA调控元件靠近启动子，从而增强转录调控
3. 通过TF及其靶基因的空间共定位形成DNA环路，也许能组织染色体结构域。

未来方向：

在小的细菌细胞中以高分辨率分析TF的空间分布

技术新进展： 基于单分子的超分辨率成像方法，如光敏定位显微镜（PALM）和随机光学重建显微镜（STORM）。

The background features a large, faint watermark of the Agricultural University of China logo. The logo is circular and contains the university's name in Chinese characters (农学) at the top, a stylized emblem in the center, the year '1898' at the bottom left, and the English name 'AGRICULTURAL UNIVERSITY' at the bottom. The text '3 RNA聚合酶的空间分布:' is overlaid on the logo in a bold green font.

3 RNA聚合酶的空间分布：

成簇的RNAP是活跃的转录中心吗？



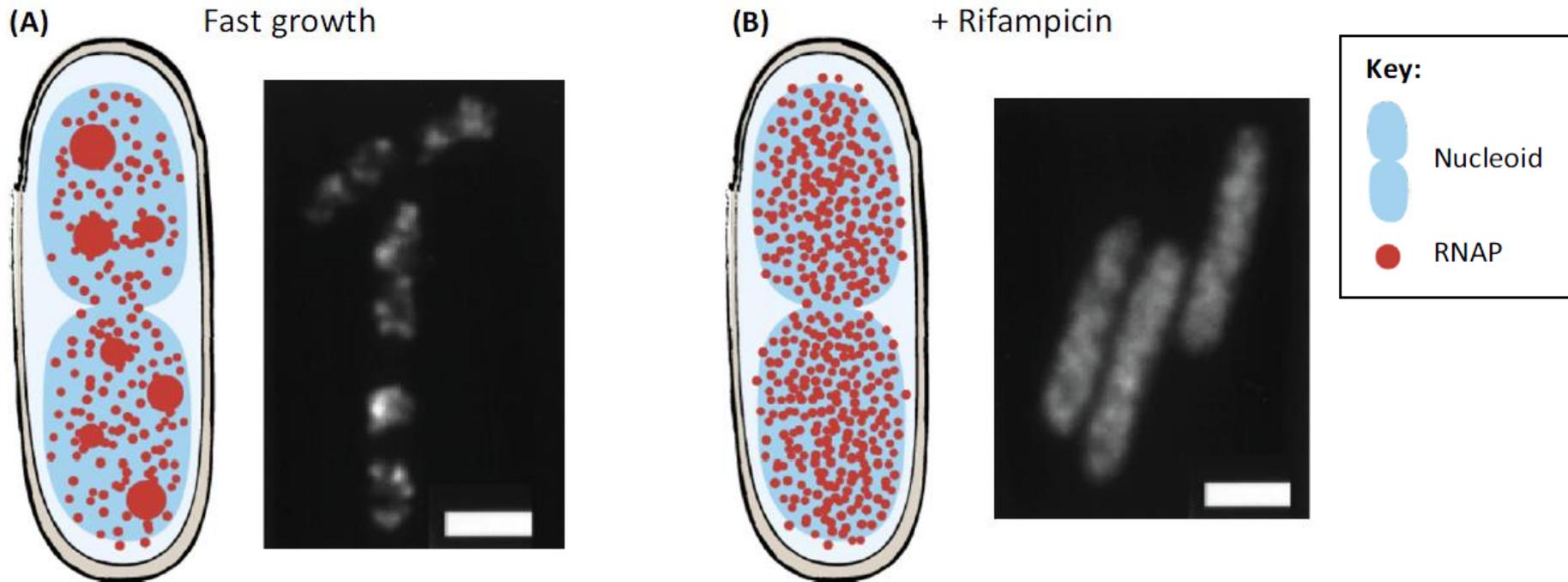
RNA聚合酶结构

核心酶： $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ，负责转录延伸；

σ 因子：启动子识别和启动转录所必需的，不同的 σ 因子指导转录不同的基因亚型。

- 利福平是一种抗生素，能够结合RNAP的 β 亚基，限制启动子上的RNAP \longrightarrow 调控转录
- FP可以与 β' (RpoC-FP)融合，这些FP融合体能够替代内源性 β' ，并且90%以上都被并入RNAP核心 \longrightarrow RNAP成像

RNAP在大肠杆菌中的空间分布



- (A) 在快速生长时，GFP标记的RNAP拥有不同的聚集点。
- (B) 经利福平处理后，RNAP的分布变得更均匀。



RNAP聚焦点=转录活性位点？

关键因素：没有直接证据表明观察到的聚焦点中RNAP分子确实积极地参与转录。

理论上，这些聚焦点（RNAP）有两种来源：结合非生产性转录复合物上的DNA；结合准备转录的强启动子上的DNA。

在后一种情况下，不同的生长条件或药物处理可能会改变**拟核结构**，从而改变结合到核上的RNAP的空间分布。

理论建模和定量实验表明，大多数RNAP与**拟核有关**，但只有约**20-30%**的RNAP分子积极**参与转录**，包括rRNA合成酶和mRNA合成酶。

RNAP在不同生长条件下的表达水平和转录活性差异很大，研究表明RNAP的**迁移率降低和聚焦点的形成**不一定是转录活性的良好指标。

RNAP聚焦点=转录活性位点？



局限：

在细菌中，由于缺乏特异性药物以及在转录不同阶段靶向到RNAP的抗体，因此很难像在真核细胞中一样检测RNAP活性的空间分布。

研究方向：

使用尿苷类似物共同标记RNAP和新生的RNA，或用抗体共同标记RNAP和转录延伸因子（如NusA），或用如上所述的超分辨率FROS系统共标记RNAP和基因，也许可以鉴定在参与活跃转录的RNAP分子。这将为聚焦点是否是活跃转录工厂提供更具体的证据。

The background features a large, light green watermark of the Agricultural University of China logo. The logo is circular and contains the university's name in Chinese characters (农, 业, 大, 学) at the top, the year '1898' at the bottom, and the English name 'AGRICULTURAL UNIVERSITY' along the bottom edge. The central part of the logo is a stylized emblem.

4 RNA的空间分布：

翻译 & 降解



RNA的空间分布

Q: 转录后的RNA分子去哪了？

随机扩散？ 定位到某一特定位置？ 停留在原先位置？

否有相应的生物学意义？

翻译和降解共同影响mRNA的空间位置。



翻译影响RNA的空间分布

两种方式：

- 原核细胞共转录翻译，随着翻译的进行，多个核糖体和新生肽链的存在，减缓了mRNA的扩散，很大可能停留在转录的位置。
- 新生肽的共翻译插入膜能够使得mRNA靶向膜。



翻译——方式1实验证据

1. 研究：荧光标记、单分子示踪
现象：70s的核糖体和mRNA的扩散运动受到局部限制。
2. 研究对象：新月柄杆菌和大肠杆菌
技术：mRNA原位杂交(FISH)、MS2标记
现象：编码不同蛋白产物的6种不同的mRNA共同定位各自的编码基因。

生物学意义：能够促进蛋白与其邻近基因簇编码的配偶体之间的快速互作。

mRNA定位或离域的其他机制



研究对象：大肠杆菌

现象：未翻译的RNA在细胞两极上形成了局部斑点；从同一个多拷贝体质粒高度诱导的lacZ mRNA在整个细胞中显示出高度均匀的分布。

结论：定位模式可能依赖于RNA的个体身份。

翻译——方式2实验证据



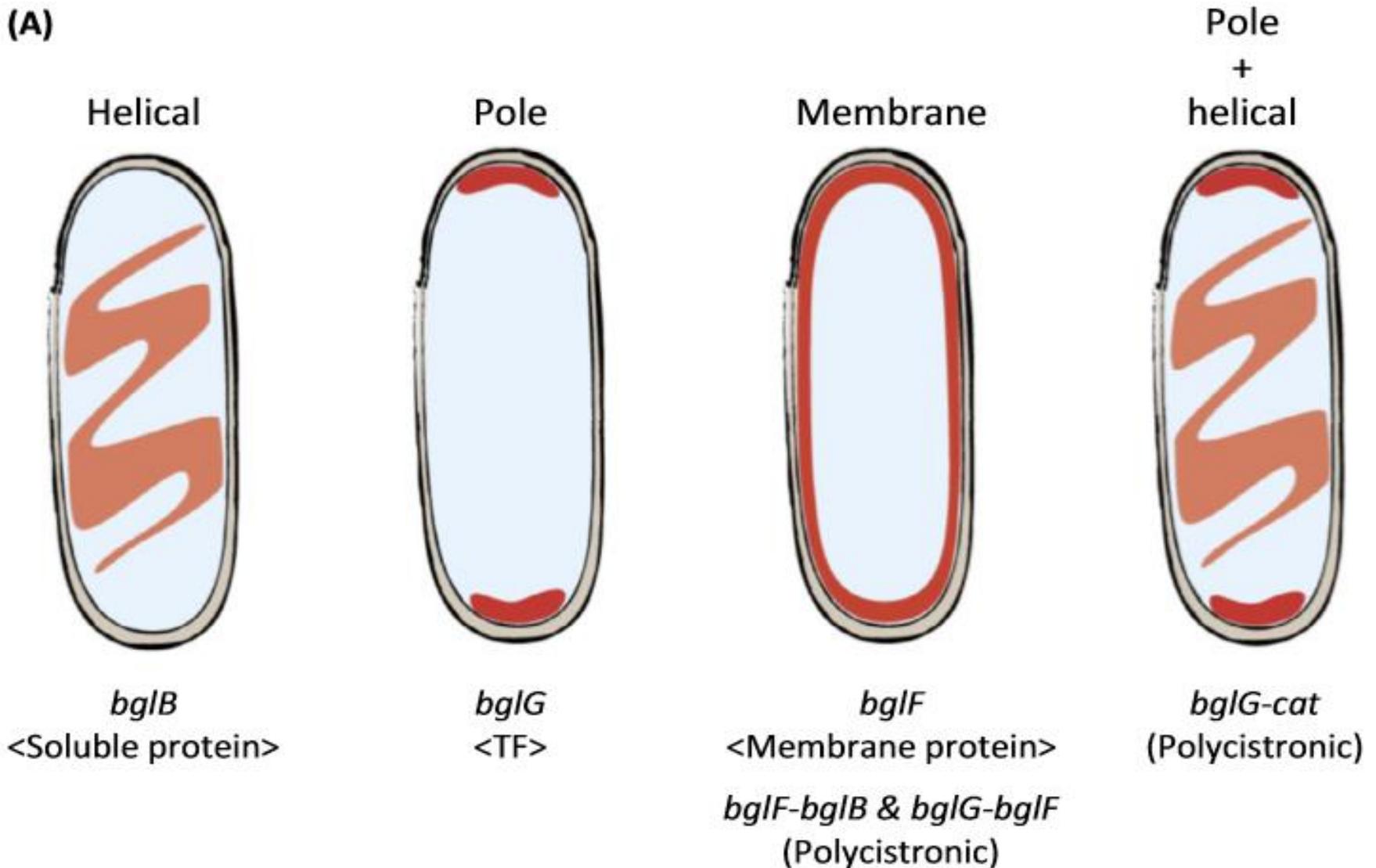
方法： 荧光显微镜检验

研究对象： 乳糖渗透酶LacY、四氯离子外排泵TetA和葡萄糖转运蛋白IICB^{Glc}三种大肠杆菌膜蛋白

结论： mRNA对膜的定位依赖于翻译：翻译使得移码突变或者药物抑制破坏了其定位。

mRNA膜定位其他机制——与翻译无关

(A)



降解影响RNA的空间分布



大肠杆菌中，降解RNA的主要酶RNase E，会定位在内膜，或者与和膜邻近的细胞骨架结构相连。这样的空间分布表明在大肠杆菌中，RNA为了降解会靶向到膜。

研究： 编码葡萄糖转运蛋白IICB^{Glc}的*ptsG* mRNA
现象： 膜靶向能够借助与RNA伴侣Hfq结合的小RNA高效降解mRNA。

降解——实验证据



(B)

Helical

Antiphase
helices



tmRNA

Key: ● SsrA-Cy3

● Anti-RNase R

Merge



总结与展望



总结与展望

总结：

以较高的灵敏度和分辨率证明了基因、转录因子和RNA聚合酶在细胞内的空间分布

展望：

- 空间信息是否并且如何转换为转录的调控信号？
- 细菌：酶和底物如何进行空间分隔？
- 重新分布转录的分子组分来重构局部环境可能是一种响应信号更快更有效的调控机制？

转录调控新范式——空间组织



Spatial and functional segregation of components

A and B



Activity OFF

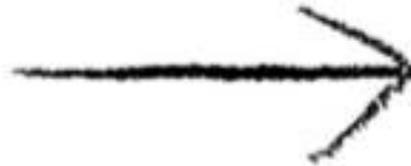
Spatial and functional colocalization of components

A and B



Activity ON

Induction



Redistribution



华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

感谢聆听！