

Published online 10 September 2014

Nucleic Acids Research, 2014, Vol. 42, No. 18 11383–11392

doi: 10.1093/nar/gku828

Chromosome position effects on gene expression in *Escherichia coli* K-12

Jack A. Bryant, Laura E. Sellars, Stephen J. W. Busby and David J. Lee*

Institute of Microbiology and Infection, School of Biosciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, UK

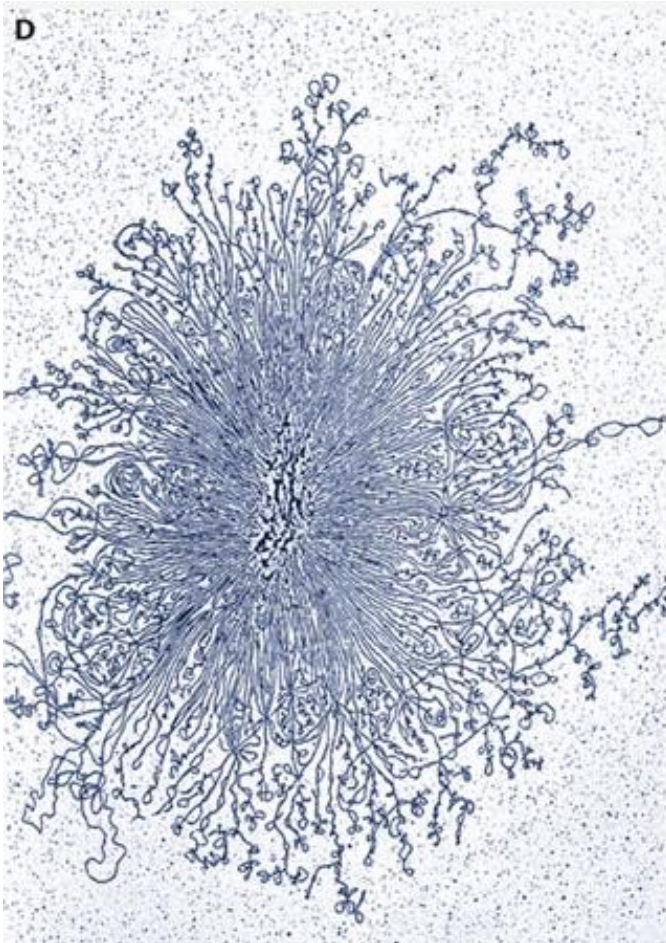
Received June 5, 2014; Revised August 8, 2014; Accepted August 30, 2014



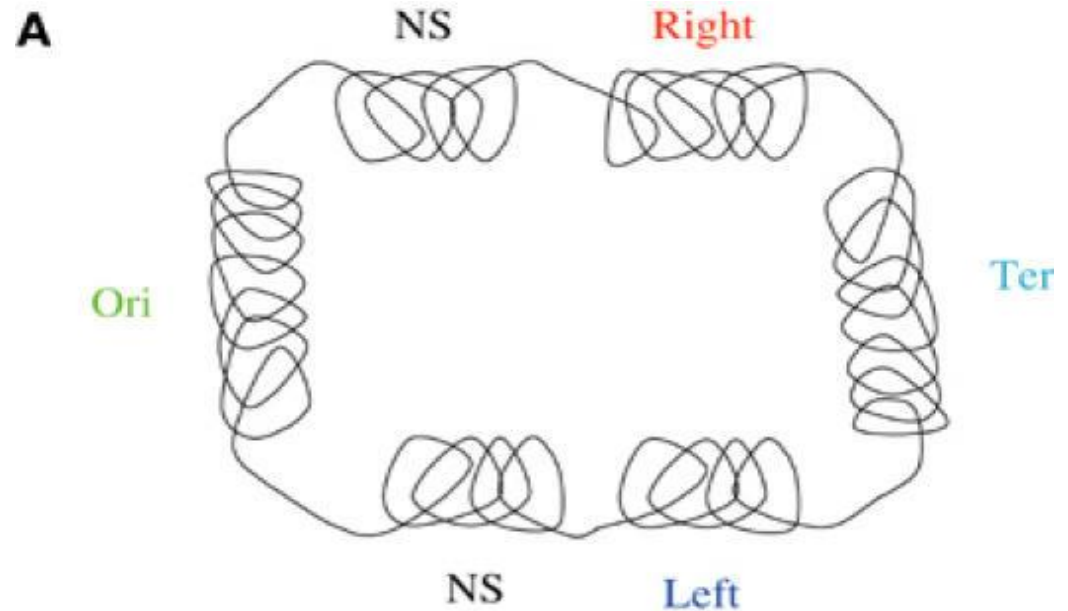
**Universidade Federal de Santa Catarina
PPG em Biotecnologia e Biociências
Mestranda: Ana Letícia Trivia**

Introdução

- Nucleóide: DNA cromossomal, proteína e RNA



Adaptado de Wang *et al.*, 2013



Adaptado de Valens *et al.*, 2004

- Organização do nucleóide mediada por:
 - Superenovelamento do DNA
 - “Macromolecular crowding”
 - NAPs: nucleoid associated proteins
 - tsEPODs: transcriptionally silent Extended Protein Occupancy Domains – promotores fracos ou silenciados por proteínas associadas?

- Regiões transcricionalmente ativas na periferia do nucleóide, engatadas por “transcription factories” ou foci
- Transcrição pode ocorrer em regiões particulares
- Posição do gene no cromossomo e sua organização espacial podem ser importantes no controle da expressão gênica
- Estudo com camundongo: níveis de expressão variaram mais de 1000x, e refletiam o ambiente local no cromossomo

Objetivo

- Efeito da posição de gene no cromossomo em *E. coli*, inserindo um marcador em diferentes posições do genoma
- Identificar outros fatores que podem influenciar na expressão gênica

Materiais e Métodos

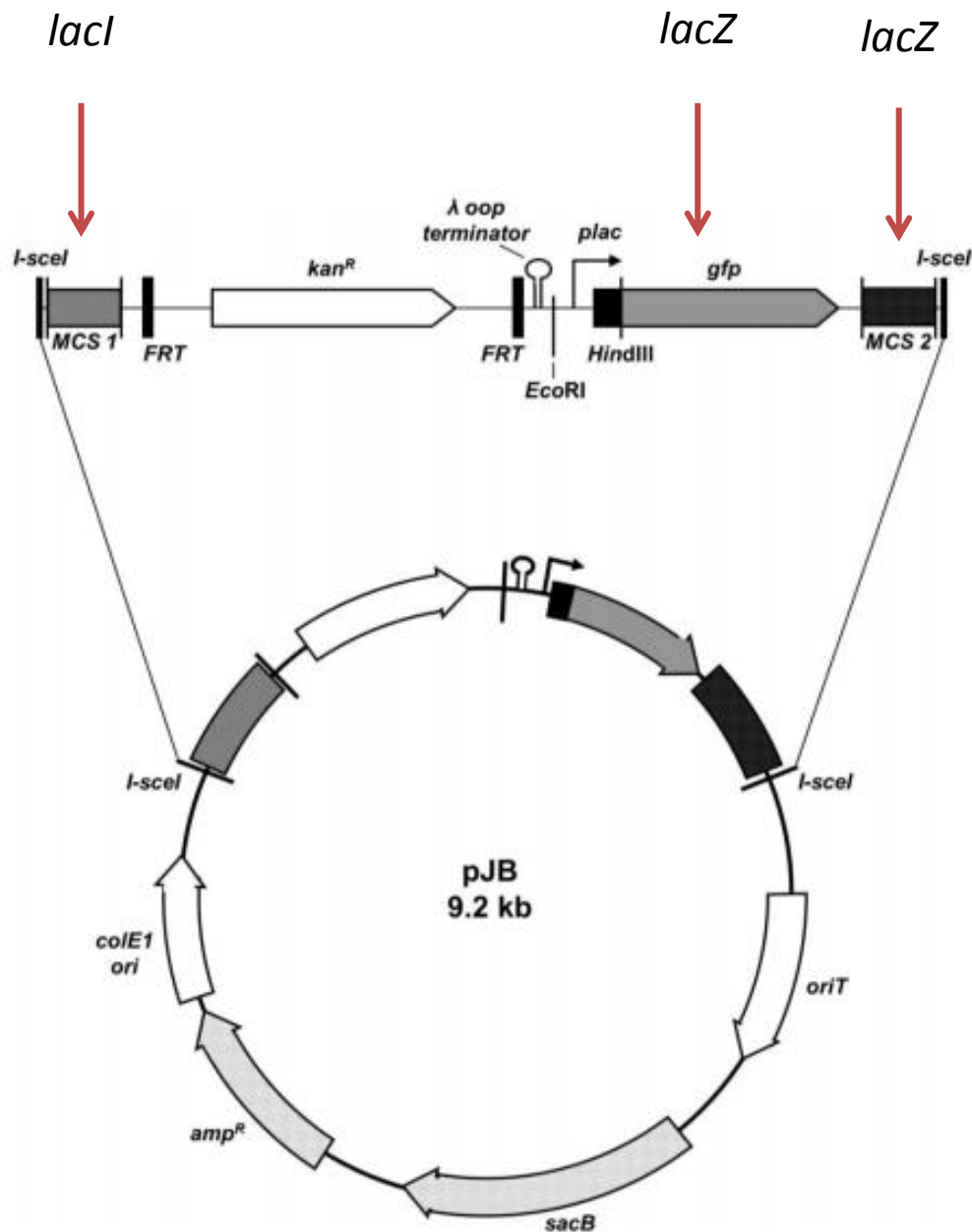
- Cepas e plasmídeos

Table S1. *E. coli* strains used in this study

Strain	Description *	Origin
MG1655	<i>E. coli</i> K12 strain	(4)
BRY09	Derivative of MG1655 carrying a <i>kan</i> gene and <i>lac::gfp</i> fusion at position 72143 bp (<i>thiQ</i> locus)	This study
BRY11	Derivative of MG1655 carrying a <i>kan</i> gene and <i>lac::gfp</i> fusion at position 4342915 bp (<i>mel</i> locus)	This study
BRY13	Derivative of BRY09, from which the <i>kan</i> gene has been removed. Position 72143 bp (<i>thiQ1</i> locus)	This study
BRY15	Derivative of BRY11, from which the <i>kan</i> gene has been removed. Position 4342915 bp (<i>mell</i> locus)	This study

44 cepas

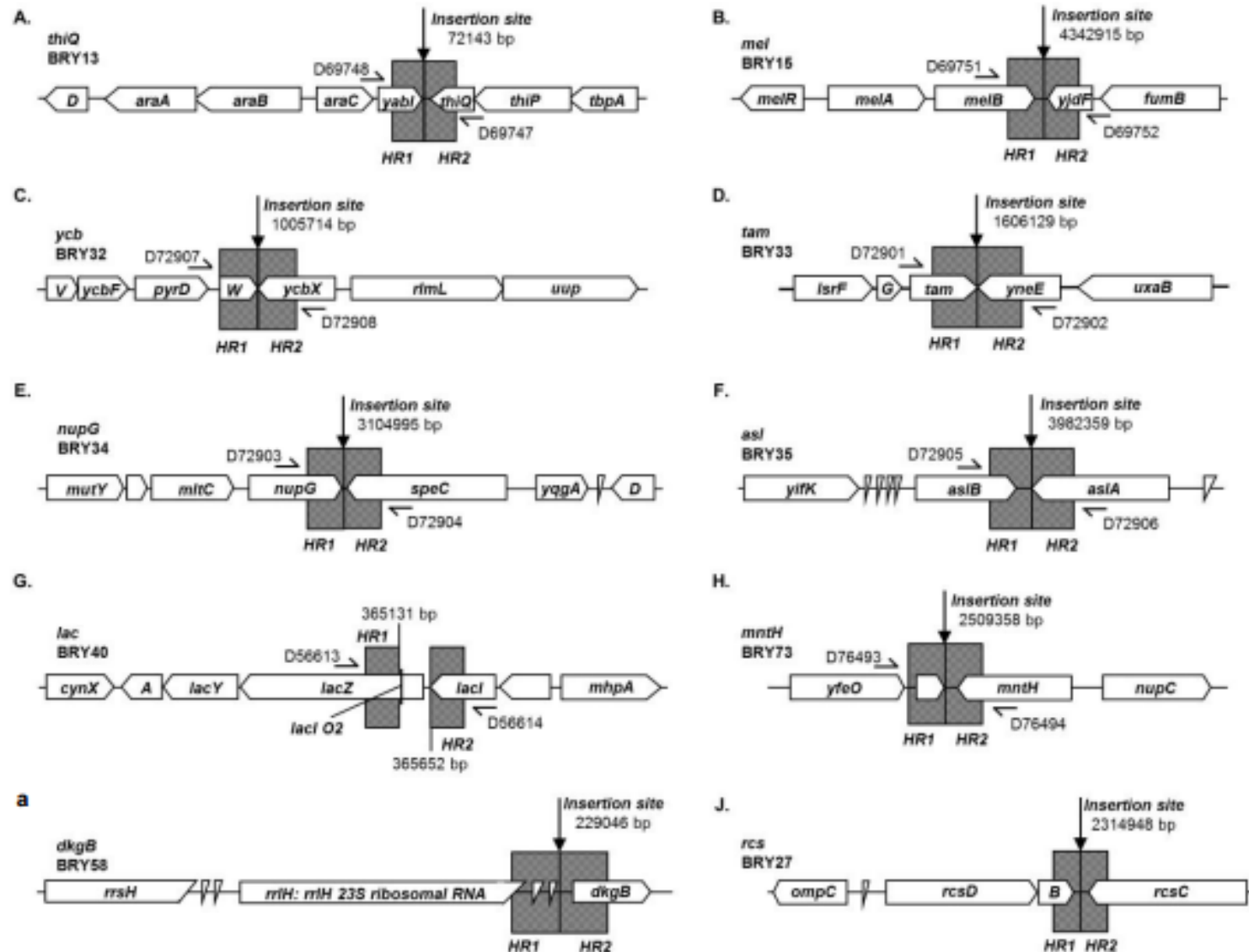
- Construção dos plasmídeos recombinantes
 - pKH5
 - Troca *lacI* e *lacZ*
 - PCR promotor *lac* de gDNA de *E. coli* K-12
 - Clonado no reporter
 - Sítios de restrição I-sceI
 - Clonado em pDOC-C
 - pJB



RR CutSmart 37° 65°

5'...TAGGGATAACAGGGTAAT...3'
3'...ATCCCTATTGTCCCATTA...5'

- Recombinação cromossômica
 - Transferência do promotor *lac::gfp* para os loci alvos a partir de pJB



- Co-transformação de *E. coli* K-12 MG1655 com o pJB doador e pACBASCE
- Integração do fragmento no cromossomo através do método “gene doctoring” = sistema de recombinação que utiliza dois plasmídeos pra modificar os cromossomos de *E. coli*
- Screen por PCR de colônia
- BRY+número
- Excisão do gene de resistência à canamicina com flippase recombinase
- Screen para confirmação

- Ensaios de fluorescência
 - Crescimento bacteriano

- 16h, 37°C

- Diluição até $OD_{620} = 0,3$



- Incubação

- 37°C, $OD_{620} = 0,4-0,5$

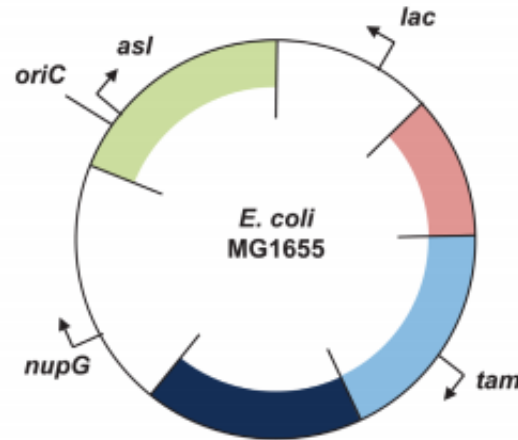
- 250µl em plate de 96 poços, estéril, preto

- Medição: Fluorescência em c.o. de excitação de 485nm e de emissão de 510nm por tempo de integração de 1s com fluorímetro

- 3 réplicas para cada experimento, repetida pelo menos 2x

- Controle: *E.coli* K-12 MG1655, sem fluorescência detectada

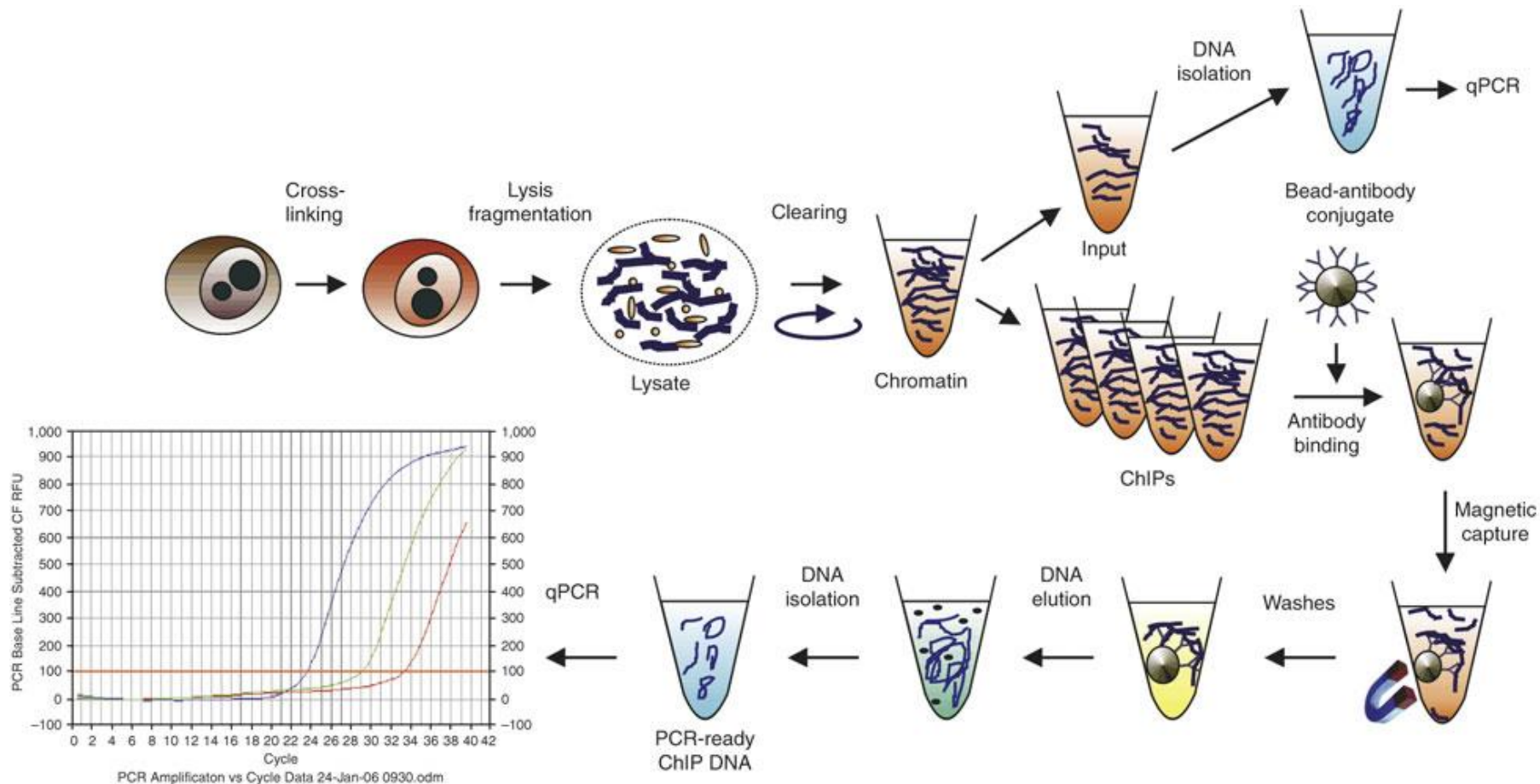
- Quantificação de cópias do gene
 - qRT-PCR: dosar *gfp* em diferentes cepas BRY
 - Extração de gDNA



- Concentração do DNA com espectrofotômetro
- Quantidade relativa de *gfp* determinada normalizando valores de C_T para o gene de referência *bglB*.
- Quantidade de cópias de *gfp* relativo à locus *tam* = quantificação do gene
- Cada reação repetida pelo menos 3x pra cada réplica para gerar média e desvio padrão para cada experimento

Imunoprecipitação de cromatina e análise de qPCR

- Quantificar ocupação de RNAP no gene *gfp* em diferentes cepas BRY
- Anticorpos contra subunidade β -RNAP

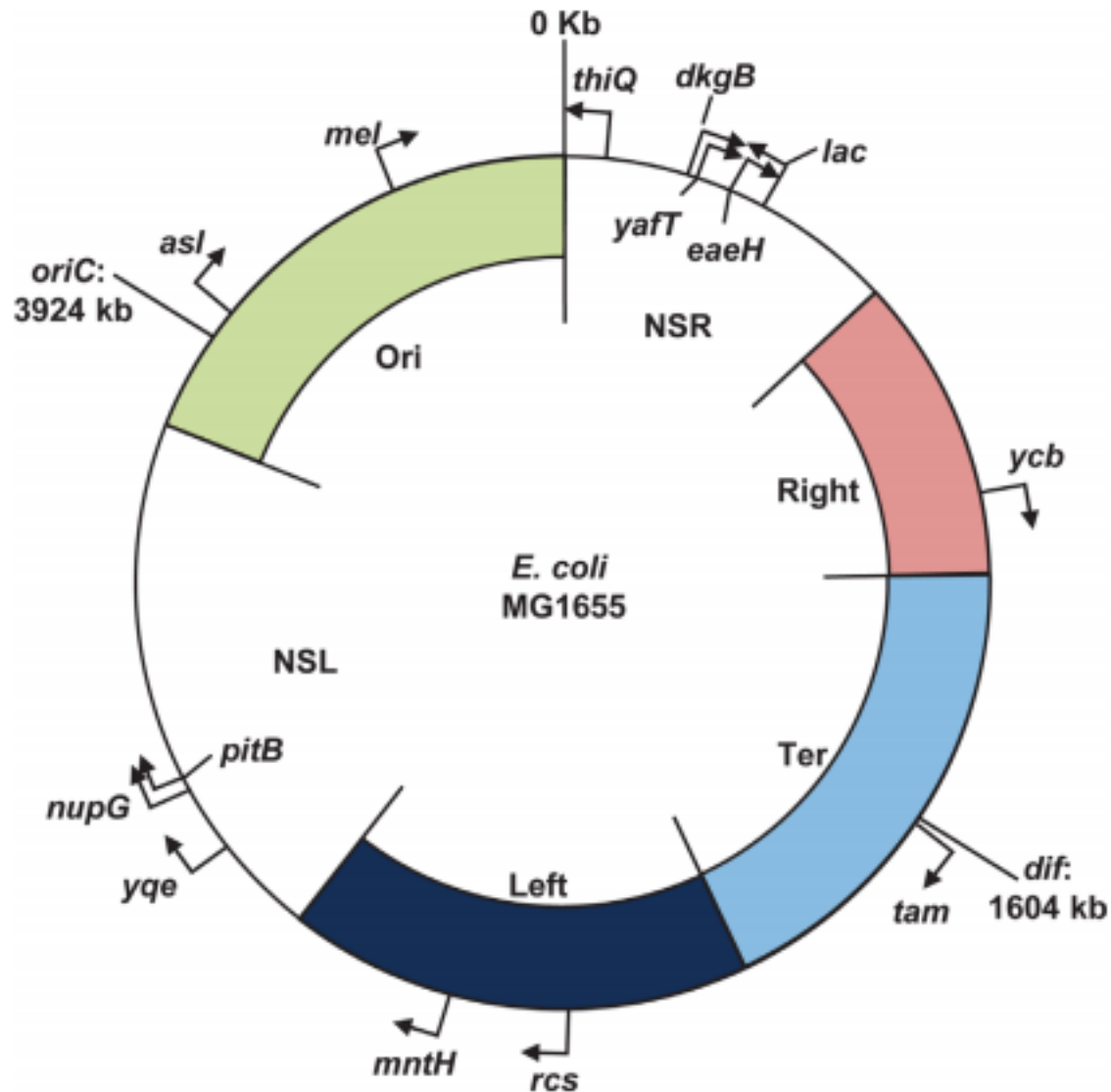


- Isolamento do RNA e qRT-PCR
 - Isolamento do RNA total: RNA later solução de estabilização e RNeasy Mini kit com digestão por DNase I na coluna
 - RNA total – transcrição reversa com kit de síntese tetra cDNA, com oligonucleotídeos específicos (*bglB* e *gfp*)
 - cDNA – template em qPCR com master mix SYBR Green
 - Níveis de expressão relativa do gene alvo *gfp*

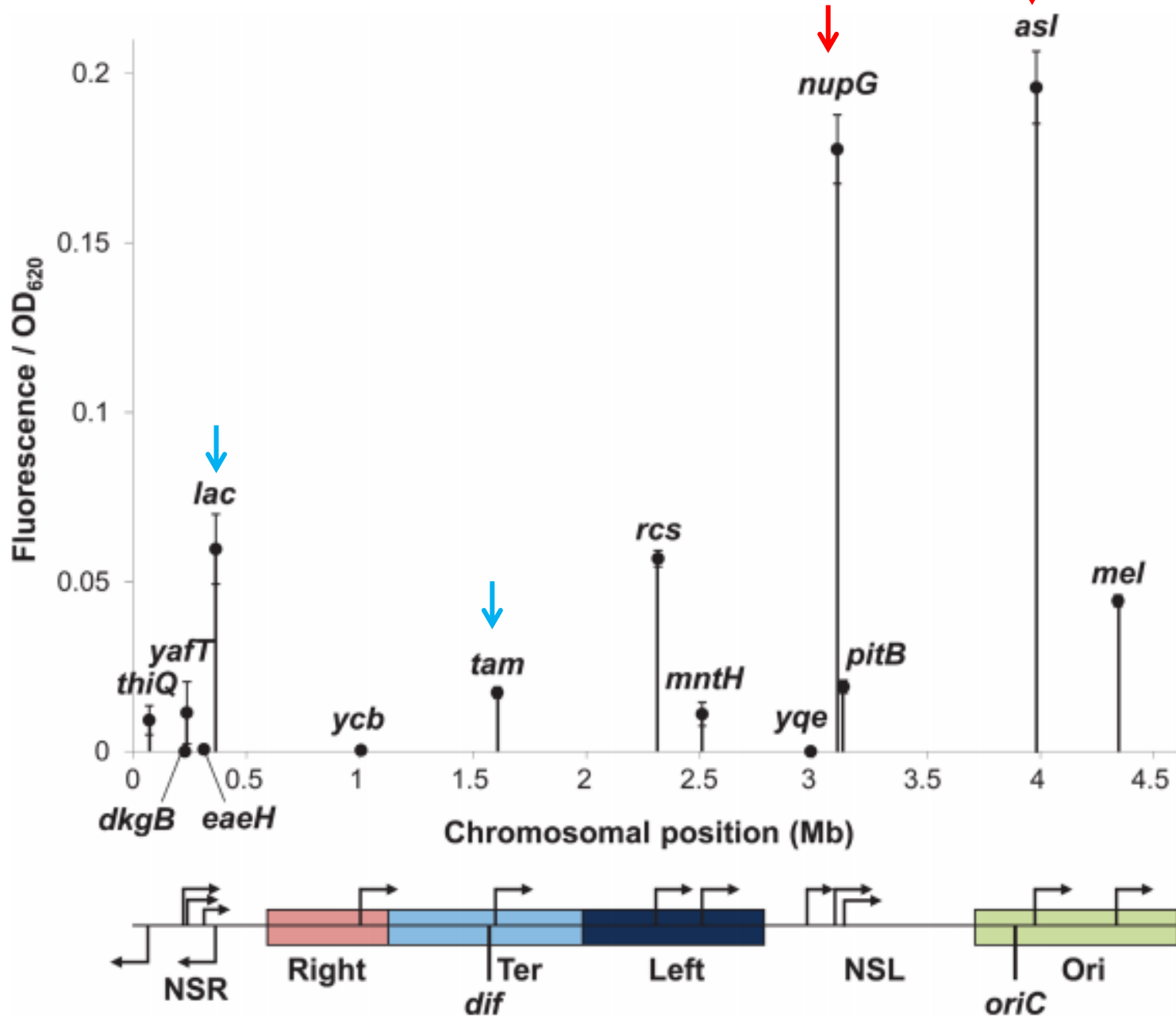
- Avaliação da DNA girase
 - Eletroforese em gel de agarose com cloroquina
 - BRY35 com pBR322 em meio mínimo com ampicilina e novobiocina em diferentes concentrações
 - DNA plasmidial purificado
 - Eletroforese em gel 1% agarose e 2,5µg/ml cloroquina em tampão 2% TBE por 24h a 3V/cm no escuro
 - Remoção da cloroquina com H₂O destilada por 2h
 - Brometo de etídio

- Ensaio de α -galactosidase
 - Deleção do promotor *lac* wild-type nas cepas BRY15 e BRY37 – eliminar interferência da Lac permease
 - Cepas resultantes (BRY75 e BRY 79) crescidas por 16h 5ml meio M9 a 30°C
 - Diluição de 100x em 5ml de meio fresco para OD₆₅₀ ~0,03
 - Cloranfenicol para cessar produção de proteína
 - 100 μ M IPTG ou 0,2% melibiose - indução transcrição *melAB*
 - Medida c.o. em OD₆₅₀

Resultados

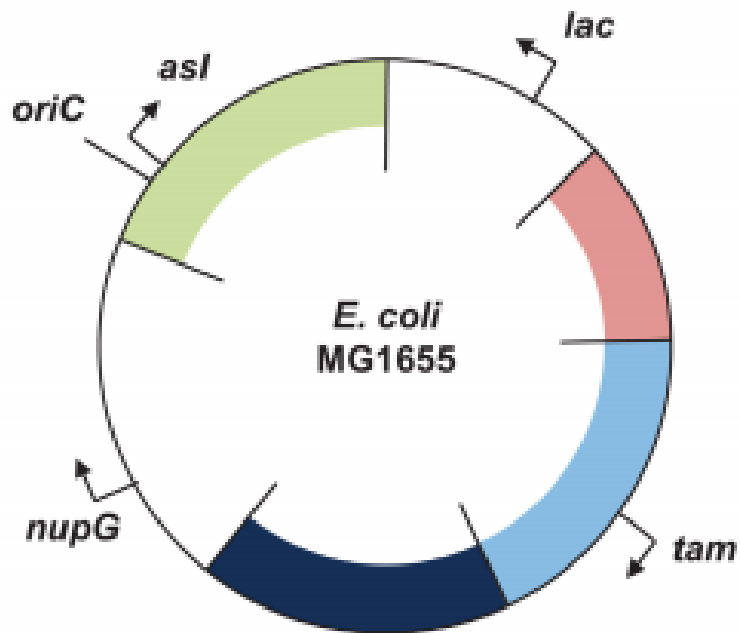


- Níveis de expressão

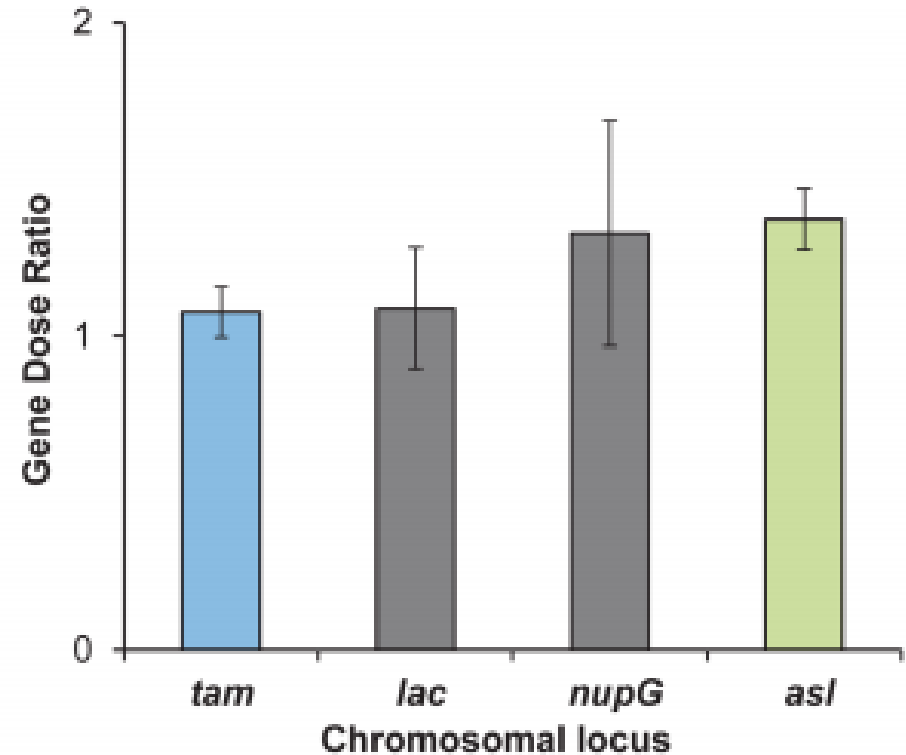


- Quantificação de cópias de gene

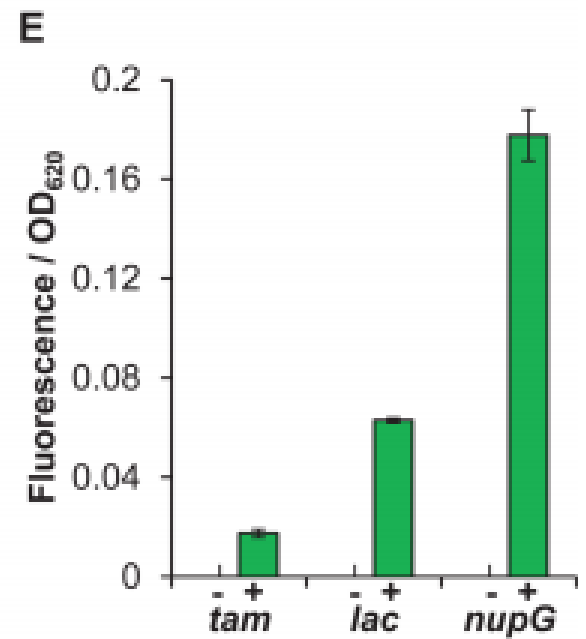
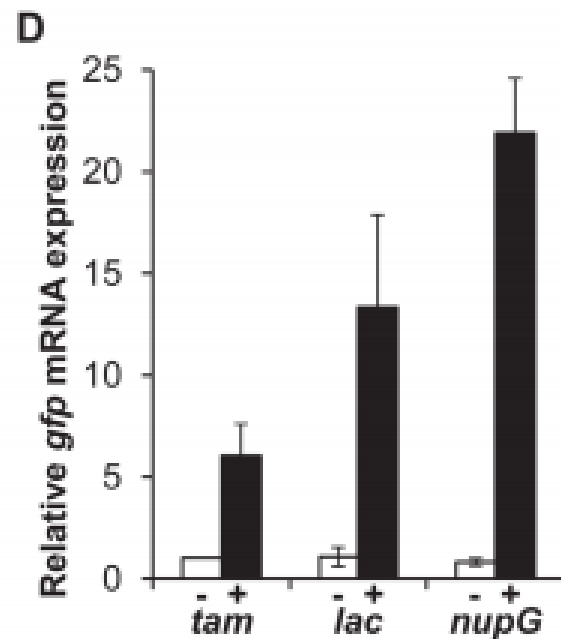
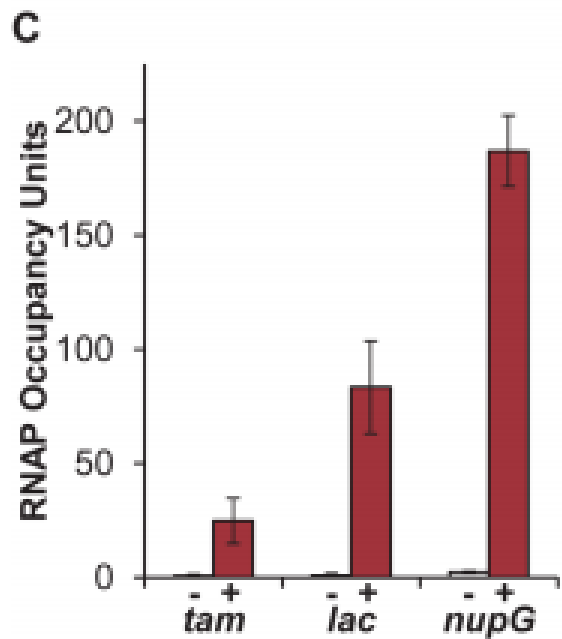
A



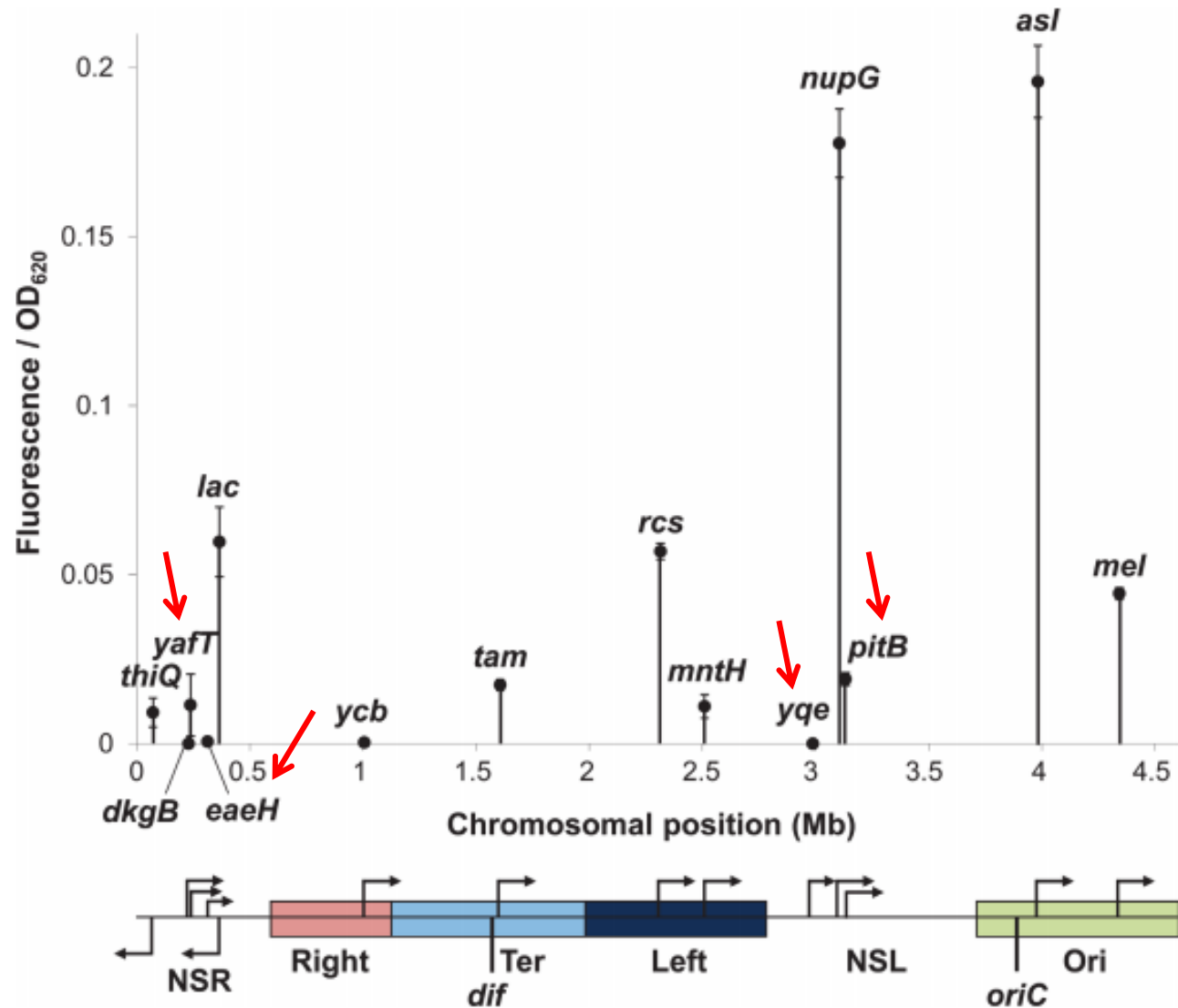
B



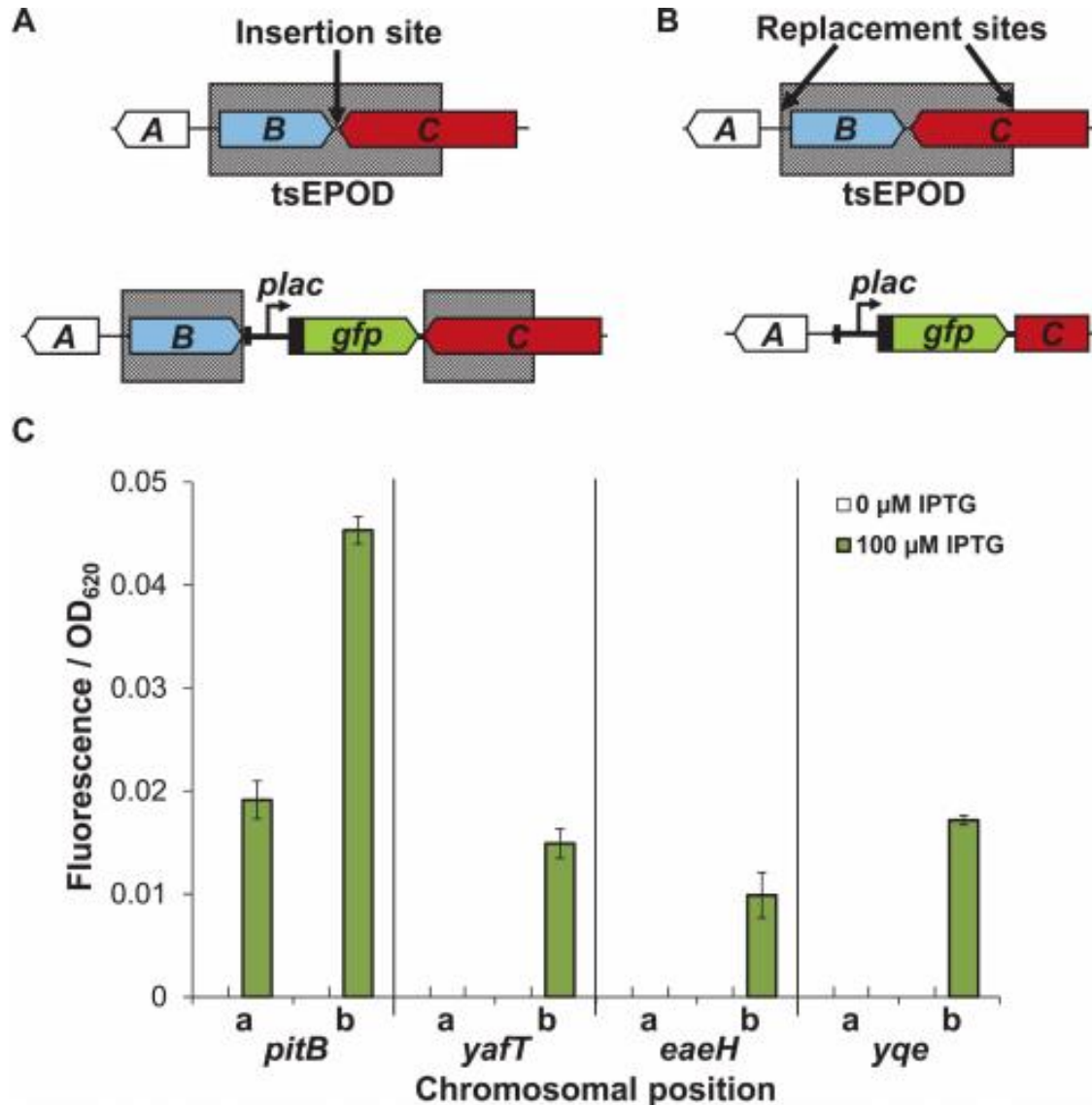
- Efeitos da posição na transcrição



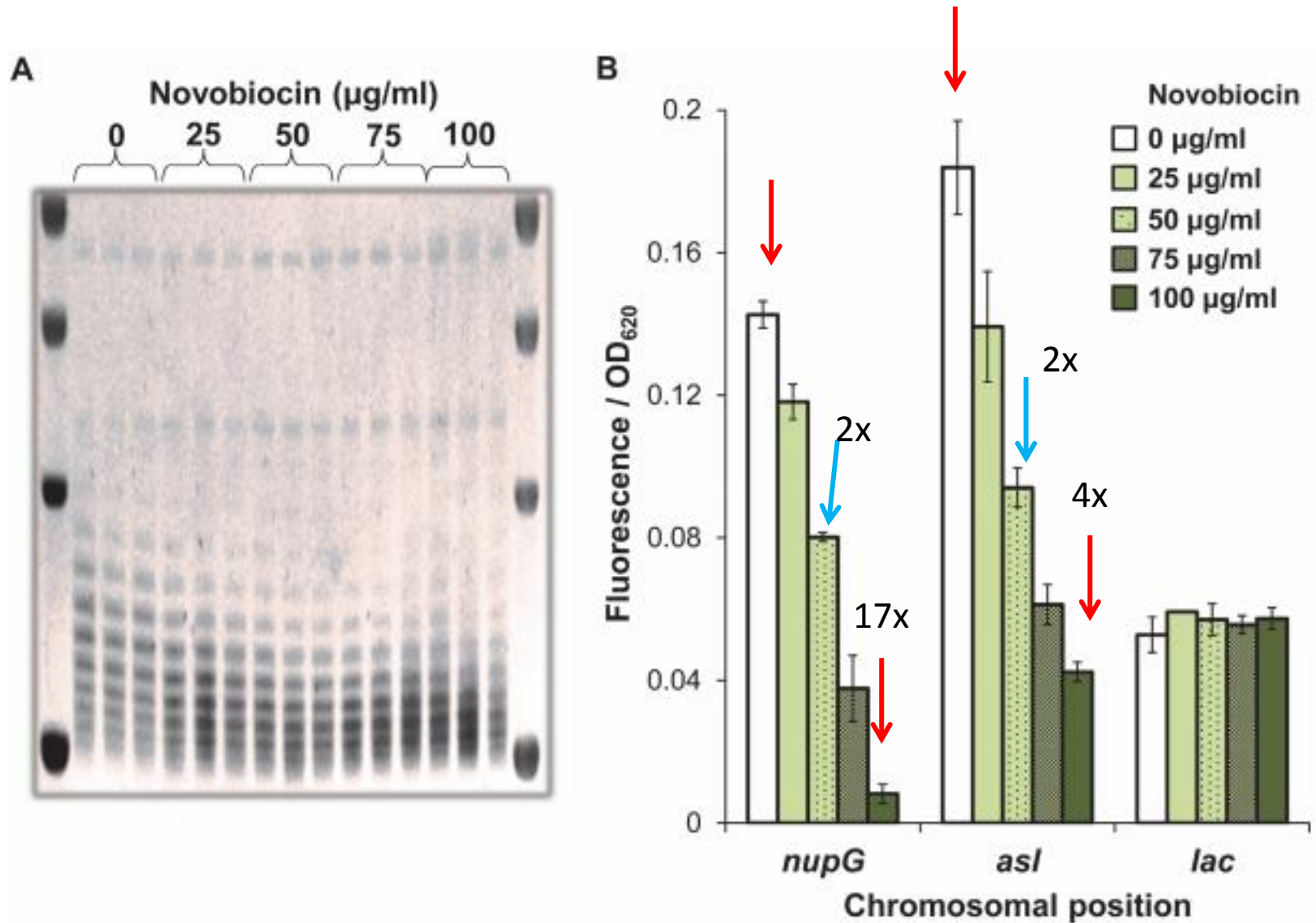
- Baixa expressão devido a silenciamento em tsEPODs



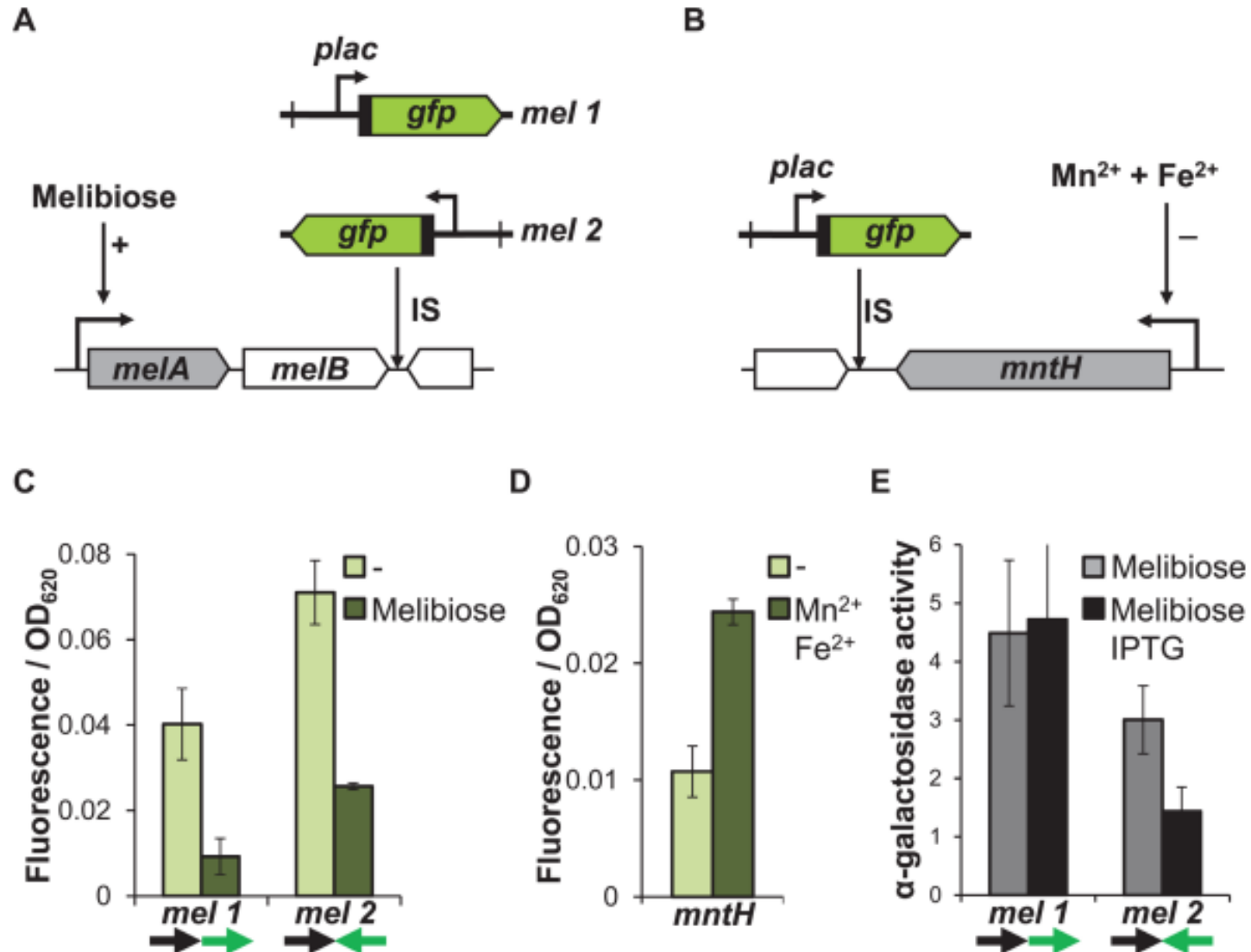
- Supressão foi devido às propriedades intrínsecas dos tsEPODs?



- Influência da DNA girase



- Expressão de genes vizinhos influencia promotores “downstream”



Discussão

- Meios mínimo de nutrientes limita variação da quantidade de genes para um máximo de 1.4x
- Elementos não-codificadores e não-reguladores para minimizar rompimento de processos cromossomais locais
- Reporter cassette pequeno comparado às sondas utilizadas em outros estudos
- Expressão gênica varia de acordo com o local de inserção dentro dos mesmos macrodomínios, e que tanto eles quanto regiões não estruturadas apresentam regiões de alta/baixa atividade

- Variação da expressão dependente da posição ocorreu somente em função da transcrição de *gfp* derivado do promotor *lac*
- Níveis de expressão gênica dependentes da posição podem variar ~ 300x
- Diferenças substanciais na expressão podem existir dentro dos genomas bacterianos
- Posição genômica dos tsEPODs estão relacionadas à regiões do cromossomo com alta ocupância de NAPs: centro organizacional do nucleóide

- Silenciamento em tsEPODs: ligação de um NAP em particular, uma combinação de NAPs ou da arquitetura do DNA?
- Transcrição reprimida devido às características intrínsecas dos tsEPODs, não por conter promotores fracos
- Reminiscente de domínios associados à lamina nuclear em eucariontes
- Baixa expressão em outros loci:
 - *Ycb*: ~500bp de tsEPODs
 - *dkgB*: inserido “downstream” de operon ribossomal que provavelmente tem alta expressão
 - *thiQ*: ?

- ↑ Expressão em *asl* e *nupG*: dependente da atividade da DNA girase
- Transcrição do reporter impacta na expressão de genes vizinhos, mas não quando está localizado “upstream” com promotor no sentido da transcrição
- Impacto na habilidade de transcrição da RNAP downstream? “Twin supercoiling domain model

Conclusão

- Diferentes mecanismos responsáveis por variações na expressão gênica
- Mais estudos: dinâmicas espaciais e temporais do nucleóide e dos mecanismos identificados
- Demonstraram grande diferença na expressão gênica de acordo com a localização no cromossomo – posição é mecanismo regulatório de genomas bacterianos

Referências

- Valens, M., Penaud, S., Rossignol, M., Cornet, F., & Boccard, F. (2004). Macrodomain organization of the Escherichia coli chromosome. *The EMBO journal*, 23(21), 4330-4341.
- Wang, X., Llopis, P. M., & Rudner, D. Z. (2013). Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 191-203.