

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO PARA *Escherichia coli*
BASEADOS EM PROMOTORES ATIVOS NA FASE ESTACIONÁRIA DE
CRESCIMENTO

JONATHAN LUIZ WÖHLKE

MANAUS, AMAZONAS

SETEMBRO/2012

JONATHAN LUIZ WÖHLKE

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO PARA *Escherichia coli*
BASEADOS EM PROMOTORES ATIVOS NA FASE ESTACIONÁRIA DE
CRESCIMENTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologia para Saúde.

MANAUS, AMAZONAS
SETEMBRO/2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

W846c Wöhlke, Jonathan Luiz
Construção de vetores de expressão para Escherichia coli baseados em promotores ativos na fase estacionária de crescimento / Jonathan Luiz Wöhlke. - Manaus: UFAM, 2012.
79f. il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas.
Orientador: Prof. D^a. Spartaco Astolfi Filho

1. Vetores 2. Escherichia coli 3. Expressão de proteínas 4. Fase estacionária I. Astolfi Filho, Spartaco (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007)579.84(043.3)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, João e Ironildes,
ao meu orientador Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho
e ao meu grande amor Bruna Protti.

“No one could be a good observer unless he was an active theorizer”

“Para ser um bom observador é preciso ser um bom teórico”

(Charles Darwin)



RESUMO

Plasmídeos são elementos genéticos extracromossomais, que no geral não são essenciais para a sobrevivência da bactéria, entretanto, conferem vantagens peculiares (como resistência à antibióticos) para o organismo. Para engenharia genética, plasmídeos de ocorrência natural têm sido modificados extensivamente para produção de vetores com as características desejadas. Promotores são elementos de um vetor que podem ter um profundo efeito na força e duração da transcrição, e conseqüentemente, no rendimento proteico. A síntese de mRNA inicia quando a RNA polimerase se liga a seqüência promotora, adjacente ao gene alvo. Fatores sigma são proteínas que regulam a transcrição em bactérias, e os mesmos podem ser ativados em diferentes condições ambientais. O fator sigma (S) é visto como um regulador mestre de resposta ao estresse geral, codificado a partir do gene RpoS na fase estacionária tardia. Este fator é o regulador primário dos genes de fase estacionária. Promotores baseados em reguladores metabólicos de fase estacionária representam uma classe de promotores controlados metabolicamente e que podem ser explorados para o design de vetores de expressão. Neste projeto foram desenvolvidos três cassetes de expressão para a construção de vetores de expressão, os quais possuem promotores com afinidade pelo fator sigma S, com o objetivo de avaliar o perfil de expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. Para a avaliação da força dos promotores e do perfil de expressão, utilizou-se a proteína verde fluorescente (GFP) como gene repórter. Os três vetores construídos, os quais foram denominados de p26, p53 e pFS expressaram a GFP com a correta formação do fluoróforo, sendo que os vetores p26 e p53 apresentaram superexpressão da proteína recombinante, quando comparados ao vetor pGS21a. Ademais, observou-se que os vetores aqui construídos estão contribuindo para a redução da taxa de crescimento e filamentação da *E. coli*. Esta plasticidade morfológica confere à bactéria maior capacidade de armazenamento da proteína recombinante expressa.

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – FATORES SIGMA EM <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ADAPTADO DE HELMANN (2001).	11
TABELA 02 - LINHAGENS E GENÓTIPOS DE <i>E. COLI</i> UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO.....	27
TABELA 03 - MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS COMPOSIÇÕES.	27
TABELA 04 – IDENTIFICAÇÃO E SEQUÊNCIA DOS NUCLEOTÍDEOS.....	30
TABELA 05 – SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS CASSETES DE EXPRESSÃO. AS CORES POSSUEM CORRELAÇÃO COM OS ELEMENTOS INDICADOS NA FIGURA 16.....	32
TABELA 06 – SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE, VARIANTE 'CYCLE 3', OBTIDA DO <i>EUROPEAN NUCLEOTIDE ARCHIVE</i>	33
TABELA 07 – MODIFICAÇÃO DOS CÓDONS DA GFP PARA ELIMINAÇÃO DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DE INTERESSE, CONFORME INDICADOS.	34
TABELA 08 – DESENHO DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA GFP, MODIFICADA, CONTENDO OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DESCRITOS EM CADA EXTREMIDADE.....	35
TABELA 09 – DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO SÍTIO DE <i>NDEI</i> NO VETOR PUN.	79
TABELA 10 – DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA ELIMINAÇÃO DO SÍTIO DE <i>NDEI</i> NO VETOR PUN.	79
TABELA 11 – DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA LIGAÇÃO DAS EXTREMIDADES DO VETOR PUN, APÓS MODIFICAÇÕES.....	79
TABELA 12 – DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA INSERÇÃO DO POLYLINKER A NO VETOR PUNA.	79
TABELA 13 - DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA DIGESTÃO DOS CASSETES DE EXPRESSÃO SINTETIZADOS.	80
TABELA 14 - DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA LINEARIZAÇÃO DO VETOR PUNA, UTILIZANDO A ENZIMA <i>NOTI</i>	80
TABELA 15 - DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA DEFOSFORILAÇÃO DAS EXTREMIDADES 5´ DO VETOR PUNA.	80
TABELA 16 - DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA INSERÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO NO VETOR PUNA.	80
TABELA 17 - DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA AVALIAÇÃO DA INSERÇÃO DOS CASSETES DE EXPRESSÃO.....	81
TABELA 18 - DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA DIGESTÃO DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA GFP.....	81
TABELA 19 - DESCRIÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA E CONDIÇÕES REACIONAIS PARA INSERÇÃO DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA GFP NOS VETORES P26, P53 E PFS.....	81

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01 – **A** | UM MODELO BASEADO EM ESTUDOS DE CRISTALOGRAFIA DO *DOCKING* INICIAL DA RNA POLIMERASE HOLOENZIMA A UMA REGIÃO PROMOTORA DO DNA. AS FITAS DE DNA SÃO MOSTRADAS EM VERDE, COM AS REGIÕES -10 E -35 DESTACADAS EM AMARELO E AS REGIÕES -10 ESTENDIDA E ELEMENTO UP EM VERMELHO. A RNA POLIMERASE ESTÁ ILUSTRADA COM AS SUBUNIDADES B E B' COLORIDAS EM AZUL CLARO E ROSA, RESPECTIVAMENTE. ANTD ESTÃO COLORIDOS EM CINZA E OS DIFERENTES DOMÍNIOS DE Σ EM VERMELHO. AS ESFERAS CINZAS DENOMINADAS I E II REPRESENTAM OS DOMÍNIOS ACTD QUE SE LIGAM AO PROMOTOR. **B** | DESENHO ILUSTRATIVO E SIMPLIFICADO DO MODELO APRESENTADO EM A. ADAPTADO DE BROWNING E BUSBY (2004). 2
- FIGURA 02 – O CAMINHO DA INICIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO EM PROMOTORES BACTERIANOS. A RNA POLIMERASE (R) INTERAGE COM O PROMOTOR (P) PARA A FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO FECHADO (RP_C). A LINHA PONTILHADA MOSTRA A REGIÃO DO PROMOTOR QUE ESTÁ LIGADA À RNA POLIMERASE HOLOENZIMA. A DUPLA FITA DE DNA É SEPARADA AO REDOR DO SÍTIO INICIAL DE TRANSCRIÇÃO, REPRESENTADO POR UMA BOLHA, PARA A FORMAÇÃO DO COMPLEXO ABERTO (RP_O). O COMPLEXO DE INICIAÇÃO É FORMADO (RP_{INT}) E A SÍNTESE DA CADEIA DE RNA COMEÇA COM A FORMAÇÃO DE UMA LIGAÇÃO FOSFODIESTER ENTRE O PRIMEIRO E O NUCLEOTÍDEO ADJACENTE. A ELONGAÇÃO É O ESTÁGIO FINAL E O COMPRIMENTO DA CADEIA DE RNA AUMENTA, ILUSTRADO PELA LINHA VERMELHA. ADAPTADO DE BROWNING E BUSBY (2004). 4
- FIGURA 03 – A FIGURA ILUSTRA A ORGANIZAÇÃO DA RNA POLIMERASE E SUBUNIDADES ATIVADORAS DURANTE O PROCESSO DE ATIVAÇÃO NO PROMOTOR. MUITOS ATIVADORES FUNCIONAM COMO DÍMEROS, AQUI REPRESENTADOS. **A** | ATIVAÇÃO CLASSE I. O ATIVADOR É LIGADO A UM SÍTIO *UPSTREAM* E INTERAGE COM ACTD DA RNA POLIMERASE, E DESTA FORMA RECRUTANDO A POLIMERASE PARA O PROMOTOR. **B** | ATIVAÇÃO CLASSE II. O ATIVADOR SE LIGA A UMA REGIÃO ALVO, ADJACENTE À REGIÃO -35 DO PROMOTOR, E O ATIVADOR LIGADO INTERAGE COM O DOMÍNIO 4 DO FATOR SIGMA 70. **C** | ATIVAÇÃO ATRAVÉS DA MUDANÇA CONFORMACIONAL. O ATIVADOR, ILUSTRADO EM AZUL, SE LIGA NA REGIÃO ESPAÇADORA E REALINHA AS REGIÕES -10 E -35 PARA QUE A RNA POLIMERASE POSSA SE LIGAR AO PROMOTOR. ESTA ATIVAÇÃO OCORRE NOS CASOS EM QUE O ESPAÇAMENTO ENTRE AS REGIÕES -35 E -10 NÃO É ÓTIMO PARA A LIGAÇÃO DA RNA POLIMERASE. ADAPTADO DE BROWNING E BUSBY (2004). 8
- FIGURA 04 – MECANISMOS DE REPRESSÃO. **A** | REPRESSÃO POR IMPEDIMENTO ESTÉRICO. O REPRESSOR SE LIGA AO PROMOTOR E BLOQUEIA O RECONHECIMENTO DO PROMOTOR PELA RNA POLIMERASE HOLOENZIMA. **B** | REPRESSÃO POR *LOOPING*. REPRESSORES SE LIGAM À REGIÕES DISTAIS E INTERAGEM ENTRE SI, FORMANDO UM *LOOPING* E IMPEDINDO A APROXIMAÇÃO DA RNA POLIMERASE HOLOENZIMA. **C** | REPRESSÃO PELA MODULAÇÃO DA PROTEÍNA ATIVADORA. O REPRESSOR SE LIGA AO ATIVADOR E BLOQUEIA O SEU RECONHECIMENTO PELA RNA POLIMERASE HOLOENZIMA. ADAPTADO DE BROWNING E BUSBY (2004). 9

FIGURA 05 – MAPA GENÉRICO DE ESTRUTURA/FUNÇÃO PARA MEMBROS DA FAMÍLIA SIGMA 70. A SEQUÊNCIA PROTEICA É REPRESENTADA POR UMA BARRA, DA REGIÃO AMINO TERMINAL (ESQUERDA) PARA A CARBOXI TERMINAL (DIREITA). A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO É DIVIDA EM QUATRO REGIÕES CONSERVADAS. AMINOÁCIDOS IMPORTANTES PARA O RECONHECIMENTO DA REGIÃO -10 E ABERTURA DAS FITAS DO PROMOTOR ESTÃO EM UMA ALFA-HÉLICE (HÉLICE 14), ADAPTADO DE (HELMANN, 2001).....	13
FIGURA 06 – MAPA PLASMIDIAL DO pBR322. REGIÕES IMPORTANTES DESTACADAS SÃO OS GENES DE RESISTÊNCIA PARA AMPICILINA E TETRACICLINA (AP ^R) E (TC ^R) E A ORIGEM DE REPLICAÇÃO (ORI).....	16
FIGURA 07 – SEQUÊNCIA DE UM <i>POLYLINKER</i> . SÃO COMUMENTE UTILIZADOS PARA CONSTRUIR PLASMÍDEOS RECOMBINANTES, OS QUAIS CARREGAM FRAGMENTOS DE DNA EXÓGENOS. ADAPTADO DE LODISH <i>ET AL.</i> (2000).	20
FIGURA 08 – A – TERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO MEDIADA PELA PROTEÍNA RHO. ESTA PROTEÍNA SE LIGA AO mRNA NASCENTE ATÉ O PONTO DE DESESTABILIZAÇÃO DO COMPLEXO DE TRANSCRIÇÃO B - ESTRUTURA EM GRAMPO DO MECANISMO DE TERMINAÇÃO INTRÍNSECA DA TRANSCRIÇÃO, SEGUIDO DE UMA SEQUÊNCIA DE RESÍDUOS DE RUTP QUE FORMAM UMA LIGAÇÃO FRACA COM OS RESÍDUOS DATP _(S) NO HÍBRIDO RNA-DNA. ESTA INTERAÇÃO PROVOCA UMA PARADA NO COMPLEXO DE TRANSCRIÇÃO, ENQUANTO OCORRE A FORMAÇÃO DO GRAMPO. ADAPTADO DE GREIVE E VON HIPPEL (2005).	21
FIGURA 09 – REAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS E ESTRUTURA REPRESENTATIVA DO FLUORÓFORO DA GFP. A ESTRUTURA EM BARRIL BETA DA GFP, ILUSTRANDO A POSIÇÃO DO FLUORÓFORO NA PROTEÍNA E O ESTADO DE PRÉ-CICLIZAÇÃO. B BIOSÍNTESE DO FLUORÓFORO, A CONJUGAÇÃO DO ELÉTRON π ESTÁ REPRESENTADA PELO SOMBREADO VERDE. ADAPTADO DE PAKHOMOV E MARTYNOV (2008).	22
FIGURA 10 – A ESTRUTURA EM BARRIL BETA DA GFP. B TOPOLOGIA DA GFP. AS FOLHAS BETAS ESTÃO ILUSTRADAS PELAS SETAS VERDES; AS ALFA HÉLICES SÃO INDICADAS PELOS CILINDROS AZUIS; A LOCALIZAÇÃO DO FLUORÓFORO É ILUSTRADA PELO QUADRADO AMARELO, NA ALFA HÉLICE DE MAIOR COMPRIMENTO; AS SETAS PRETAS DESTACAM OS CONTATOS ENTRE AS FOLHAS BETAS NÃO CONTÍNUAS NA ESTRUTURA NATIVA. ADAPTADO DE UGRINOV E CLARK (2010).	23
FIGURA 11 – PERFIS ESPECTRAIS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DA GFP <i>WILD TYPE</i> . ADAPTADO DE DAY E DAVIDSON (2009).	24
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MAPA FÍSICO DO VETOR pUC18. AS LINHAS TRACEJADAS EM AMARELO INDICAM A POSIÇÃO APROXIMADA DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PUN.....	28
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MAPA FÍSICO DO VETOR pUN. DESTAQUE PARA A ORIGEM DE REPLICAÇÃO, GENE DE RESISTÊNCIA À INSULINA, SÍTIOS DE RESTRIÇÃO <i>NDEI</i> E <i>NOTI</i>	29
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MAPA FÍSICO DO VETOR pGS-21A E DO SEU SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM.	30

FIGURA 15 – POLYLINKER, CONSTRUÍDO COM EXTREMIDADES COESIVAS E SEUS RESPECTIVOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. * <i>NotI</i> NÃO RECONSTRÓI O SÍLIO DE RECONHECIMENTO PARA A ENZIMA <i>NotI</i> .	31
FIGURA 16 – ILUSTRA O DESENHO GERAL DOS CASSETES DE EXPRESSÃO E OS RESPECTIVOS ELEMENTOS IDENTIFICADOS	32
FIGURA 17 – VETORES COMERCIAIS CONTENDO OS CASSETES DE EXPRESSÃO E O GENE DA GFP DESENHADOS PARA ESTE TRABALHO.	36
FIGURA 18 - ESQUEMA ILUSTRANDO A METODOLOGIA DE EXPRESSÃO	42
FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO VETOR pUN EM GEL DE AGAROSE 0,8%, REVELAÇÃO COM BROMETO DE ETÍDEO. FIGURA (A) ILUSTRA DUAS AMOSTRAS EM DUPLICATA DO VETOR pUN. FIGURA (B) ILUSTRA A DIGESTÃO ENZIMÁTICA, UTILIZANDO <i>NdeI</i> , E CONSEQUENTE ABERTURA DO VETOR pUN.	45
FIGURA 20 – ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS PARA DESTRUÇÃO DO SÍLIO DE <i>NdeI</i> E POSTERIOR CIRCULARIZAÇÃO DO VETOR pUN.	46
FIGURA 21 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS EXTRAÍDOS DOS CLONES DH5AF'IQ, TRANSFORMADAS COM VETOR pUN, UTILIZANDO KIT ILLUSTRATE GE® PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION.	46
FIGURA 22 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS EXTRAÍDOS DOS CLONES RECOMBINANTES CONTENDO O VETOR pUN MODIFICADO, INCUBADO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>NdeI</i> .	47
FIGURA 23 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO VETOR pUN PARA CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO POLYLINKER, UTILIZANDO AS ENZIMAS <i>NotI</i> , <i>BglII</i> , <i>PacI</i> E <i>EcoRV</i> . GEL DE AGAROSE 0,8%, BROMETO DE ETÍDIO 0,01%, 30 MINUTOS DE CORRIDA, 100 V.	48
FIGURA 24 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA DIGESTÃO DOS VETORES pBSK CONTENDO OS CASSETES JK26, JK53 E JKFS, UTILIZANDO <i>NotI</i> . AS SETAS INDICAM OS FRAGMENTOS CORRESPONDEM AOS CASSETES DE EXPRESSÃO. GEL DE AGAROSE 2%, BROMETO DE ETÍDIO 0,01%, 20 MINUTOS DE CORRIDA, 100V.	48
FIGURA 25 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA DIGESTÃO DO VETOR pUN, UTILIZANDO A ENZIMA <i>NotI</i> . GEL DE AGAROSE 0,8%, BROMETO DE ETÍDIO 0,01%, 40 MINUTOS DE CORRIDA, 100V.	49
FIGURA 26 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA DIGESTÃO DOS VETORES pUN-JK26, pUN-JK53 E pUN-JKFS, UTILIZANDO <i>NotI</i> , PARA CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DOS CASSETES DE EXPRESSÃO. GEL DE AGAROSE 1%, BROMETO DE ETÍDIO 0,01%, 40 MINUTOS DE CORRIDA, 100 V.	50
FIGURA 27 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA DIGESTÃO DO VETOR pBSK-GFP CONTENDO O GENE DA GFP, UTILIZANDO <i>NdeI</i> E <i>BamHI</i> . A SETA INDICA O FRAGMENTO CORRESPONDENTE AO GENE DA GFP. GEL DE AGAROSE 1%, BROMETO DE ETÍDIO 0,01%, 20 MINUTOS DE CORRIDA, 100V.	51
FIGURA 28 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA DIGESTÃO DUPLA DOS VETORES p26G, p53G E pFSG UTILIZANDO <i>NdeI</i> E <i>BamHI</i> . O INSERTO LIBERADO CORRESPONDE AO GENE DA GFP. GEL DE AGAROSE 0,8%, BROMETO DE ETÍDIO 0,01%, 40 MINUTOS DE CORRIDA, 100V.	52

FIGURA 29 - DIGESTÃO DOS VETORES p26G, p53G e pFSG UTILIZANDO <i>NotI</i> . O INSERTO LIBERADO CORRESPONDE AO CONJUNTO CASSETE DE EXPRESSÃO + GFP. GEL DE AGAROSE 0,8%, BROMETO DE ETÍDIO 0,01%, 40 MINUTOS DE CORRIDA, 100V	53
FIGURA 30 – MAPA FÍSICO PLASMIDIAL PARA TODOS OS VETORES CONSTRUÍDOS, AQUI REPRESENTADO PELO VETOR p26G.....	54
FIGURA 31 – FRASCOS DE ERLLENMEYER VISUALIZADOS AO FINAL DO EXPERIMENTO, PARA CADA CLONE RECOMBINANTE INDICADO. A – LUZ VISÍVEL. B – LUZ ULTRAVIOLETA, 365NM.....	55
FIGURA 32 – CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO E FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O CLONE RECOMBINANTE DH5AF'IQ + pUN. A COLUNA DA ESQUERDA REPRESENTA A FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM URF (UNIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA). A COLUNA DA DIREITA REPRESENTA A DENSIDADE ÓTICA BACTERIANA (OD ₆₀₀). (F) = FLUORESCÊNCIA.	56
FIGURA 33 - CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO E FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O CLONE RECOMBINANTE DH5AF'IQ + p26G. A COLUNA DA ESQUERDA REPRESENTA A FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM URF (UNIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA). A COLUNA DA DIREITA REPRESENTA A DENSIDADE ÓTICA BACTERIANA (OD ₆₀₀). (F) = FLUORESCÊNCIA.	57
FIGURA 34 - CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO E FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O CLONE RECOMBINANTE DH5AF'IQ + p53G. A COLUNA DA ESQUERDA REPRESENTA A FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM URF (UNIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA). A COLUNA DA DIREITA REPRESENTA A DENSIDADE ÓTICA BACTERIANA (OD ₆₀₀). (F) = FLUORESCÊNCIA.	57
FIGURA 35 - CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO E FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O CLONE RECOMBINANTE DH5AF'IQ + pFSG. A COLUNA DA ESQUERDA REPRESENTA A FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM URF (UNIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA). A COLUNA DA DIREITA REPRESENTA A DENSIDADE ÓTICA BACTERIANA (OD ₆₀₀). (F) = FLUORESCÊNCIA.	58
FIGURA 36 - CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO E FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O CLONE RECOMBINANTE BL21(DE3)pLYSS + PGS21AG. A COLUNA DA ESQUERDA REPRESENTA A FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM URF (UNIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA). A COLUNA DA DIREITA REPRESENTA A DENSIDADE ÓTICA BACTERIANA (OD ₆₀₀). (F) = FLUORESCÊNCIA.....	59
FIGURA 37 - CURVAS DE FLUORESCÊNCIAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DOS CLONES RECOMBINANTES, SOBREPOSTAS. A COLUNA DA ESQUERDA REPRESENTA A FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM URF (UNIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA). (F) = FLUORESCÊNCIA.....	60
FIGURA 38 - CURVAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO EM FUNÇÃO DO TEMPO DOS CLONES RECOMBINANTES, SOBREPOSTAS. A COLUNA DA DIREITA REPRESENTA A DENSIDADE ÓTICA BACTERIANA (OD ₆₀₀).....	60
FIGURA 39 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PRODUZIDAS PELOS CLONES RECOMBINANTES INDICADOS EM CADA FIGURA. ALIQUOTAS DOS TEMPOS 4H, 28H E 48H DE CADA EXPERIMENTO. REVELAÇÃO COM AZUL DE COMASSIE.	62

FIGURA 40 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PRODUZIDAS PELOS CLONES RECOMBINANTES INDICADOS EM CADA FIGURA. ALIQUOTAS DOS TEMPOS 4H, 28H E 48H DE EXPERIMENTO, PARA CADA EXPERIMENTO. VISUALIZAÇÃO SOB LUZ ULTRAVIOLETA, 365NM.	62
FIGURA 41 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PRODUZIDAS PELOS CLONES RECOMBINANTES INDICADOS EM CADA FIGURA, APÓS 48H DE CRESCIMENTO. A – GEL CORADO COM AZUL DE COMASSIE. B – GEL VISUALIZADO SOB LUZ ULTRAVIOLETA (365NM), PREVIAMENTE À COLORAÇÃO COM O AZUL DE COMASSIE.	63
FIGURA 42 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PRODUZIDAS PELOS CLONES RECOMBINANTES INDICADOS EM CADA FIGURA, APÓS 48H DE CRESCIMENTO. A – GEL CORADO COM AZUL DE COMASSIE. B – GEL VISUALIZADO SOB LUZ ULTRAVIOLETA (365NM), PREVIAMENTE À COLORAÇÃO COM O AZUL DE COMASSIE.	64
FIGURA 43 – MICROFOTOGRAFIA ÓTICA E DE FLUORESCÊNCIA. IMAGENS OBTIDAS UTILIZANDO LENTE OBJETIVA DE 100X E ÓLEO DE IMERSÃO. A - CLONE RECOMBINANTE DH5AF'IQ + pUN, OBSERVADO COM FONTE DE LUZ BRANCA. B – CLONE RECOMBINANTE DH5AF'IQ + p26G, OBSERVADO COM FONTE DE LUZ ULTRAVIOLETA E CONJUNTO DE FILTROS PARA VISUALIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA GFP.....	65
FIGURA 44 - MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA. IMAGENS OBTIDAS UTILIZANDO LENTE OBJETIVA DE 100X E ÓLEO DE IMERSÃO, OBSERVADAS COM FONTE DE LUZ ULTRAVIOLETA E CONJUNTO DE FILTROS PARA VISUALIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA GFP. A - CLONE RECOMBINANTE BL21(DE3)pLYSS + PGS21AG. B – CLONE RECOMBINANTE DH5AF'IQ + p53G.....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Regulação da Expressão Gênica em Bactérias	1
1.2	Promotores Procariotos	3
1.2.1	Sequências Promotoras	5
1.2.2	Ligantes de Pequena Massa Molecular	5
1.2.3	Fatores de Transcrição	6
1.2.4	Regiões Cromossomais Superenovadas	9
1.3	Fatores Sigma	10
1.3.1	Fator sigma 38 / (S) (σ^{38} / σ^S) ou RpoS	11
1.3.2	Regulação da Expressão do fator sigma (S)	12
1.3.3	Estrutura Domínio dos Fatores Sigma	13
1.4	Expressão de Proteínas Recombinantes	14
1.5	Vetores Plasmidiais de Expressão	15
1.5.1	Origem de Replicação	16
1.5.2	Promotores	17
1.5.3	Sequência Shine-Dalgarno	20
1.5.4	Sítio Múltiplo de Clonagem (“Polylinker”)	20
1.5.5	Terminador de Transcrição	20
1.5.6	Gene Repórter	21
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivos Gerais	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Linhagens de <i>E. coli</i>	27
4.2	Reagentes	27
4.3	Meios de cultura	27
4.4	Marcadores moleculares	28
4.5	Plasmídeos	28
4.5.1	Plasmídeo pUN	28
4.5.2	Plasmídeo pGS-21a	29
4.6	Design e Síntese do <i>Polylinker A</i>	30
4.7	Design dos Cassetes de expressão	31

4.8	Design do Gene da GFP.....	33
4.9	Síntese Química dos Cassetes de Expressão e do Gene da GFP	35
4.10	Modificação do Plasmídio pUN.....	36
4.10.1	Preparo de células <i>E.coli</i> eletrocompetentes	36
4.10.2	Transformação da hospedeira.....	37
4.10.3	Eliminação do sítio de restrição <i>NdeI</i> do vetor pUN.....	37
4.11	Construção dos Plasmídeos Recombinantes p26, p53 e pFS.....	38
4.11.1	Inserção do <i>polylinker</i> A no vetor pUNA.....	38
4.11.2	Linearização e defosforilação do vetor pUNA	38
4.11.3	Inserção dos cassetes de expressão no vetor pUNA.....	39
4.11.4	Digestão e purificação da sequência codificadora da GFP.....	39
4.11.5	Inserção do gene da GFP nos vetores p26, p53 e pFS.....	40
4.11.6	Identificação do gene da proteína verde fluorescente (GFP) nos plasmídeos recombinantes por análise de restrição.....	40
4.11.7	Transformação em <i>E. coli</i> DH5 α F'IQ com os plasmídeos recombinantes p26G, p53G e pFSG	41
4.12	Expressão da proteína recombinante	41
4.12.1	Obtenção dos extratos de proteínas, solúveis e insolúveis.....	42
4.13	Avaliação da Expressão	43
4.13.1	Espectroscopia de fluorescência.....	43
4.13.2	Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE.....	43
4.13.3	Visualização da proteína verde fluorescente sob luz ultravioleta.....	43
4.13.4	Coloração de proteínas por Azul Brilhante de <i>Coomassie</i> G250	44
4.13.5	Microscopia de fluorescência	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1	Eliminação do sítio de restrição <i>NdeI</i> do vetor pUN	44
5.2	Inserção do <i>Polylinker</i> A no Vetor pUNA.....	47
5.3	Digestão e Purificação dos Cassetes de Expressão.....	48
5.4	Linearização e Defosforilação do Vetor pUNA	49
5.5	Ligação dos Cassetes de Expressão no Vetor pUNA	49
5.6	Digestão e Purificação da Sequência Codificadora da GFP.....	50
5.7	Introdução da Sequência Codificadora da GFP nos Cassetes de Expressão ...	51
5.8	Mapa Físico dos Plasmídeos Recombinantes Construídos.....	53
5.9	Perfil de Crescimento Bacteriano e Expressão da GFP	54

5.10	Análise da Expressão Heteróloga da Proteína GFP em <i>E.coli</i> em Meio Líquido	61
5.11	Microscopia de Fluorescência	65
6	CONCLUSÕES.....	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8	APÊNDICE A	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Regulação da Expressão Gênica em Bactérias

O componente central da regulação da transcrição gênica nas bactérias é o complexo de unidades da RNA polimerase, DNA dependente, o qual é responsável por toda a transcrição (Browning e Busby, 2004).

A enzima em si, RNA polimerase, responsável pela transcrição, é composta pelas subunidades $\beta\beta'\alpha_2\omega$, conforme ilustrado na figura 01. Estudos estruturais de alta resolução mostram a formação de uma estrutura em forma de garra de caranguejo (Zhang *et al.*, 1999).

O sítio ativo da RNA polimerase, o qual é determinante tanto para ligação à fita de DNA quanto à formação do RNA durante a transcrição, é formado pelas subunidades maiores β e β' (Korzheva *et al.*, 2000).

Para a RNA polimerase iniciar a transcrição em um promotor particular, esta deve inicialmente interagir com uma subunidade σ , para formar a holoenzima ($E\sigma$). A subunidade σ possui três funções principais: garantir o reconhecimento das sequências específicas do promotor, posicionar a RNA polimerase holoenzima no promotor alvo e facilitar a separação das fitas de DNA próximo ao sítio inicial de transcrição (Wosten, 1998).

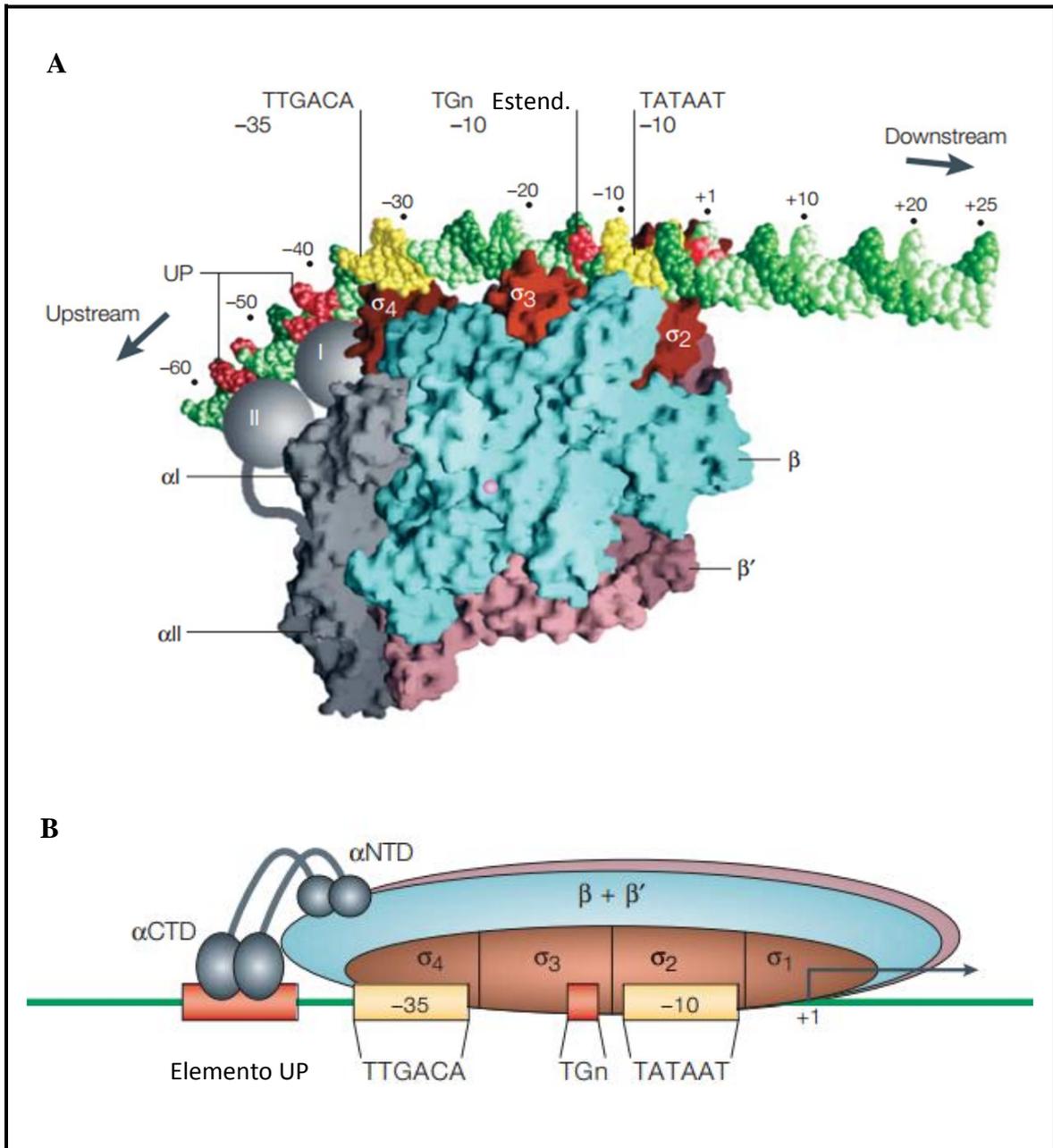


Figura 01 – **A** | Um modelo baseado em estudos de cristalografia do *docking* inicial da RNA polimerase holoenzima a uma região promotora do DNA. As fitas de DNA são mostradas em verde, com as regiões -10 e -35 destacadas em amarelo e as regiões -10 estendida e elemento UP em vermelho. A RNA polimerase está ilustrada com as subunidades β e β' coloridas em azul claro e rosa, respectivamente. α NTD estão coloridos em cinza e os diferentes domínios de σ em vermelho. As esferas cinzas denominadas I e II representam os domínios α CTD que se ligam ao promotor. **B** | Desenho ilustrativo e simplificado do modelo apresentado em A. Adaptado de Browning e Busby (2004).

1.2 Promotores Procariotos

Promotores são sequências de DNA que controlam a transcrição de todos os genes. O início da transcrição requer a interação da RNA polimerase com a sequência promotora e a consequente formação de um complexo de abertura, na qual o DNA dupla fita próximo ao início do ponto de transcrição é separado (Dehaseth *et al.*, 1998).

A síntese da cadeia de RNA inicia, a partir da fita de DNA molde, com a formação da primeira ligação fosfodiéster entre o nucleotídeo trifosfato iniciador e o adjacente. Após esta fase de iniciação, a RNA polimerase é movimentada para o complexo de alongação, o qual é responsável pela extensão da cadeia de RNA. O passo principal na iniciação é o reconhecimento do promotor pela RNA polimerase, e também diferentes sequências específicas de DNA que auxiliam neste processo (Busby e Ebright, 1994).

Quatro diferentes regiões específicas de DNA foram identificadas. As duas principais são o hexâmero -10 e o hexâmero -35, os quais estão localizados 10 e 35 pares de bases *upstream*, respectivamente, do sítio inicial de transcrição. As regiões -10 promotoras são reconhecidas pelo domínio 2 da subunidade sigma da RNA polimerase. Similarmente, as regiões -35 promotoras são reconhecidas pelo domínio 4 da subunidade sigma da RNA polimerase (Browning e Busby, 2004).

Os dois outros domínios de DNA importantes são os domínios -10 estendidos e o elemento UP. O domínio de DNA -10 estendido é um motivo de 3 a 4 pares de bases, localizado imediatamente “upstream” ao hexâmero -10, o qual é reconhecido pelo domínio 3 da subunidade sigma da RNA polimerase (Murakami *et al.*, 2002). O elemento UP é uma sequência de aproximadamente 20 pares de bases, localizado *upstream* do hexâmero -35, o qual é reconhecido pelo domínio C-terminal das subunidades alfa da RNA polimerase (Ross *et al.*, 2001). Portanto, juntas, as regiões -10, -35, -10 estendido e UP especificam o início da ligação da RNA polimerase ao promotor, conforme ilustrado na figura 01, entretanto, a contribuição relativa de cada elemento difere de promotor para promotor (Browning e Busby, 2004).

Após a ligação inicial da RNA polimerase, as fitas de DNA na posição aproximada -10 até a +2, imediatamente *downstream* ao ponto de início da transcrição, são separadas para a formação da bolha de transcrição e consequente geração do complexo aberto, conforme figura 02 (Tsujiikawa *et al.*, 2002). Basicamente, os principais passos que sofrem regulação são: a ligação inicial da RNA polimerase para gerar o complexo fechado, a isomerização para o complexo aberto e os passos iniciais para a síntese da cadeia do RNA.

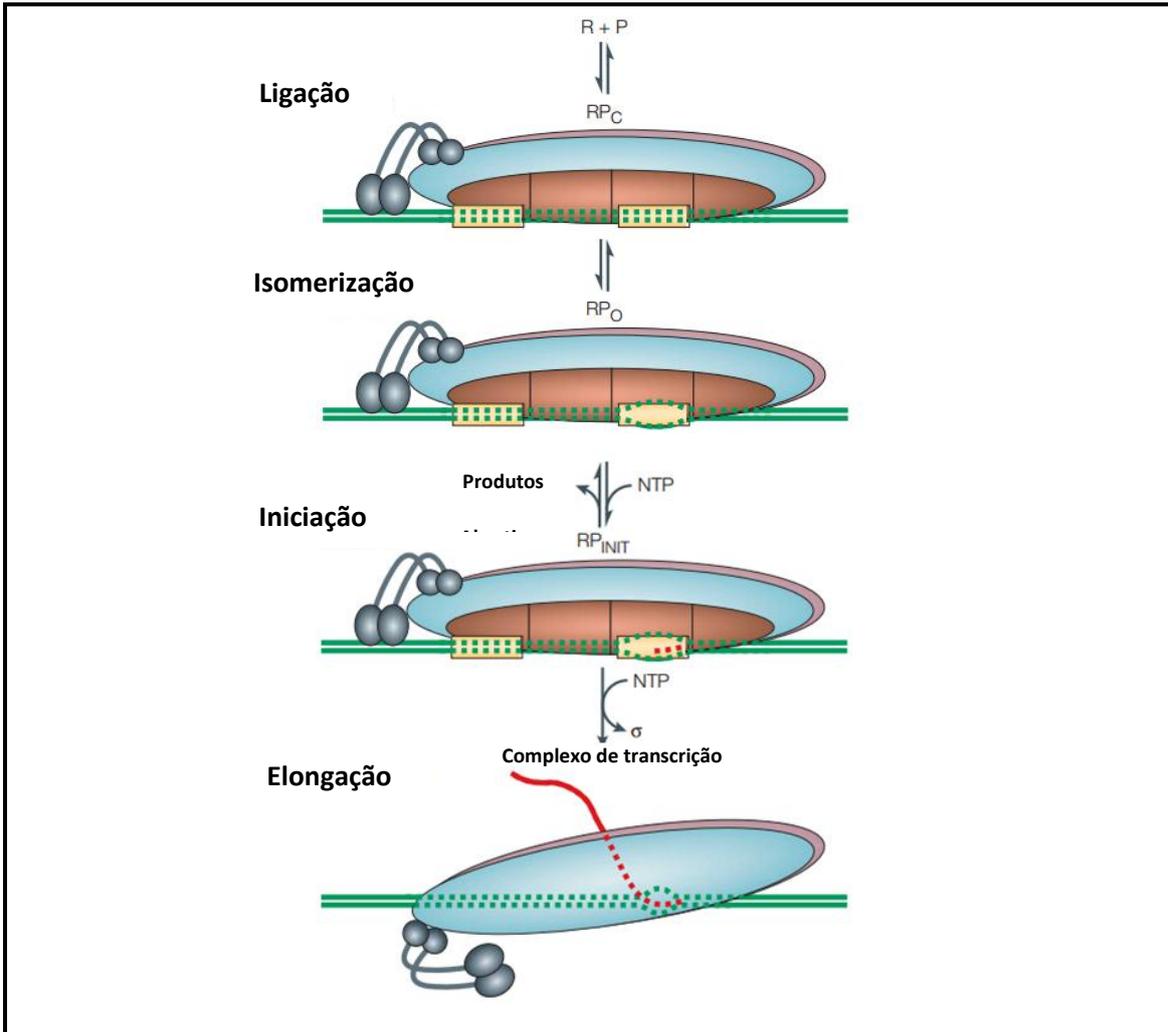


Figura 02 – O caminho da iniciação da transcrição em promotores bacterianos. A RNA polimerase (R) interage com o promotor (P) para a formação de um complexo fechado (RP_C). A linha pontilhada mostra a região do promotor que está ligada à RNA polimerase holoenzima. A dupla fita de DNA é separada ao redor do sítio inicial de transcrição, representado por uma bolha, para a formação do complexo aberto (RP_O). O complexo de iniciação é formado (RP_{init}) e a síntese da cadeia de RNA começa com a formação de uma ligação fosfodiéster entre o primeiro e o nucleotídeo adjacente. A elongação é o estágio final e o comprimento da cadeia de RNA aumenta, ilustrado pela linha vermelha. Adaptado de Browning e Busby (2004).

O ponto crucial, quando é considerada a regulação gênica bacteriana, é o entendimento de que a RNA polimerase na célula é fornecida de maneira limitada. Boa parte da RNA polimerase ativa é endereçada para a transcrição de genes que codificam RNA_(s) estáveis que são necessários para a tradução. De maneira similar, uma parte da RNA polimerase está ligada de maneira não produtiva ao DNA celular. Portanto, a quantidade de RNA polimerase livre que está disponível para transcrever os 4.000-5.000 genes é limitada (Ishihama, 2000).

Adicionalmente, o fornecimento dos fatores sigmas é limitado, e portanto, há uma intensa competição entre os diferentes promotores pela RNA polimerase holoenzima (Browning e Busby, 2004).

Cinco mecanismos moleculares distintos parecem garantir a distribuição prudente da RNA polimerase entre os promotores em competição. Estes envolvem sequências de DNA promotoras, fatores σ , ligantes de pequena massa molecular, fatores de transcrição e estrutura cromossomal bacteriana dobrada. Cada mecanismo permite variação no nível de expressão dos genes, conhecido como sintonia fina (Browning e Busby, 2004).

1.2.1 Sequências Promotoras

Nas células bacterianas, a RNA polimerase é deparada com um arranjo de aproximadamente 2.000 sequências promotoras, e a diferença entre essas sequências atua como um poderoso direcionador na distribuição desigual da RNA polimerase entre as diferentes unidades de transcrição. É sabido que domínios de DNA com sequências próximas à consenso funcionam mais eficientemente. A observação de que aproximadamente todos os promotores possuem sequências não consenso, revela que a atividade de cada promotor na célula é balanceada contra os outros promotores. Muitos promotores fortes bacterianos têm elementos UP efetivos, e estes parecem funcionar simplesmente pela ligação à RNA polimerase α CTD_(s) (Gourse *et al.*, 2000).

1.2.2 Ligantes de Pequena Massa Molecular

Ligantes de pequena massa molecular fornecem um mecanismo alternativo pela qual a RNA polimerase pode responder de maneira rápida e eficiente ao meio ambiente. O melhor exemplo é a guanosina tetrafosfato (ppGpp), a qual é sintetizada quando a disponibilidade de aminoácido é restringida para a extensão da tradução (Chatterji e Ojha, 2001).

A ppGpp atua na desestabilização dos complexos abertos dos promotores que controlam a síntese de maquinaria para tradução (Barker *et al.*, 2001). Na verdade, embora a interação da ppGpp com a RNA polimerase não é promotor específica, a inibição ppGpp dependente somente ocorre nos promotores que formam complexos abertos instáveis. Tais promotores, tipicamente possuem sequências pequenas ricas em GC perto da posição +1, e controlam muitos dos genes que codificam os produtos que são necessários para a tradução. Estes promotores também são incapazes de funcionar bem em baixas concentrações do nucleotídeo de iniciação, usualmente ATP (Gaal *et al.*, 1997).

Tem sido proposto que a ppGpp controla a expressão da maquinaria de tradução em resposta a uma escassez de nutrientes repentina, enquanto que a disponibilidade de ATP controla a expressão em resposta a taxa de crescimento (Schneider *et al.*, 2003).

Muitos destes promotores recrutam a RNA polimerase muito eficientemente e, potencialmente, podem iniciar a transcrição em taxas elevadas. Entretanto, para atingir estas taxas, o complexo aberto deve ser estabilizado e isto requer maior concentração de ATP e menor concentração de ppGpp (Browning e Busby, 2004).

1.2.3 Fatores de Transcrição

O genoma da *E. coli* contem mais de 300 genes que codificam proteínas que podem se ligar aos promotores para uma regulação positiva ou negativa da transcrição (Perez-Rueda e Collado-Vides, 2000). Até então, aproximadamente metade destas tiveram suas funções verificadas experimentalmente. A maioria destas proteínas liga-se especificamente ao DNA, e isso garante que suas ações sejam direcionadas para promotores específicos. Algumas destas proteínas controlam grande número de genes,

enquanto outras controlam apenas um ou dois genes. Estima-se que sete fatores de transcrição controlam (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL e Lrp) 50% de todos os genes reguláveis, enquanto que aproximadamente 60 fatores de transcrição controlam somente um único promotor (Martinez-Antonio e Collado-Vides, 2003).

Fatores de transcrição bacterianos podem ser agrupados em diferentes famílias, baseado na análise de suas sequências. Dezenas de famílias já foram identificadas, as melhores caracterizadas são os da família LacI, AraC, LysR, CRP e OmpR (Browning e Busby, 2004).

Fatores de transcrição acoplam a expressão dos genes aos sinais ambientais, e eles devem ser regulados tanto pelo controle de sua atividade ou pelo controle de sua expressão. Diferentes mecanismos são usados para tal fim. Primeiro: a afinidade dos fatores de transcrição para se ligar ao DNA pode ser modulada pelos ligantes de pequena massa molecular, a concentração destes flutua em resposta a disponibilidade de nutrientes ou ao estresse. Segundo: a atividade de alguns fatores de transcrição é modulada por modificações covalentes. Terceiro: a concentração de alguns fatores de transcrição na célula controla suas respectivas atividades. Quarto: o sequestro de fatores de transcrição por proteínas regulatórias, através de ligações (Browning e Busby, 2004).

Quando um fator de transcrição se liga ao promotor, este pode ativar ou reprimir o início da transcrição. Alguns fatores de transcrição funcionam somente como ativadores ou repressores, enquanto outros podem funcionar das duas formas, dependendo do promotor alvo (Perez-Rueda e Collado-Vides, 2000). Ativadores melhoram o desempenho de um promotor através do aumento da afinidade deste pela RNA polimerase, conforme exposto na figura 03. Repressores dificultam a aproximação da RNA polimerase ao sítio promotor, conforme figura 04.

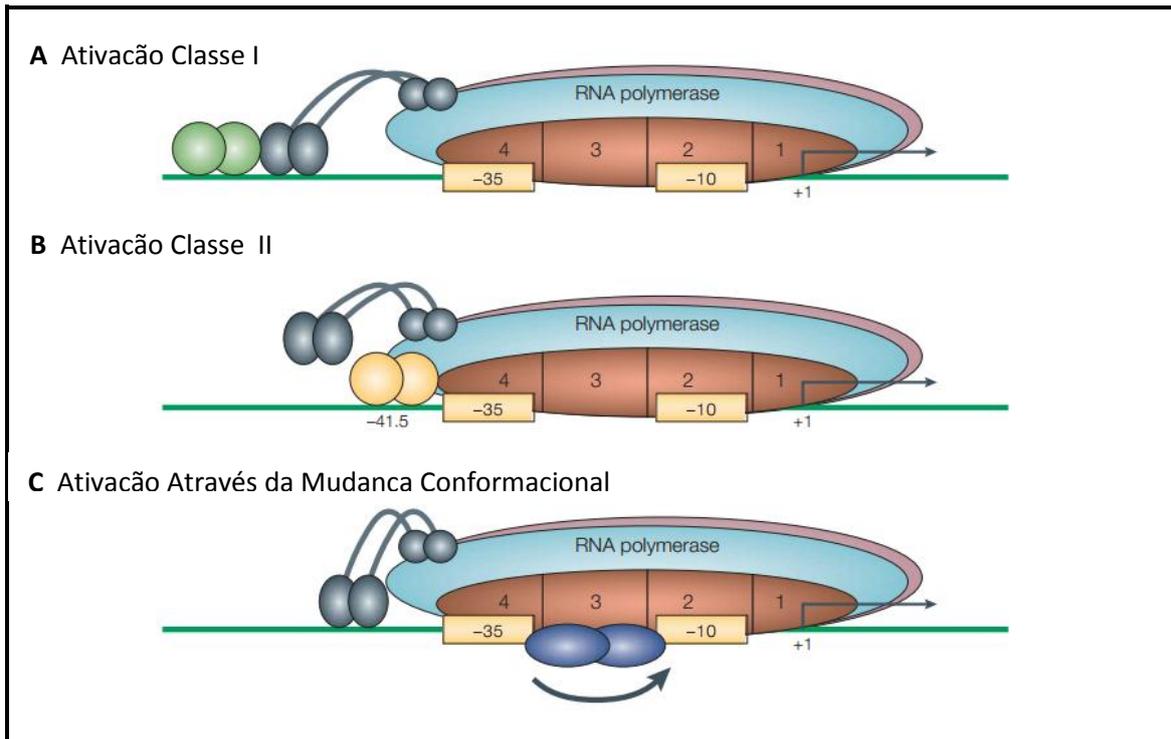


Figura 03 – A figura ilustra a organização da RNA polimerase e subunidades ativadoras durante o processo de ativação no promotor. Muitos ativadores funcionam como dímeros, aqui representados. **A** | Ativação classe I. O ativador é ligado a um sítio *upstream* e interage com α CTD da RNA polimerase, e desta forma recrutando a polimerase para o promotor. **B** | Ativação classe II. O ativador se liga a uma região alvo, adjacente à região -35 do promotor, e o ativador ligado interage com o domínio 4 do fator sigma 70. **C** | Ativação através da mudança conformacional. O ativador, ilustrado em azul, se liga na região espaçadora e realinha as regiões -10 e -35 para que a RNA polimerase possa se ligar ao promotor. Esta ativação ocorre nos casos em que o espaçamento entre as regiões -35 e -10 não é ótimo para a ligação da RNA polimerase. Adaptado de Browning e Busby (2004).

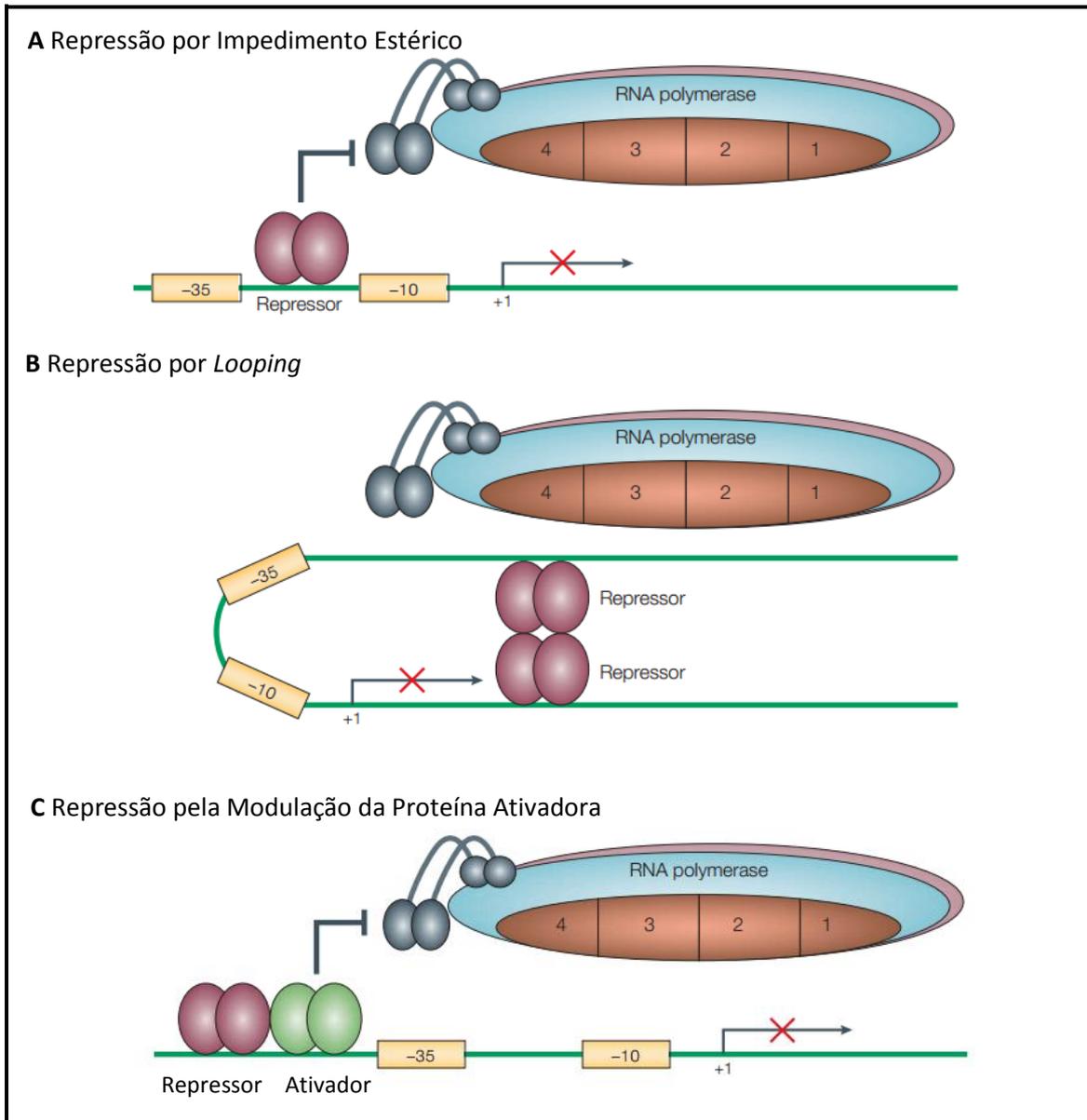


Figura 04 – Mecanismos de repressão. **A** | Repressão por impedimento estérico. O repressor se liga ao promotor e bloqueia o reconhecimento do promotor pela RNA polimerase holoenzima. **B** | Repressão por *looping*. Repressores se ligam à regiões distais e interagem entre si, formando um *looping* e impedindo a aproximação da RNA polimerase holoenzima. **C** | Repressão pela modulação da proteína ativadora. O repressor se liga ao ativador e bloqueia o seu reconhecimento pela RNA polimerase holoenzima. Adaptado de Browning e Busby (2004).

1.2.4 Regiões Cromossomais Superenoveladas

Cromossomos bacterianos são altamente compactados na forma de superenovelamento e interações com proteínas e RNA. Em *E. coli* diversas proteínas estão envolvidas nesta compactação, incluindo Fis (*factor for inversion stimulation*),

IHF (*integration host factor*), H-NS e HU (“*histone-like nucleoid-structuring proteins*”) (Azam e Ishihama, 1999).

Essas então denominadas proteínas nucleóides são abundantes na célula, embora a concentração de algumas, como a Fis, flutuem drasticamente dependendo das condições de crescimento. Embora a maioria dessas proteínas se ligue ao DNA de maneira não específica, algumas ligam com baixa especificidade e acabam ocupando sítios específicos que estão distribuídos por todo o cromossomo. A ligação dessas proteínas nucleóides ao DNA e a consequente dobra do cromossomo bacteriano deve afetar a distribuição da RNA polimerase entre os promotores (Browning e Busby, 2004).

1.3 Fatores Sigma

Fatores sigma são proteínas que regulam a transcrição em bactérias, e os mesmos podem ser ativados em diferentes condições ambientais.

A RNA polimerase holoenzima é formada por um núcleo de quatro subunidades principais ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) complexada com uma subunidade sigma σ (Mooney, Darst *et al.*, 2005). O componente sigma desempenha um papel crucial no reconhecimento do promotor e início da transcrição (Ishihama, 2000).

Os fatores sigmas bacterianos variam em tamanho em uma faixa aproximada de 20 a 70 kDa. Embora muitas bactérias contenham múltiplos fatores sigma, tipicamente um único fator é responsável pela maioria da transcrição na célula e, portanto, fundamental para sua sobrevivência. Este geralmente é denominado como primário ou fator sigma principal. Outros fatores sigmas que controlam funções especializadas são considerados fatores sigmas alternativos. No geral, cada fator sigma confere a RNA polimerase holoenzima seletividade distinta aos promotores (Helmann, 2001).

Em *E. coli*, a maioria dos promotores de genes *housekeeping* são reconhecidos por fatores σ^{70} , enquanto que promotores de *regulons* específicos como os de fase estacionária e resposta ao estresse são reconhecidos por fatores sigma alternativos (Gruber e Gross, 2003).

Os fatores sigma bacterianos possuem no mínimo quatro funções bioquímicas distintas. Primeira, eles são determinantes para o reconhecimento da sequência do promotor e interagem diretamente com este. Segunda, todos os fatores sigma devem reconhecer e se ligar ao complexo proteico da RNA polimerase para permitir a montagem da holoenzima. Terceira, fatores sigma permitem que a RNA polimerase se associe estreita e especificamente com a região do DNA fita simples, gerada durante o processo de separação das fitas e formação da bolha de transcrição. Quarta, fatores sigma fornecem um sítio de contato para algumas proteínas de ativação (Helmann, 2001).

Baseado nos critérios funcionais e estruturais, os diferentes fatores sigmas encontrados em bactéria podem ser agrupados em duas famílias distintas: σ^{70} e σ^{54} (Buck *et al.*, 2000). A família σ^{54} não compartilha nenhuma homologia de sequência com a família σ^{70} , e também utiliza um processo distinto na formação do complexo de transcrição. Enquanto a holoenzima $E\sigma^{70}$ conduz este processo por si só, a holoenzima $E\sigma^{54}$ requer ATP e um *enhancer* para auxiliá-la (Gruber e Gross, 2003).

A *Escherichia coli* possui seis fatores sigmas pertencentes à família σ^{70} , sendo eles: σ^{70} (σ^D , RpoD), σ^{32} (σ^H , RpoH), σ^{24} (σ^E , RpoE), σ^{28} (σ^F , FliA), σ^{fecI} (FecI) e σ^{38} (σ^S , RpoS), cada qual transcrevendo um grupo específico de genes (Gruber e Gross, 2003), conforme tabela 01.

Tabela 01 – Fatores sigma em *Escherichia coli*, adaptado de Helmann (2001).

Organismo	Fator Sigma	Gene	Função
<i>E. coli</i>	σ^{24} (σ^E)	RpoE	<i>Heat Shock</i> extremo, estresse periplásmico
	σ^{28} (σ^F)	FliA	Mobilidade flagelar
	σ^{32} (σ^H)	RpoH	<i>Heat Shock</i>
	σ^{38} (σ^S)	RpoS	Adaptações à fase estacionária
	σ^{54} (σ^N)	RpoN	Genes regulados por nitrogênio
	σ^{70} (σ^D)	RpoD	Genes <i>Housekeeping</i>
	σ^{fecI}	FecI	Captação de citrato férrico.

1.3.1 Fator sigma 38 / (S) (σ^{38} / σ^S) ou RpoS

Sigma 38 (σ^{38} / σ^S) ou RpoS é uma subunidade sigma da RNA polimerase em *E. coli*, codificada a partir do gene RpoS na fase estacionária tardia. É o regulador primário dos genes de fase estacionária. Esta proteína é induzida e pode substituir parcialmente o fator sigma 70 (σ^{70}) em diferentes condições de estresse. Em função de seu papel crucial na fase estacionária de crescimento bacteriano ou sob condições de estresse, também é conhecido como fator sigma(S) (Hengge-Aronis, 2002).

O fator sigma (S) é visto como um regulador mestre de resposta ao estresse geral, o qual é disparado por diferentes sinais indutores e frequentemente acompanhado por uma redução ou até mesmo uma suspensão no crescimento bacteriano. Isto permite às células a habilidade de sobreviver ao presente estresse, assim como outros ainda não deparados. Isto está em evidente contraste com a resposta ao estresse específico, o qual é disparado por um único sinal o que resulta na indução de proteínas, as quais permitem que as células resistam à tal situação, somente. Enquanto que esta resposta específica tende a eliminar o agente causador e/ou mediar o reparo ao dano celular ocorrido, a resposta ao estresse geral confere as células ampla resistência, de uma maneira tal que o dano é evitado, ao invés da necessidade de ser reparado (Hengge-Aronis, 2002).

1.3.2 Regulação da Expressão do fator sigma (S)

O fator sigma (S) controla positivamente aproximadamente 500 genes, isto é, aproximadamente 10% dos genes presentes no genoma da *E. coli* (Weber *et al.*, 2005). Quando as células de *E. coli* crescem rapidamente em meio complexo, o fator σ^S é expresso em uma taxa basal, porém é dificilmente detectado devido a eficiência da degradação proteolítica. Entretanto, quando as células entram na fase pós exponencial e finalmente na fase estacionária, reduzem sucessivamente a taxa de crescimento devido ao aumento da limitação de nutriente. Neste momento, o fator σ^S acumula continuamente e compete com o fator vegetativo σ^{70} e outros fatores sigma pelo núcleo da enzima RNA polimerase, para reprogramar o padrão global de expressão gênica (Hengge, 2009).

O acúmulo do fator σ^S e a indução dos genes σ^S dependentes é baseado em um complexo mecanismo regulatório que opera em diferentes níveis: (i) ativação da

transcrição do gene RpoS, o qual requer a alarmona de estresse geral ppGpp, (ii) ativação da tradução RpoS, o qual envolve o rearranjo estrutural do mRNA do gene RpoS, a RNA-chaperona Hfq e diversos outros sRNA_(s) reguladores; (iii) redução da proteólise do fator σ^S e (iv) diversos outros fatores que auxiliam a formação σ^S -RNA polimerase holoenzima ($E\sigma^S$) como o fator anti- σ^S Rsd e ppGpp. Este enorme complexo, assim como uma resposta regulatória em sintonia fina tem consequências fisiológicas importantes, incluindo resistência a estresse múltiplos, uma mudança para o metabolismo de manutenção, morfologia alterada e indução de funções que permitem adesão e formação de biofilme (Hengge, 2009).

1.3.3 Estrutura Domínio dos Fatores Sigma

Membros da família σ^{70} geralmente possuem quatro regiões definidas de sequência de aminoácidos altamente conservada, separada por regiões menos conservadas, conforme ilustrado na figura 05 (Helmann, 2001).

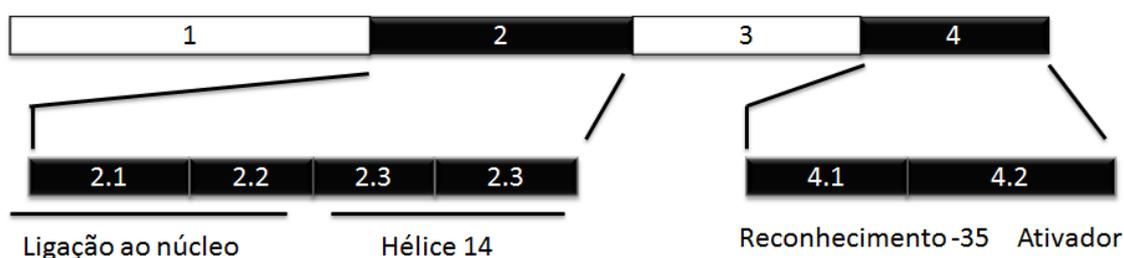


Figura 05 – Mapa genérico de estrutura/função para membros da família sigma 70. A sequência proteica é representada por uma barra, da região amino terminal (esquerda) para a carboxi terminal (direita). A sequência de aminoácido é dividida em quatro regiões conservadas. Aminoácidos importantes para o reconhecimento da região -10 e abertura das fitas do promotor estão em uma alfa-hélice (hélice 14), adaptado de Helmann (2001).

A região amino terminal (região 1) atua como um regulador alostérico da função do fator sigma. Quando o fator sigma está livre em solução, a região 1 parece mascarar os domínios de ligação ao DNA e desta forma previne à associação do fator sigma ao DNA. Quando o fator sigma se liga ao núcleo da enzima RNA polimerase, a região 1 muda de conformação de maneira que as superfícies de interação com o DNA ficam expostas. A região 1 pode também ter um papel nas mudanças conformacionais

subsequentes, durante o processo de início da transcrição. A região 1 não é essencial para a função dos membros da família sigma 70 e, na verdade, não está presente na maioria dos fatores sigma alternativos (Helmann, 2001).

Os dois domínios mais conservados dos membros da família sigma 70 correspondem à região conservada central 2 e a região carboxi terminal 4. Esses domínios são separados pela região 3, a qual é menos conservada e algumas vezes ausente. A região 2, por conveniência foi dividida em 4 sub-regiões, é responsável pelo reconhecimento e separação das fitas da região -10, além de possuir determinantes chaves para ligação do fator sigma ao núcleo da RNA polimerase. A região 4 reconhece a região -35 do promotor e é posicionada próximo a este, com uma superfície disponível para interação com proteínas ativadoras da transcrição (Helmann, 2001).

1.4 Expressão de Proteínas Recombinantes

A expressão de proteínas recombinantes tem revolucionado todos os aspectos das ciências biológicas. Mais significativamente, tem expandido drasticamente o número de proteínas que podem ser investigadas tanto bioquimicamente e estruturalmente. Antigamente, a produção de proteínas era domínio de especialistas, por exemplo, a purificação de fontes naturais (plantas, coelhos, bovinos) era geralmente difícil e demorada. Entretanto, a disponibilidade de novos sistemas comerciais para expressão de proteínas recombinantes, combinado com o avanço de técnicas de purificação proteica tem tornado a produção de proteínas recombinantes predominante nas ciências biomédicas e biológicas (Francis e Page, 2010).

Notavelmente, 31 proteínas recombinantes foram aprovadas nos Estados Unidos e União Europeia para uso terapêutico entre 2003 e 2006, destacando a importância da expressão heteróloga de proteínas na pesquisa biofarmacêutica (Walsh, 2006).

À medida que o número de proteínas recombinantes produzidas aumenta, também aumenta a avaliação das dificuldades e limitações inerentes ao processo. Apesar do desenvolvimento de múltiplos sistemas de expressão recombinantes não bacterianos nas últimas três décadas (levedura, baculovírus, células mamíferas, entre outros), a *E. coli* ainda é a hospedeira preferida para expressão de proteínas

recombinantes (Yin *et al.*, 2007). O racional é claro: a *E. coli* é fácil de manipular geneticamente, o seu cultivo é de baixo custo e a expressão é rápida. Além disso, possui benefícios significativos sobre outros sistemas de expressão, incluindo custo, facilidade de uso e escalonamento (Francis e Page, 2010).

Por outro lado, existem também algumas desvantagens no uso da *E. coli* como uma hospedeira para expressão. Em contraste aos sistemas eucarióticos, a transcrição e a tradução são rápidas e estreitamente acopladas. Proteínas eucarióticas necessitam, geralmente, de tempo longo e/ou a assistência de chaperonas para auxiliar no enovelamento de seu estado nativo. Esta expressão rápida e em grande quantidade frequentemente leva a um enovelamento parcial, não enovelamento, enovelamento incorreto e proteínas insolúveis (Oberg *et al.*, 1994).

Além disso, a insolubilidade não está restrita as proteínas heterólogas, pois muitas proteínas bacterianas também não podem ser produzidas na forma solúvel quando superexpressas em *E. coli* (Vincentelli *et al.*, 2003). Também, o ambiente redutor no citoplasma bacteriano faz com que a produção eficiente de pontes dissulfeto em proteínas seja um desafio (Bessette *et al.*, 1999). Finalmente, a *E. coli* não possui a maquinaria requerida para efetuar modificações pós-traducionais, a exemplo da glicosilação, que pode ser crítica para a formação da proteína ativa e devidamente enovelada (Zhang *et al.*, 2004).

1.5 Vetores Plasmidiais de Expressão

Plasmídeos são moléculas circulares de DNA, relativamente pequenas quando comparadas ao cromossomo da célula hospedeira. Plasmídeos são elementos genéticos extracromossomais, que no geral não são essenciais para a sobrevivência da bactéria, entretanto, conferem vantagens peculiares (como resistência a antibióticos) para o organismo. Para engenharia genética, plasmídeos de ocorrência natural têm sido modificados extensivamente para produção de vetores com as características desejadas. Na nomenclatura de plasmídeos, o “p” é utilizado para designar plasmídeo, o qual é usualmente seguido pelas iniciais dos pesquisadores ou instituições de pesquisas que isolaram ou construíram o plasmídeo. Ademais, números podem ser adicionados à nomenclatura para classificar plasmídeos de uma mesma família (Nicholl, 2008).

Um plasmídeo importante na história da manipulação genética é o pBR322, ilustrado na figura 06, o qual foi desenvolvido por Francisco Bolivar e seus colegas, BR refere-se aos pesquisadores “Bolivar” e “Rodriguez”. A construção do pBR322 envolveu diversas manipulações, a partir de um plasmídeo natural de resistência a drogas denominado ColE1, para obter os diversos elementos chaves de DNA juntos (Nicholl, 2008).

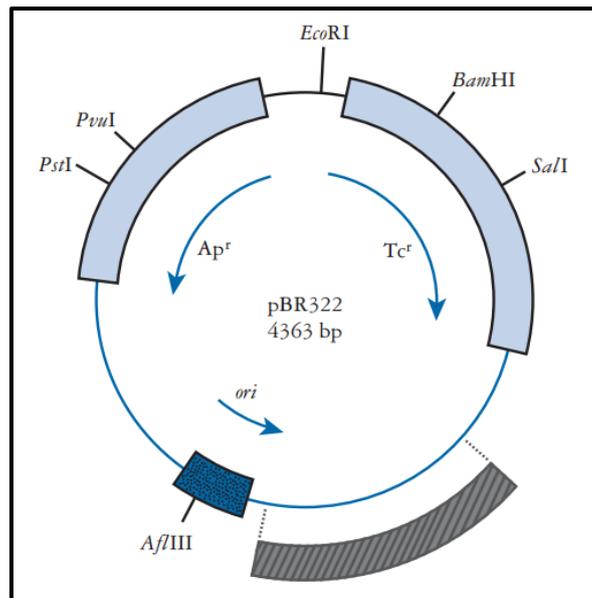


Figura 06 – Mapa plasmidial do pBR322. Regiões importantes destacadas são os genes de resistência para ampicilina e tetraciclina (Ap^r) e (Tc^r) e a origem de replicação (ori).

Um vetor de expressão deve conter todas as sequências de DNA específicas que irão direcionar a transcrição e tradução do gene alvo (Studier e Moffatt, 1986). Estes elementos incluem origens de replicação, promotores, sequências reguladoras, Shine-Dalgarno (RBS), *polylinkers*, terminadores de transcrição, gene repórter, entre outros.

1.5.1 Origem de Replicação

A origem de replicação de um vetor é o sítio onde a replicação é iniciada. Também determina o número de cópias de um vetor na hospedeira. O número de cópias para vetores plasmidiais comuns em *E. coli* varia de baixo (2 a 20) a alto (20 a 40). Tipicamente, plasmídeos com alto número de cópias são desejáveis para expressão

proteica em *E. coli*, pois resultam em um máximo rendimento proteico para um determinado volume de cultura (Huang *et al.*, 1994).

1.5.2 Promotores

Promotores são elementos de um vetor que podem ter um profundo efeito na força e duração da transcrição, e conseqüentemente, no rendimento proteico. A síntese de mRNA inicia quando a RNA polimerase se liga a sequência promotora, adjacente ao gene alvo. Um promotor efetivo para expressão heteróloga de proteínas em *E. coli* possui três características fundamentais. Primeiro, deve ser forte, resultando numa expressão robusta do gene alvo (tipicamente 10% a 50% do total de proteínas celular). Segundo, deve apresentar baixa atividade de transcrição basal para prevenir transcrição indesejada antes da indução. Terceiro, a indução deve ser simples e barata (Francis e Page, 2010).

Na seleção de um sistema promotor, a natureza da proteína alvo deve ser considerada. Se a proteína alvo for tóxica, como por exemplo, uma ribonuclease, deve se considerar o uso de um sistema promotor com baixíssima expressão basal, como o promotor araBAD (Lee *et al.*, 1987). Alternativamente, para um máximo rendimento proteico, um promotor forte deve ser selecionado, como o T7 ou *tac*. Finalmente, para proteínas propensas a formar agregados, um promotor *cold-shock*, na qual a expressão é conduzida em baixas temperaturas, deve ser testado. Os quatro promotores mais amplamente utilizados são: promotor T7, promotor araBAD, promotores híbridos e promotor *cspA* (Francis e Page, 2010).

1.5.2.1 Promotor T7

O promotor do bacteriófago T7 é atualmente o promotor mais comum utilizado em *E. coli*. A expressão gênica é direcionada pela T7 RNA polimerase (do bacteriófago T7), a qual transcreve cinco vezes mais rápido que a RNA polimerase bacteriana (Studier *et al.*, 1990). A *E. coli* não possui esta enzima, a polimerase deve ser disponibilizada à célula via um plasmídeo induzível, ou mais frequentemente, utilizando uma linhagem de *E. coli* que contenha cópia cromossomal do gene da T7 RNA

polimerase, introduzida via um fago Lambda lisogênico – DE3 (Studier e Moffatt, 1986).

Na ausência de um indutor, a T7 RNA polimerase, está sob controle do promotor *lacUV5*, e portanto, o gene de interesse não será transcrito (Studier *et al.*, 1990). Após adição do análogo não hidrolisável da lactose, IPTG (isopropiltio- β -galactosídeo), a T7 RNA polimerase é transcrita e sintetizada. A T7 RNA polimerase inicia então a transcrição do gene alvo pela ligação específica ao promotor específico (Francis e Page, 2010).

1.5.2.2 Promotor *araBAD*

O promotor arabinose é um promotor forte, que diferentemente do promotor T7, praticamente não possui atividade de transcrição basal. Portanto, é vantajoso para a expressão de proteínas altamente tóxicas. O agente indutor para este promotor é a L-arabinose (Lee *et al.*, 1987). Na ausência da L-arabinose, a transcrição é excepcionalmente baixa, e se necessário, pode ser ainda mais suprimida pela adição de glicose (Miyada *et al.*, 1984).

O nível de expressão proteica aumenta linearmente com o aumento da concentração de L-arabinose. Isto permite controlar a nível de expressão sobre uma vasta gama de concentração do indutor, o que pode ser importante na tentativa de maximizar o rendimento da expressão (alta concentração de L-arabinose) ou aumentar o rendimento de proteína solúvel (baixa concentração de L-arabinose). É importante lembrar que embora este sistema possa eficientemente reprimir a expressão gênica, o nível de repressão nunca é zero e a eficiência de repressão é gene dependente (Guzman *et al.*, 1995).

Finalmente, estudos que compararam diretamente o rendimento proteico entre os promotores *araBAD* e T7, mostraram que promotores T7 geralmente apresentam um desempenho superior (Goulding e Perry, 2003).

1.5.2.3 Promotores híbridos (promotores *trc* e *tac*)

Os promotores *trc* e *tac* são híbridos de promotores de ocorrência natural, consistindo da região -35 do promotor *trp* e a região -10 do promotor *lacUV5* (De Boer *et al.*, 1983) (Amann *et al.*, 1983). A única diferença entre esses dois sistemas é o espaçamento entre as sequências consenso -35 e -10, com separação de 16pb e 17pb de separação nos promotores *tac* e *trc*, respectivamente (Brosius *et al.*, 1985).

A expressão é induzida com IPTG. *Trc* e *tac* são considerados promotores fortes, o promotor *trc* possui aproximadamente 90% da atividade do promotor *tac*. Ambos expressam de 15% a 30% do total proteico celular. Em função de sua expressão basal, podem ser problemáticos para expressão de proteínas que são tóxicas para a célula (Brosius *et al.*, 1985).

1.5.2.4 Promotor *cspA*

Quando ocorre um decréscimo na temperatura de crescimento, de 37°C para 10°C, a maquinaria celular bacteriana é amplamente dedicada para a produção de 13 proteínas *cold shock* (Jones *et al.*, 1987).

Após 90 minutos, a principal proteína *cold-shock*, CspA, representa 13% do total de proteína celular (Goldstein *et al.*, 1990). Em função disso, o promotor *cspA* tem sido usado para a expressão de proteínas em baixas temperaturas. Para este sistema, a indução ocorre simplesmente pela mudança de temperatura da cultura bacteriana de 37°C para uma faixa entre 10°C e 25°C (Vasina e Baneyx, 1996).

Ademais, por causa da expressão ser conduzida em baixas temperaturas, o sistema possui o benefício adicional de promover a expressão solúvel de proteínas predispostas a formar agregados (Vasina e Baneyx, 1996).

Uma desvantagem é que o promotor *cold shock* não é completamente reprimido em temperaturas superiores a de indução, o que pode resultar em uma expressão basal da proteína alvo (Qing *et al.*, 2004). Finalmente, os níveis de expressão usando o promotor *cspA* são tipicamente menores do que os vistos no promotor T7 (Francis e Page, 2010).

1.5.3 Sequência Shine-Dalgarno

A sequência Shine-Dalgarno (RBS – “Ribosome Binding Site”) é a região onde o ribossomo se liga ao mRNA para iniciar a tradução. O mRNA bacteriano não possui o “cap” 5’ para sinalizar o ribossomo onde se encontra o códon de início da tradução, ao invés disto, cada mRNA bacteriano possui um sítio de ligação específico para o Ribossomo (RBS), também denominado de sequência Shine-Dalgarno, que está localizado alguns nucleotídeos *upstream* ao códon de início de tradução, AUG. Esta sequência nucleotídica estabelece um pareamento de bases com a subunidade ribossomal menor, 16S rRNA, para posicionar o códon de início (AUG) no ribossomo. Uma série de fatores de iniciação da tradução orquestra esta interação, assim como a subsequente montagem da subunidade ribossomal maior, para completar o ribossomo (Alberts *et al.*, 2002).

1.5.4 Sítio Múltiplo de Clonagem (“Polylinker”)

Vetores plasmidiais podem ser construídos com um *polylinker*, ou seja, uma sequência sintética de sítio múltiplo de clonagem que contém uma cópia de diversos sítios de restrição, conforme ilustrado na figura 07. Quando um vetor é tratado com uma determinada enzima de restrição que identifica a sequência de reconhecimento no *polylinker*, ocorre o corte, podendo gerar extremidades abruptas ou coesivas. Na presença de DNA ligase, os fragmentos de DNA produzidos com a mesma enzima de restrição poderão ser inseridos no plasmídeo (Lodish *et al.*, 2000).

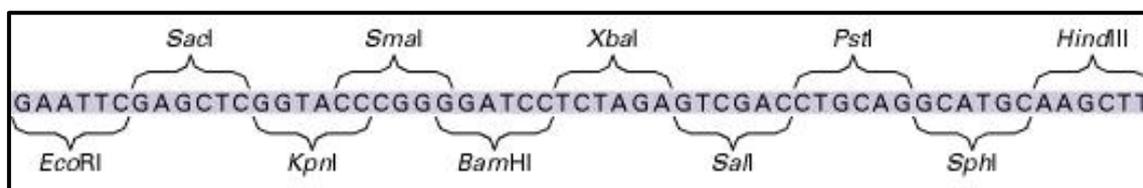


Figura 07 – Sequência de um *polylinker*. São comumente utilizados para construir plasmídeos recombinantes, os quais carregam fragmentos de DNA exógenos. Adaptado de Lodish *et al.* (2000).

1.5.5 Terminador de Transcrição

A transcrição em *E. coli* é terminada através de dois mecanismos distintos. Um depende da proteína hexamérica helicase denominada rho, a qual se liga ao mRNA nascente no complexo de transcrição, causando a interrupção através da ruptura do complexo formado. O outro mecanismo é denominado de terminação intrínseca, a qual ocorre em sítios específicos e que dependem somente dos sinais codificados na fita de DNA molde, conforme figura 08. Terminadores intrínsecos codificam para uma estrutura em forma de grampo, estável, seguido de uma sequência de resíduos de uridina na extremidade 3' do RNA formado. A estrutura em grampo tem um papel central na liberação do mRNA transcrito da RNA polimerase nas regiões de terminação intrínseca da fita de DNA molde (Wilson e Von Hippel, 1995).

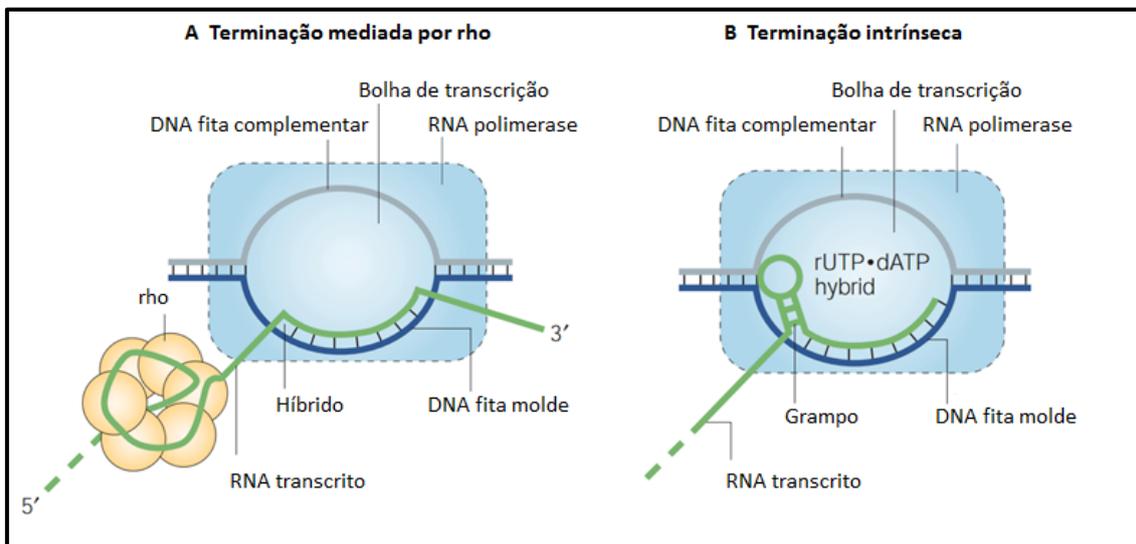


Figura 08 – A – Terminação da transcrição mediada pela proteína rho. Esta proteína se liga ao mRNA nascente até o ponto de destabilização do complexo de transcrição B - Estrutura em grampo do mecanismo de terminação intrínseca da transcrição, seguido de uma sequência de resíduos de rUTP que formam uma ligação fraca com os resíduos dATP_(S) no híbrido RNA-DNA. Esta interação provoca uma parada no complexo de transcrição, enquanto ocorre a formação do grampo. Adaptado de Greive e Von Hippel (2005).

1.5.6 Gene Repórter

O termo gene repórter é usado para definir um gene com um fenótipo facilmente mensurável. Genes repórteres codificam proteínas que possuam atividade enzimática única ou que possam ser facilmente distinguidas de uma mistura de proteínas intra ou extracelulares (Alam e Cook, 1990). Geralmente, os genes repórteres

são selecionados em função de sua sensibilidade, ampla faixa de atuação, conveniência e confiabilidade no ensaio (Wood, 1995).

1.5.6.1 Proteína Verde Fluorescente (Green Fluorescent Protein – GFP)

A proteína verde fluorescente, também denominada de GFP, foi descoberta por Shimomura et al (Shimomura *et al.*, 1962). Esta proteína foi inicialmente isolada da água viva *Aequorea victoria*.

A GFP é uma proteína autofluorescente, e, portanto, não requer a presença de nenhum cofator ou substrato para a emissão de luz verde quando excitada (Naylor, 1999). É composta de 238 resíduos de aminoácidos, possui o formato de um barril, e o fluoróforo é formado pelos resíduos 65, 66 e 67, a saber Ser-Tyr-Gly, na proteína nativa, resultando na formação do p-hidroxibenzilidenoimidazolinona (Tsien, 1998), conforme figura 09.

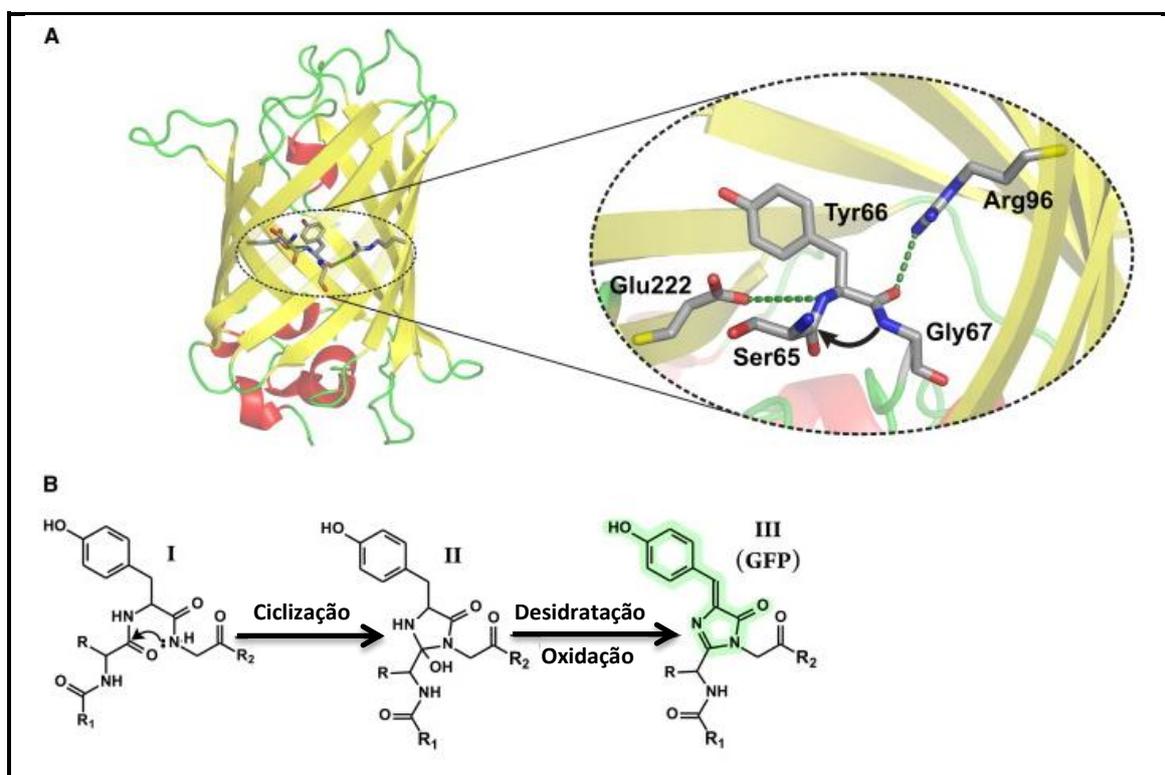


Figura 09 – Reações pós-traducionais e estrutura representativa do fluoróforo da GFP. A | Estrutura em barril beta da GFP, ilustrando a posição do fluoróforo na proteína e o estado de pré-ciclização. B | Biossíntese do fluoróforo, a conjugação do elétron π está representada pelo sombreado verde. Adaptado de Pakhomov e Martynov (2008).

Tem a forma de um barril beta, com onze fitas, e uma estrutura em alfa hélice que passa no meio do cilindro, conforme figura 10. O fluoróforo está ligado na alfa hélice e alocado quase que perfeitamente no centro do cilindro, também denominado de “ β -can” (Tsien, 1998). Ademais, a formação do fluoróforo na proteína verde fluorescente depende do correto enovelamento proteico (Waldo *et al.*, 1999).

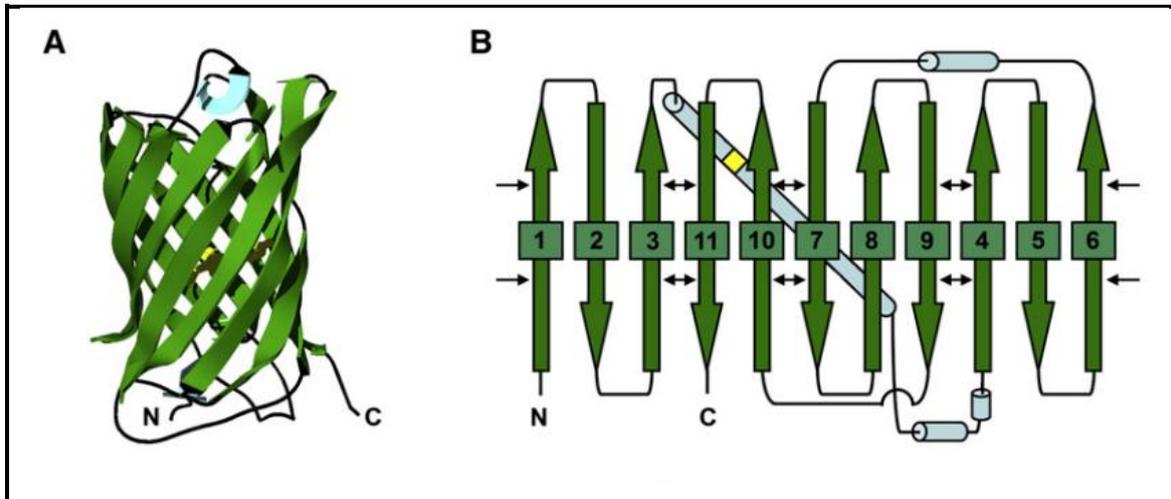


Figura 10 – **A** | Estrutura em barril beta da GFP. **B** | Topologia da GFP. As folhas betas estão ilustradas pelas setas verdes; as alfa hélices são indicadas pelos cilindros azuis; a localização do fluoróforo é ilustrada pelo quadrado amarelo, na alfa hélice de maior comprimento; as setas pretas destacam os contatos entre as folhas betas não contínuas na estrutura nativa. Adaptado de Ugrinov e Clark (2010).

O gene da GFP foi clonado em 1991, e diversos GFP_(s) mutantes estão disponíveis, os quais exibem propriedades de fluorescência melhoradas em relação à GFP selvagem. Ademais, a GFP tem sido usada na mensuração da expressão gênica, marcação de células e estudos de localização de proteínas marcadas (Welsh e Kay, 1997).

A GFP possui dois picos de excitação, um em 395 nm (pico maior) e o outro em 475 nm, e um pico de emissão em 509 nm com um pequeno ombro em 540 nm, conforme figura 11 (Cubitt *et al.*, 1995).

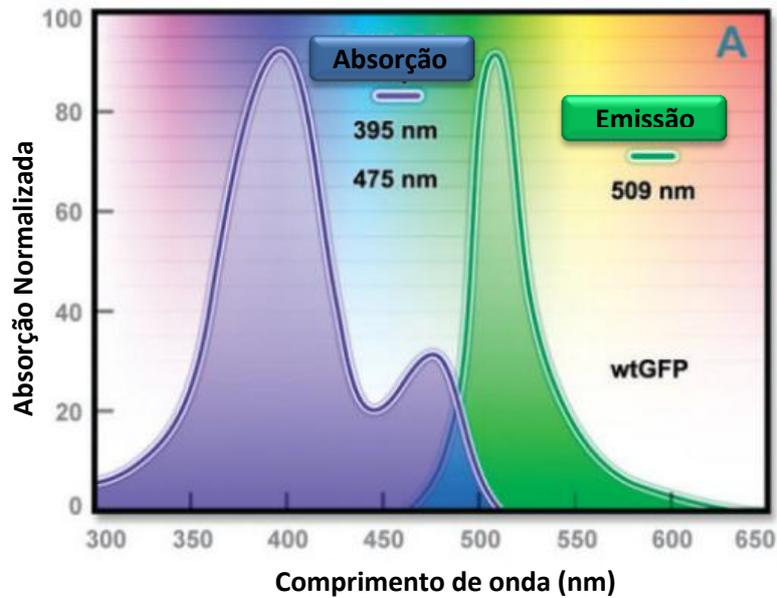


Figura 11 – Perfis espectrais de absorção e emissão da GFP *wild type*. Adaptado de Day e Davidson (2009).

As variantes da GFP podem ser divididas em sete classes, baseado no componente distintivo de seus fluoróforos: classe 1, mistura de fenol neutro e fenolato aniônico; classe 2, ânion fenolato; classe 3, fenol neutro; classe 4, ânion fenolato com sistema de empilhamento dos elétrons π ; classe 5, indol; classe 6, imidazol; classe 7, fenil. Classes 1 a 4 são derivações com uma Tyr na posição 66, enquanto que as classes 5 a 7 possuem respectivamente Trp, His e Phe nesta mesma posição (Tsien, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Os principais promotores usados em larga escala para produção de proteínas recombinantes utilizam indução térmica ou indutores químicos como o IPTG (Loewen, Hu *et al.*, 1998). A utilização do IPTG para produção em larga escala não é desejável, por causa do seu custo e toxicidade (Figge *et al.*, 1988)

A desvantagem dos promotores termosensíveis é que a indução termal pode induzir também a produção de proteínas *heat-shock*, incluindo certas proteases que podem acentuar a degradação proteica. Por essa razão, promotores induzidos por condições metabólicas, como por exemplo: pH, osmolaridade, nível de oxigênio e fase estacionária de crescimento são desejáveis (Miksch *et al.*, 2005).

Promotores baseados em reguladores metabólicos de fase estacionária representam uma classe de promotores controlados metabolicamente e que podem ser explorados para o design de vetores de expressão.

A produção de proteínas heterólogas em fase estacionária de crescimento bacteriano poderia aumentar o nível de expressão das proteínas com as estruturas tridimensionais corretas e solúveis, uma vez que se respeitaria a temperatura fisiológica bacteriana, porém a síntese proteica ocorreria num momento onde haveria nas células um maior nível de chaperonas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Desenvolver vetores de expressão que possuam promotores que sejam regulados pelo fator sigma S, com o objetivo de avaliar o perfil de expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos Específicos

- Prospecção na literatura de sequências nucleotídicas de promotores com afinidade pelo fator sigma S.
- Design e síntese química de cassetes de expressão, contendo promotores com afinidade pelo fator sigma S.
- Design e síntese química de um polylinker.
- Design e síntese do gene da proteína verde fluorescente (GFP) para ser utilizada com um gene repórter.
- Modificações no vetor pUN para a construção de um novo vetor.
- Avaliação do perfil de expressão e solubilidade da GFP nos vetores construídos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens de *E. coli*

Todas as linhagens celulares empregadas nesta pesquisa, relacionadas na tabela 02, foram estocadas a -80° C em meio LB, contendo 25% de glicerol.

Tabela 02 - Linhagens e genótipos de *E. coli* utilizados no presente estudo.

Bactéria	Linhagem	Genótipo	Utilização
<i>E. coli</i>	DH5 α F'IQ	EndA1, recA1, hsdR17, SupE44, gyrA96, thi-1, relA1, AlacU169	Clonagem Expressão
<i>E. coli</i>	B121 (DE3)pLysS	F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB mB-) λ (DE3) pLysS (cmR)	Clonagem Expressão

4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram de grau analítico e compatível com o trabalho de biologia molecular. A água utilizada foi tratada por osmose reversa.

Quando necessário as soluções foram esterilizadas a 120°C por 15 minutos.

4.3 Meios de cultura

A linhagem de *E. coli* foi cultivada em meio Luria Bertani (LB) líquido e/ou sólido. As composições destes meios estão descritas na tabela 03.

Tabela 03 - Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.

Meio	Composição
LB (Luria Bertani) líquido	Triptona 10g\L
	Extrato de levedura 05g\L
	NaCl 5g\L

	Triptona	10g\L
LB (Luria Bertani) sólido	Extrato de levedura	05g\L
	NaCl	5g\L
	Ágar	15g\L

4.4 Marcadores moleculares

O marcador para peso molecular de DNA utilizado neste estudo foi o 1kb Gene Ruler™ da Fermentas. Para o peso molecular de proteína foi utilizado o Page Ruler™ Fermentas.

4.5 Plasmídeos

4.5.1 Plasmídeo pUN

O vetor pUN foi construído pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de DNA/CAM/UFAM, o qual é oriundo do vetor pUC18. Para a construção deste vetor foram utilizados dois *primers*, os quais foram desenhados para se ligarem as regiões adjacentes ao sítio múltiplo de clonagem (MCS) e ao lacZ, em sentidos opostos, conforme figura 12. Desta forma, a PCR amplificaria a maior parte do plasmídeo com exceção das regiões lacZ e MCS.

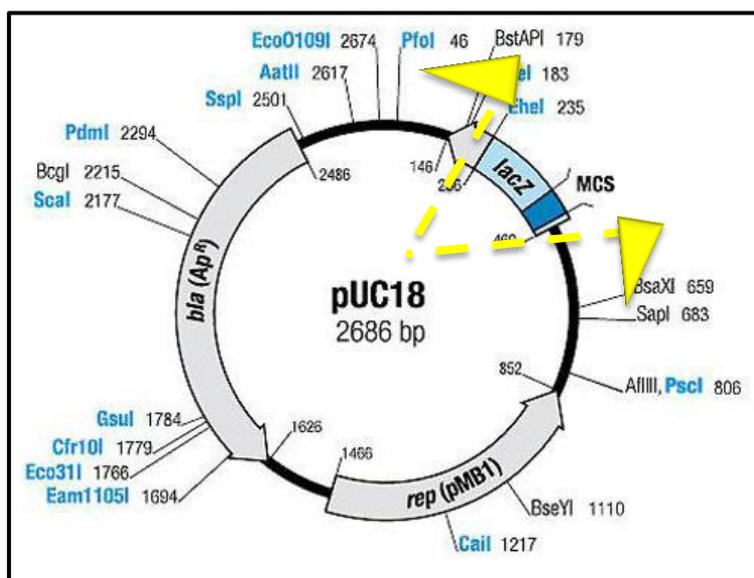


Figura 12 - Representação esquemática do mapa físico do vetor pUC18. As linhas tracejadas em amarelo indicam a posição aproximada dos primers utilizados para a construção do pUN.

Cada *primer* continha um sítio de *NotI* em sua sequência, portanto, após a reação em cadeia da polimerase, o amplicon formado possuía um sítio de *NotI* em cada extremidade. O amplicon foi tratado com *NotI* e posteriormente incubado com T4 DNA ligase para a formação do plasmídeo pUN, conforme figura 13.

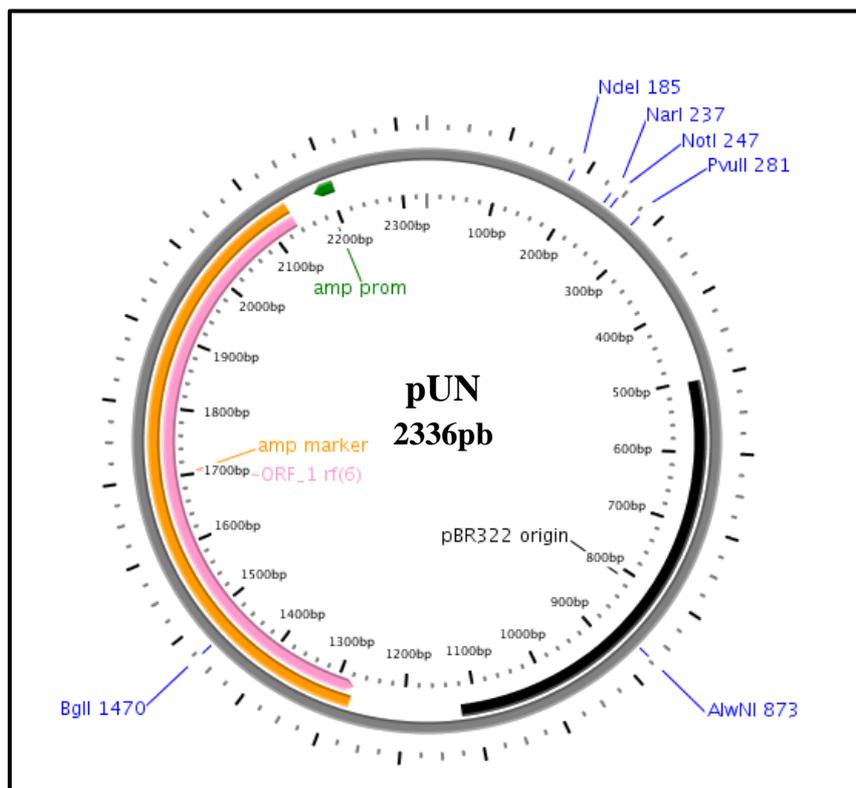


Figura 13 - Representação esquemática do mapa físico do vetor pUN. Destaque para a origem de replicação, gene de resistência à insulina, sítios de restrição *NdeI* e *NotI* (dados não publicados).

4.5.2 Plasmídeo pGS-21a

O plasmídeo pGS-21a é um plasmídeo comercial, produzido pela empresa GenScript, conforme o mapa plasmidial apresentado na figura 14. O grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de DNA/CAM/UFAM inseriu o gene da GFP nesse vetor de expressão, o qual foi denominado para este trabalho de pGS21aG (pGS21a+GFP). Este plasmídeo, contendo o gene da GFP, foi utilizado como um padrão de comparação para a avaliação da expressão proteica.

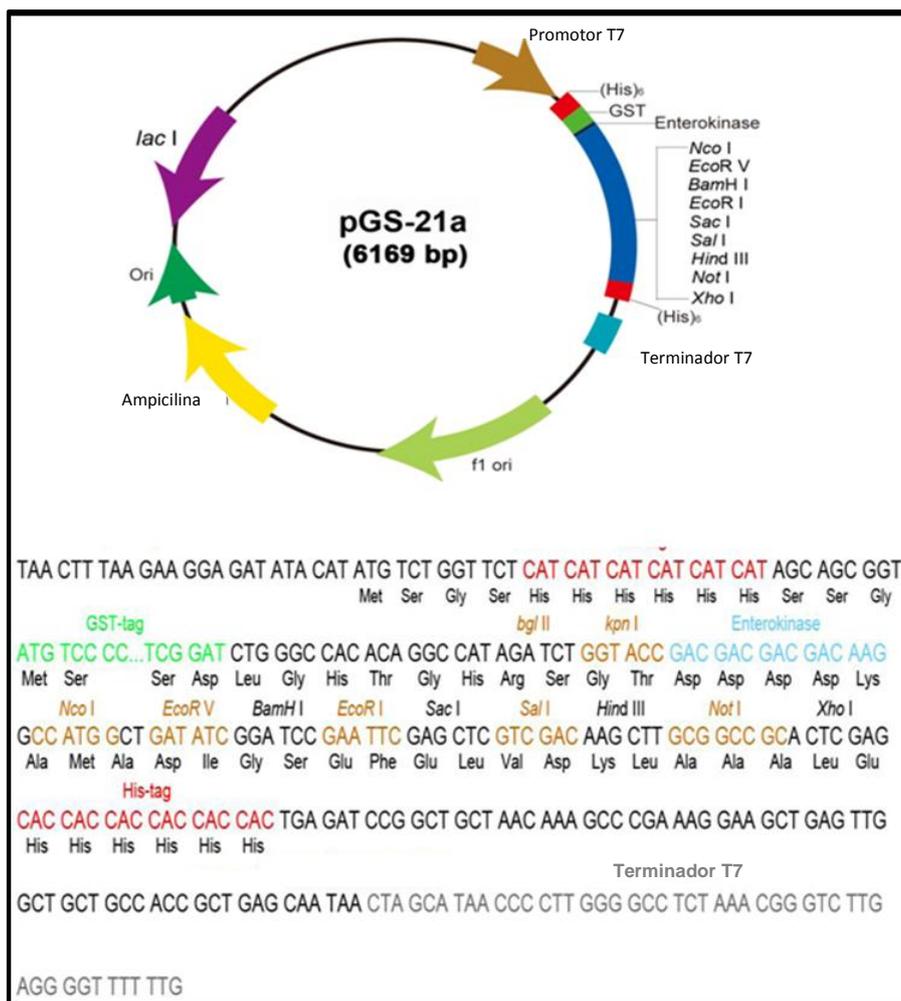


Figura 14 - Representação esquemática do mapa físico do vetor pGS-21a e do seu sítio múltiplo de clonagem.

4.6 Design e Síntese do *Polylinker A*

O *polylinker A* foi desenhado e construído, a partir de dois oligonucleotídeos, conforme ilustrado na tabela 04, para formar um dímero com extremidades coesivas.

Tabela 04 – Identificação e sequência dos nucleotídeos

Identificação	Sequência 5` -> 3'
JPLF	GGCCGAGATCTTTAATTAAGATATCA
JPLR	GGCCTGATATCTTAATTAAGATCTGC

Este *polylinker* contém duas extremidades coesivas e compatíveis com extremidades de *NotI*, entretanto, uma das extremidades reconstitui o sítio de

reconhecimento para *NotI*, enquanto a outra destrói o sítio de reconhecimento. Na parte interna do *polylinker*, foram projetados três sítios para as seguintes enzimas de restrição: *BglII*, *PacI* e *EcoRV*, conforme figura 15.

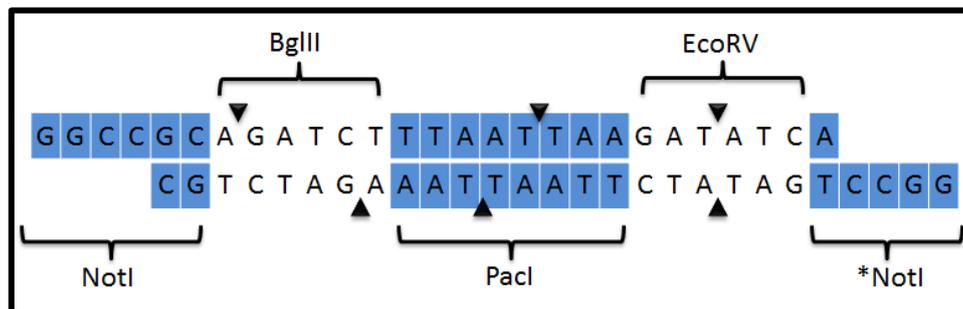


Figura 15 – Polylinker A, construído com extremidades coesivas e seus respectivos sítios de restrição. **NotI* não reconstrói o sítio de reconhecimento para a enzima *NotI*.

4.7 Design dos Cassetes de expressão.

Os cassetes de expressão foram desenhados para conter os seguintes elementos: região promotora para fator sigma (S), Shine-Dalgarno, *polylinker* B, *stop codon*, terminador de transcrição do operon triptofano e em cada extremidade do cassette, sítios de *NotI* e *BglIII*.

Foram construídos três cassetes de expressão, utilizando a estrutura básica de elementos apresentada na figura 16 e com as respectivas sequências nucleotídicas detalhadas na tabela 05.

A diferença entre os três cassetes de expressão está na sequência da região promotora. Para a escolha da região promotora utilizou-se como referência o trabalho denominado “*The sequence upstream of the -10 consensus sequence modulates the strength and induction time of stationary-phase promoters in Escherichia coli*” (Miksch et al, 2005), o qual descreve sequências promotoras com atividades na fase estacionária.

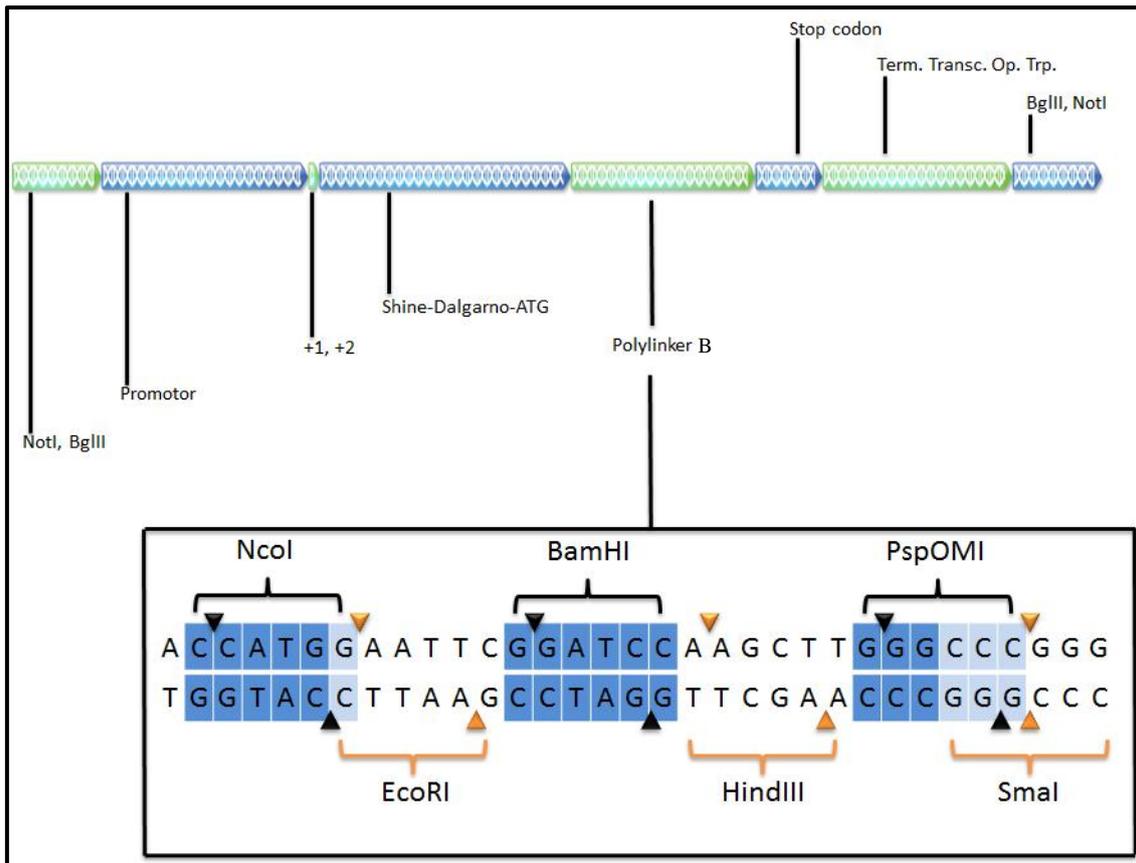


Figura 16 – Ilustra o desenho geral dos cassetes de expressão e os respectivos elementos identificados

Tabela 05 – Sequência nucleotídica dos cassetes de expressão. As cores possuem correlação com os elementos indicados na figura 16.

Cassete	Sequência de DNA 5'-> 3'
JK26	ACGCGGCCGCAGATCTTCTTGTCAAATTCTTAAATTTGTGCTATACTGTATCGATTCTAG
	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACCATGGAATTCGGATCCA
	AGCTTGGGCCCGGGTAACTGACCTAGGGAAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTA
	AGAGATCTGCGGCCGCAC
JK53	ACGCGGCCGCAGATCTTCTCGGCAGATACCATATTATCGGCTATACTGTATCGATTCTA
	GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACCATGGAATTCGGATCC
	AAGCTTGGGCCCGGGTAACTGACCTAGGGAAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTT
	AAGAGATCTGCGGCCGCAC
JKFS	ACGCGGCCGCAGATCTTCTTGTCAAATTCCTGTTATCTGCTATACTGTATCGATTCTAG
	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACCATGGAATTCGGATCCA
	AGCTTGGGCCCGGGTAACTGACCTAGGGAAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTA
	AGAGATCTGCGGCCGCAC

Os cassetes de expressão denominados JK26 e JK53 utilizam regiões promotoras descritas na literatura anteriormente citada. Já o cassete JKFS foi desenhado para este trabalho e não existe na literatura científica. Este foi construído com base em informações de sequências conservadas e que apresentavam maior afinidade pelo fator sigma S, frente ao fator sigma 70.

4.8 Design do Gene da GFP

Para o presente trabalho utilizou-se o gene mutante da GFP, pertencente à classe 1 e denominado *cycle 3*. Esta variante melhora o enovelamento proteico à 37°C, reduz a formação de agregados em altas concentrações e aumenta a difusão da proteína dentro da célula (Tsien, 1998).

A sequência do gene da GFP *cycle 3* foi obtida do banco de dados ENA – *European Nucleotide Archive*, disponível no sítio eletrônico do Instituto Europeu de Bioinformática (EBI).

A sequência do gene da GFP obtida do banco de dados possui seis sítios de restrição de interesse para a construção genética do vetor deste trabalho, a saber *HindIII*, *NdeI*, *XhoI*, *BamHI* e *Sall*, conforme tabela 06.

Tabela 06 – Sequência nucleotídica da proteína verde fluorescente, variante 'cycle 3', obtida do *European Nucleotide Archive*.

Sítio de Restrição	Sequência do gene, 5' -> 3'
<i>HindIII</i>	ATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTA GATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCTAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATG CTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCC ATGGCCAACACTTGTCACTACTTTTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCCCGTTATCCG
<i>NdeI</i>	GATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACA GGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGAACTACAAGACGCGTGCTGAAGTCA AGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTAAAG
<i>XhoI</i>	AAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAATGTAT ACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGCCAC
<i>BamHI</i>	AACATTGAAGATGGATCCGTTCACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATT GGCGATGGCCCTGTCTTTACCAGACAACCATTACCTGTCGACACAATCTGCCCTTT
<i>Sall</i>	CGAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACTGCT GCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAATAA

Estes sítios de restrição foram modificados e anulados, entretanto, sem modificar os respectivos aminoácidos durante a transcrição. Para tal fim, após

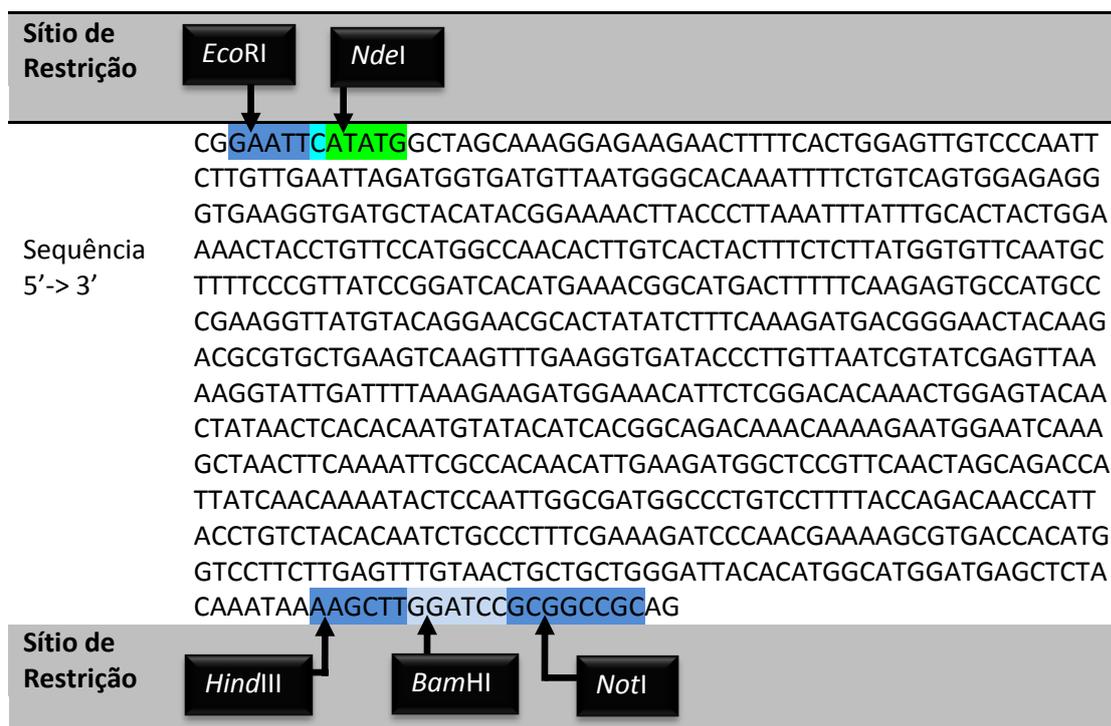
identificação da sequência de códons do gene, os que continham os sítios de restrição descritos anteriormente foram substituídos por códons alternativos para o mesmo aminoácido. A maior parte dos códons modificados foram otimizados para preferências da hospedeira *E. coli*, conforme ilustrado na tabela 07.

Tabela 07 – Modificação dos códons da GFP para eliminação dos sítios de restrição de interesse, conforme indicados.

Enzima	Códons Originais	Códons Modificados
HindIII		
NdeI		
XhoI		
BamHI		
Sall		

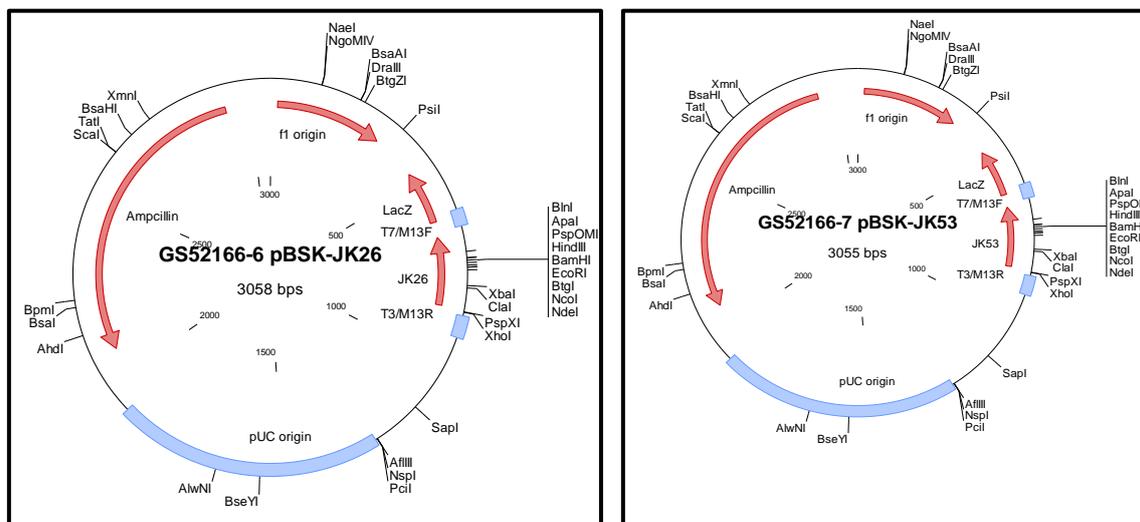
Ademais, foram desenhados sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *NdeI* na extremidade 5' do gene da GFP e sítios de *HindIII*, *BamHI* e *NotI* na extremidade 3', conforme ilustrado na tabela 08.

Tabela 08 – Desenho da sequência codificadora da GFP, modificada, contendo os sítios de restrição descritos em cada extremidade.



4.9 Síntese Química dos Cassetes de Expressão e do Gene da GFP

Os cassetes de expressão e o gene da GFP foram sintetizados e clonados dentro do sítio de restrição *EcoRV*, do vetor pBluescript II SK, desprovido do sítio múltiplo de clonagem. Estes materiais foram fornecidos pela empresa GenOne Biotechnologies.



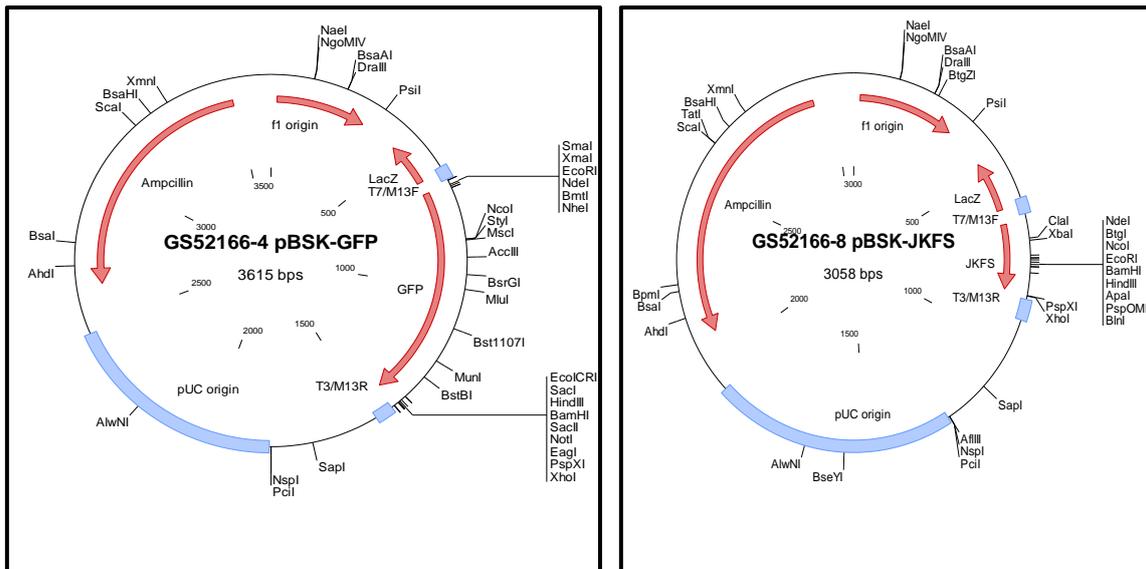


Figura 17 – Vetores comerciais contendo os cassetes de expressão e o gene da GFP desenhados para este trabalho.

4.10 Modificação do Plasmídio pUN

4.10.1 Preparo de células *E.coli* eletrocompetentes

Para esta etapa foram cultivadas células de *E. coli*, comerciais e eletrocompetentes, DH5 α F'IQ (Invitrogen) e BL21(DE3)pLysS (Promega). Para isso, uma única colônia da bactéria foi inoculada em 20 mL de meio LB e a cultura foi incubada com agitação de 150 rpm a 37 °C, durante 16h. Foi inoculada 1 mL dessa cultura em 300 mL de meio LB (sem antibióticos) e mantido em constante agitação até ser atingida a O.D₆₀₀ 0.5. O frasco foi esfriado em gelo durante 1 hora e a cultura dividida em tubos de 50 mL que foram centrifugados à 3.500 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas gentilmente até dissolver o *pellet* em 10 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Uma nova centrifugação foi realizada a 3.500 g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido novamente em 10 mL de glicerol 10% gelado e estéril. Estas etapas foram repetidas mais 4 vezes. Ao final o *pellet* foi ressuspendido em 15 mL de glicerol 10% gelado e estéril, centrifugado e ressuspendido em 1 mL de glicerol 10% gelado e estéril. As células eletrocompetentes foram aliquotadas em 100 μ L, e estocadas em *freezer* a -80 °C.

4.10.2 Transformação da hospedeira

A transformação por eletroporação ocorre por meio de descargas elétricas de alta voltagem que atravessam uma suspensão bacteriana por milissegundos, criando poros na parede e na membrana celular, possibilitando a entrada do DNA exógeno para dentro da célula hospedeira.

Uma alíquota de solução contendo o plasmídeo recombinante de interesse ($1\mu\text{L}\pm 50\text{ng}$) foi misturada a $100\mu\text{L}$ de células eletrocompetentes e transferidos para a cubeta de eletroporação (2mm). Foi aplicado um pulso elétrico de 1900 Volts em aparelho de eletroporação (Mod. Eletroporador 2510 Eppendorf). Imediatamente após o pulso, foi adicionado $1000\mu\text{L}$ de meio LB na cubeta, revigorando as células transformadas. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C com agitação (150 rpm). Em seguida, alíquotas foram plaqueadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina ($200\mu\text{g}/\text{mL}$). Ao final do plaqueamento, as placas de Petri foram incubadas invertidas a 37°C durante 16 h.

4.10.3 Eliminação do sítio de restrição *NdeI* do vetor pUN

O vetor pUN foi submetido à digestão enzimática com *NdeI*, para avaliação da presença deste sítio. As condições reacionais estão ilustradas na tabela 09, apêndice A.

O material digerido foi aplicado em um gel de agarose para avaliação do perfil eletroforético frente a um controle, conforme figura 19.

Após a digestão enzimática com *NdeI*, o plasmídeo linearizado foi tratado com T4 DNA polimerase para formação de extremidades abruptas, conforme disposto na tabela 10, apêndice A. Posteriormente, o vetor linearizado foi incubado com T4 DNA ligase, ligando as extremidades abruptas e tornando o vetor circular, conforme ilustrado na figura 20 e segundo as condições dispostas na tabela 11, apêndice A.

Após as modificações anteriormente descritas no vetor, o qual passou a se denominar pUNA, este foi internalizado na célula hospedeira, linhagem DH5 α F'IQ, através da técnica de eletroporação, para fins de clonagem do plasmídeo. Depois de plaqueadas, seis colônias foram selecionadas para extração plasmidial, conforme ilustrado na figura 21.

Os plasmídeos foram então incubados com *Nde*I, para avaliação da destruição ou não do sítio de *Nde*I.

4.11 Construção dos Plasmídeos Recombinantes p26, p53 e pFS

4.11.1 Inserção do *polylinker* A no vetor pUNA

Os dois oligonucleotídeos sintetizados foram dissolvidos em Tris-HCl 2mM, pH 8, em tubos separados. Ambos oligonucleotídeos foram incubados sob um gradiente térmico de resfriamento (80°C - > 37°C), usando uma taxa de resfriamento lenta, favorecendo desta maneira, o correto pareamento do dímero formado.

O dímero formado, correspondente ao *polylinker* A, já purificado, foi inserido no vetor pUNA, utilizando o sítio de restrição *Not*I.

O sistema de ligação foi realizado na proporção de 1:10 (vetor:inserto), conforme reação enzimática descrita na tabela 12, apêndice A. Nos ensaios de ligação utilizou-se enzima T4 DNA ligase, proveniente da empresa *New England Biolabs Inc.* O sistema foi incubado durante 16h. O produto da ligação foi introduzido em células *E. coli* DH5 α F'IQ por eletroporação.

Após transformação e crescimento bacteriano efetuou-se a purificação plasmidial. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas presentes no *polylinker*, conforme indicado na figura 23, para a confirmação da inserção do *polylinker*.

4.11.2 Linearização e defosforilação do vetor pUNA

O vetor pUNA foi incubado com *Not*I, para sua linearização, de acordo com as condições reacionais ilustradas na tabela 14, apêndice A. Após digestão enzimática e inativação térmica da enzima (65°C/15 min), foi corrido um gel de agarose 0,8% para purificação do vetor linearizado, conforme figura 25.

Posteriormente, o vetor linearizado foi tratado com a enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) para defosforilação das extremidades 5', de acordo com as condições reacionais ilustradas na tabela 15, apêndice A, e desta maneira aumentar a

eficiência de ligação dos cassetes de expressão nas extremidades coesivas compatíveis com *NotI*.

4.11.3 Inserção dos cassetes de expressão no vetor pUNA

Os cassetes de expressão, clonados no vetor pBSK, foram encaminhados adsorvidos em um pequeno pedaço de papel seco. Os papéis foram cortados e inseridos em tubos eppendorfs, separadamente, ao qual foram então adicionados 20 μ L de água ultra pura, estéril, em cada tubo, para extração plasmidial.

Utilizou-se 2 μ L de cada solução contendo os respectivos plasmídeos para transformação em *E. coli*. Após transformação e crescimento bacteriano efetuou-se a purificação plasmidial. Os plasmídeos foram digeridos com *NotI*, conforme tabela 13, apêndice A, para a liberação dos cassetes de expressão.

Os fragmentos de DNA correspondentes aos cassetes de expressão JK26, JK53 e JKFS, já purificados, foram clonados no *polylinker A*, utilizando o sítio de restrição *NotI*, de acordo com as condições reacionais ilustradas na tabela 16, apêndice A.

O sistema de ligação foi realizado na proporção de 1:3 (vetor/inserto). Nos ensaios de ligação utilizou-se a enzima T4 DNA ligase, proveniente da empresa *New England Biolabs Inc*. O sistema foi incubado durante 16h. O produto da ligação foi introduzido em células *E. coli* DH5 α F'1Q, por eletroporação.

Após transformação e crescimento, os plasmídeos foram extraídos e incubados com *NotI*, para confirmação da ligação, de acordo com as condições reacionais dispostas na tabela 17, apêndice A.

Os vetores resultantes passaram a se denominar **p26**, **p53** e **pFS**.

4.11.4 Digestão e purificação da sequência codificadora da GFP

O plasmídeo contendo a sequência codificadora da GFP foi encaminhado adsorvido em um pequeno pedaço de papel seco. O papel foi cortado e inserido em um tubo eppendorf, ao qual foram então adicionados 20 μ L de água ultra pura, estéril, para extração plasmidial.

Utilizou-se 2 μ L da solução contendo os respectivos plasmídeos (princípio transformante) para transformação em *E. coli*. Após transformação e crescimento bacteriano efetuou-se a purificação plasmidial. Os plasmídeos foram digeridos com *Nde*I e *Bam*HI, conforme tabela 18, apêndice A, para a liberação do gene da GFP.

Após digestão com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI e separação das bandas no gel de agarose, o fragmento correspondente ao gene da GFP foi purificado utilizando o kit de purificação GEilustra.

4.11.5 Inserção do gene da GFP nos vetores p26, p53 e pFS

Os vetores então construídos, a saber p26, p53 e pFS foram incubados com *Nde*I e *Bam*HI. Após digestão, os vetores foram aplicados em um gel de agarose para separação das bandas e posterior purificação do plasmídeo linearizado.

O fragmento de DNA correspondente ao gene da GFP, já purificado, foi inserido no *polylinker* B, presente nos cassetes de expressão dos vetores p26, p53 e pFS utilizando os sítios de restrição *Nde*I e *Bam*HI, conforme as condições ilustradas na tabela 19, apêndice A..

O sistema de ligação foi realizado na proporção de 1:3 (vetor/inserto). Nos ensaios de ligação utilizou-se enzima T4 DNA ligase, proveniente da empresa *New England Biolabs Inc*. O sistema foi incubado durante 16h. O produto da ligação foi introduzido em células *E. coli* DH5 α F'IQ por eletroporação.

Após a ligação da sequência codificadora da GFP aos vetores p26, p53 e pFS estes passaram a se denominar **p26G**, **p53G** e **pFSG**.

4.11.6 Identificação do gene da proteína verde fluorescente (GFP) nos plasmídeos recombinantes por análise de restrição

Após o procedimento de transformação bacteriana dos plasmídeos recombinantes p26, p53 e pFS foi realizado o crescimento celular bacteriano para cada experimento. Inoculou-se uma colônia bacteriana de cada clone recombinante, resultante da transformação, em meio LB líquido durante 16 h. Foi realizado

posteriormente à extração do DNA plasmidial, utilizando-se o *Kit Illustra plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare), seguindo suas especificações. Os plasmídeos extraídos foram analisados por digestão dupla com enzimas *NdeI* e *BamHI* (New England Biolabs) para a confirmação da presença do inserto nos plasmídeos descritos anteriormente.

4.11.7 Transformação em *E. coli* DH5 α F'IQ com os plasmídeos recombinantes p26G, p53G e pFSG

Para a expressão do gene da GFP presente nos plasmídeos recombinantes p26G, p53G e pFSG foi necessário inicialmente inseri-los, por eletroporação, em células eletrocompetentes para a expressão. Foi utilizado a linhagem bacteriana DH5 α F'IQ para expressão dos plasmídeos construídos.

4.12 Expressão da proteína recombinante

Os vetores construídos contendo o gene da GFP e denominados de p26G, p53G e pFSG foram introduzidos em células de *E. coli*, linhagem DH5 α F'IQ por eletroporação. Após plaqueamento, uma colônia de cada sistema recombinante foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido, contendo 100 μ g/mL de ampicilina, para crescimento durante 16 horas. Após o período de crescimento anteriormente mencionado, foram aliqüotados 1,5 mL de cada material e inoculado em 150 mL de meio LB líquido, contendo 100 μ g/mL de ampicilina.

Como padrão de comparação, utilizou-se o clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de DNA/CAM/UFAM, o qual utiliza o vetor comercial de expressão pGS21a ao qual foi inserido o gene da GFP, e aqui denominado de pGS21aG (pGS21a+GFP).

Foram aliqüotados 4 mL de cada experimento, de hora em hora, durante as primeiras doze horas e posteriormente em 22h, 28h, 36h e 48h de crescimento, para a realização do ensaio de fluorescência.

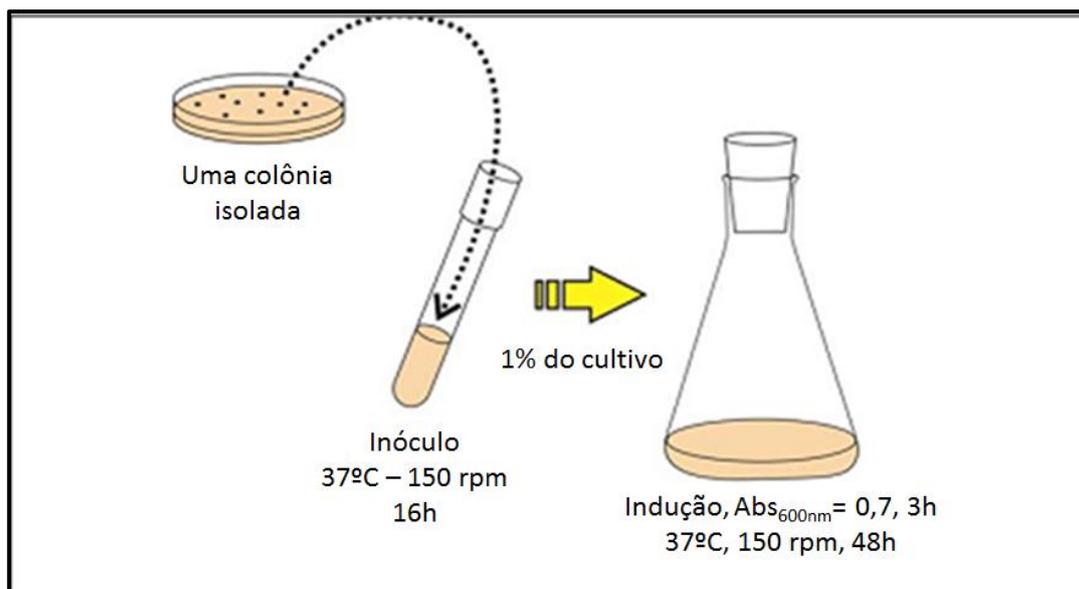


Figura 18 - Esquema ilustrando a metodologia de expressão

4.12.1 Obtenção dos extratos de proteínas, solúveis e insolúveis.

Para obtenção dos extratos totais utilizou-se 1,5 mL de cada cultivo, aliqüotados em diferentes intervalos de tempo, conforme o experimento anteriormente descrito. Estes materiais foram submetidos a centrifugação, 12.000 x g / 1 min / 4 °C. Após a formação do *pellet*, este foi ressuspensionado em 1000 µl de tampão TE (20 mM Tris-HCl pH 7.5; EDTA 5mM), utilizando-se o vórtex. Foram adicionados 10 µl de lisozima (20mg/ml) e a mistura incubada durante 10 minutos a 20°C. A amostra foi transferida ao gelo e submetida a três ciclos ultrassom. Após este procedimento foram adicionados 4 µl de triton X-100 10% (v/v). As preparações foram centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante corresponde à fração de proteínas solúveis e o sedimento às insolúveis. Para análise das frações em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, a fração solúvel foi coletada e estocada a -20 °C e a fração insolúvel foi ressuspensionada em 400µl de tampão TE e 4 µl de triton X- 100.

4.13 Avaliação da Expressão

4.13.1 Espectroscopia de fluorescência

Para a medida da fluorescência, as amostras aliqüotadas nos intervalos descritos na seção 4.11 foram aplicadas em microplacas de fundo preto e tampa transparente. Para a leitura de cada alíquota foi preparada uma sextuplicata, aplicando-se 250 µL por poço da microplaca.

Como controle, utilizou-se o clone recombinante de *E. coli* contendo o plasmídeo pUNA (DH5αF'IQ + pUNA). As leituras obtidas do controle foram descontadas dos valores obtidos dos demais experimentos.

A fluorescência foi medida utilizando o equipamento SPECTRAMax GEMINI XS Spectrofluorometer, Molecular Devices. As amostras foram excitadas a 395nm e a leitura da emissão foi feita a 509nm. O valor de fluorescência para cada ponto amostrado foi tomado como a média de seis leituras.

4.13.2 Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE

A proteína recombinante solúvel e insolúvel foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). As amostras solúveis e insolúveis da proteína recombinante foram ressuspendidas em 20 µL de tampão de amostra de eletroforese 1X para SDS-PAGE (200 Mm Tris pH 6.8; 0.1% de azul de bromofenol p/v; 4% SDS v/v; β-mercaptoetanol; 20% glicerol v/v) e as amostras foram fervidas em banho maria durante 5 minutos e imediatamente incubadas em gelo até a aplicação no gel. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel concentrador de 5% e separador 15%. A eletroforese foi realizada durante 2 horas a uma voltagem de 150 V. Após a eletroforese as proteínas desnaturadas foram coradas com a solução de Azul Brilhante de *Coomassie*.

4.13.3 Visualização da proteína verde fluorescente sob luz ultravioleta

Para a visualização direta da fluorescência da proteína verde fluorescente foi utilizada uma lâmpada ultravioleta com emissão em 365 nm. Em ambiente escuro, as

colônias recombinantes presentes nas placas de petri e os géis de proteína (não desnaturante) foram excitados a 365nm, sendo a fluorescência emitida facilmente detectada a olho nu.

4.13.4 Coloração de proteínas por Azul Brillhante de *Coomassie* G250

Após a eletroforese o gel foi incubado por 16h, em uma solução de *Coomassie blue* coloidal que tem a capacidade de detectar proteínas e constituída de 0,1% de *Coomassie* G250 p/v, ácido fosfórico 2% v/v, sulfato de amônio 10% p/v e metanol 20% v/v. Após o período de incubação o gel foi imerso em água ultra pura para perder o excesso de corante até atingir um contraste desejado para capturar a imagem via *scanner*.

4.13.5 Microscopia de fluorescência

Após 48h de crescimento em meio líquido, conforme descrito da na seção 4.12, uma alíquota de cada experimento foi levada ao microscópio óptico de fluorescência para observação da distribuição da proteína verde fluorescente no citoplasma bacteriano, assim como a morfologia de cada clone recombinante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Eliminação do sítio de restrição *Nde*I do vetor pUN

A figura 19a ilustra o perfil eletroforético do vetor pUN, com o intuito de avaliar o peso molecular aproximado. Na primeira raia está o marcador de peso molecular e nas raias seguintes, uma duplicata da amostra do referido plasmídeo. Pode-se observar na segunda e terceira raia as duas formas plasmidiais, sendo a inferior a superenovelada e a superior a circular relaxada.

Na figura 19b, o vetor pUN foi tratado com a enzima de restrição *Nde*I. A segunda raia refere-se ao controle e a terceira ao material submetido à digestão

enzimática. Através da observação da altura relativa das bandas, pode se confirmar que o plasmídeo foi linearizado, quando tratado com *NdeI*.

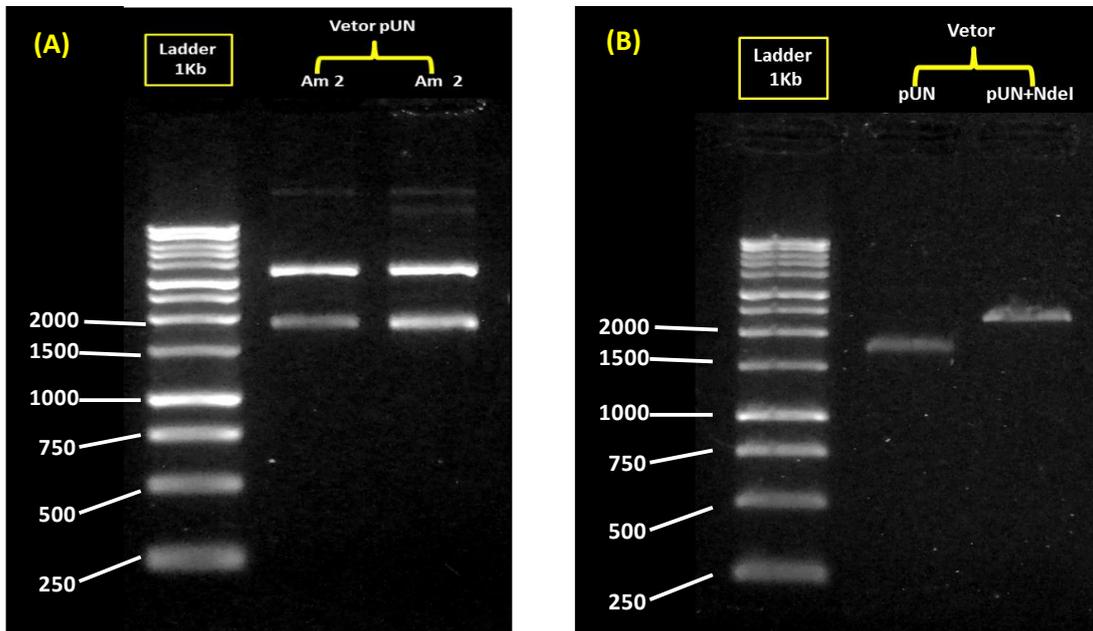


Figura 19 – Perfil eletroforético do vetor pUN em gel de agarose 0,8%, revelação com brometo de etídeo. Figura (A) ilustra duas amostras em duplicata do vetor pUN. Figura (B) ilustra a digestão enzimática, utilizando *NdeI*, e consequente abertura do vetor pUN.

Assim, o plasmídeo linearizado foi tratado com T4 DNA polimerase para formação de extremidades abruptas e posteriormente incubado com T4 DNA ligase, para tornar o vetor circular, conforme ilustrado na figura 20. Após as modificações anteriormente descritas no vetor, este passou a se denominar pUNA.

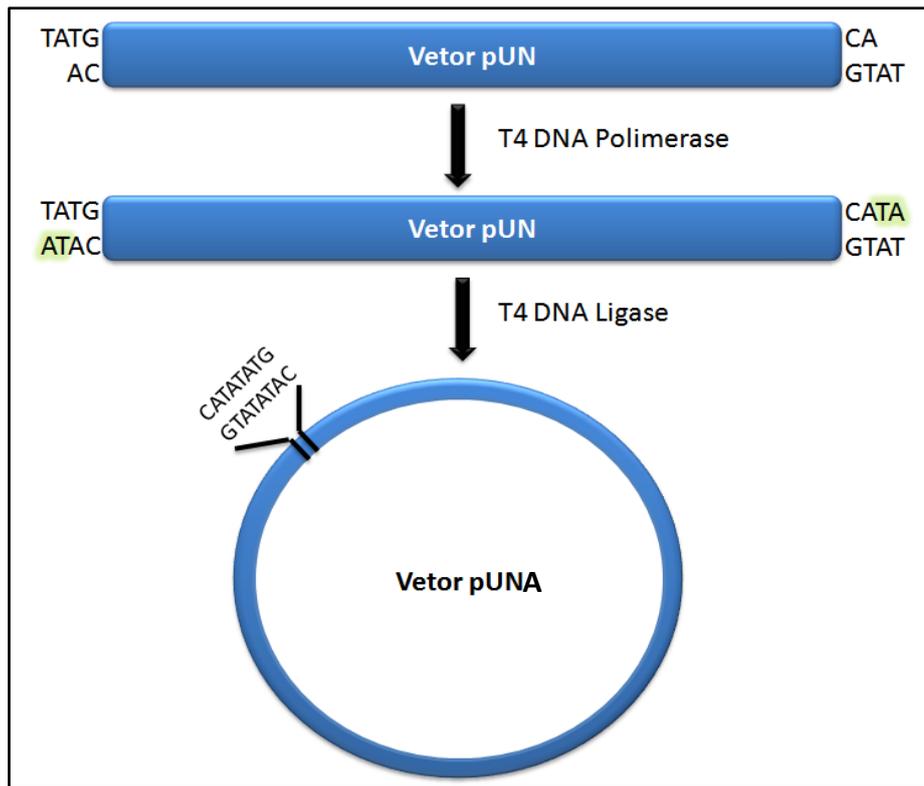


Figura 20 – Ilustração das etapas para destruição do sítio de *NdeI* no vetor pUN e posterior circularização do plasmídeo modificado, o qual passou a se denominar pUNA.

Seis colônias foram selecionadas para a extração plasmidial, conforme ilustrado na figura 21. Nesta foto é possível analisar o perfil eletroforético dos materiais extraídos frente ao marcador molecular.

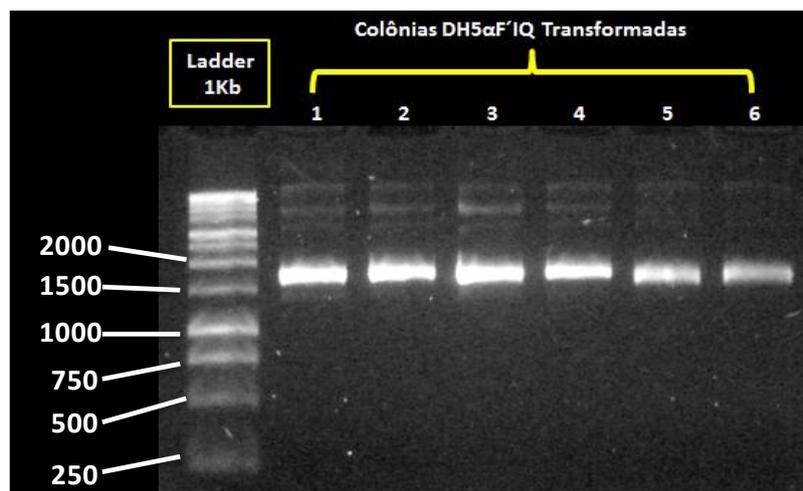


Figura 21 – Perfil eletroforético dos plasmídeos extraídos dos clones DH5αF'IQ, transformadas com o vetor pUNA, utilizando kit Illustra GE® PCR DNA and Gel Band Purification.

A. partir da análise de três clones tratados com a endonuclease *NdeI*, a construção do vetor pUNA foi confirmada, conforme figura 22. Na segunda canaleta,

colônia 1, é possível verificar que o sítio de *NdeI* não foi eliminado, porém, na quarta e sexta canaleta, colônias 2 e 3, pode-se verificar que houve destruição parcial dos sítios de *NdeI*. Nestas raias, a banda superior indica presença do sítio de restrição e a banda inferior demonstra a eliminação.

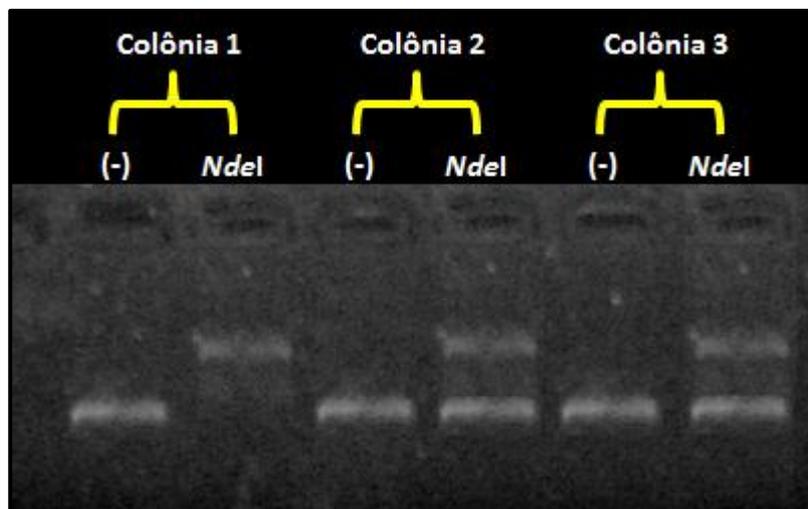


Figura 22 – Perfil eletroforético dos plasmídeos extraídos dos clones recombinantes contendo o vetor pUNA, incubado com enzima de restrição *NdeI*. O controle negativo é representado por (-).

5.2 Inserção do *Polylinker A* no Vetor pUNA

Para confirmação da inserção do *polylinker A* no vetor pUNA, este foi incubado com as respectivas endonucleases para os sítios projetados. Após transformação e crescimento bacteriano efetuou-se a purificação plasmidial. Conforme indicado na figura 23, a primeira raia trata-se do controle e as demais são os resultados da digestão do vetor pUNA com as enzimas *NotI*, *BglII*, *PacI* e *EcoRV*. É possível perceber que, em razão da altura relativa das bandas frente ao controle, houve digestão enzimática e linearização plasmidial, confirmando, desta forma, a inserção do *polylinker A* no vetor pUNA.

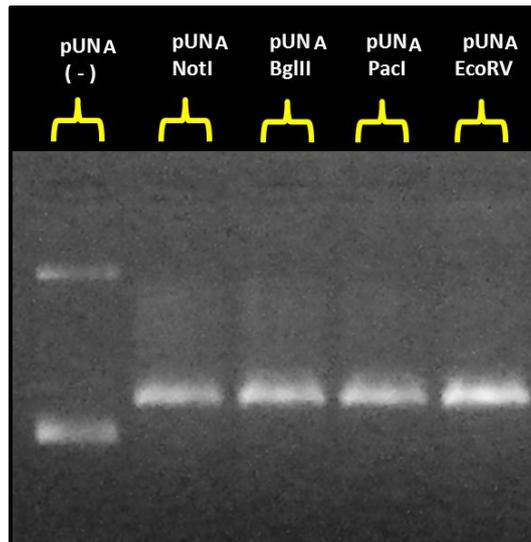


Figura 23 – Perfil eletroforético da digestão enzimática do vetor pUNA para confirmação da inserção do polylinker, utilizando as enzimas *NotI*, *BglII*, *PacI* e *EcoRV*. O controle negativo é representado por (-). Gel de agarose 0,8%, brometo de etídio 0,01%, 30 minutos de corrida, 100 V.

5.3 Digestão e Purificação dos Cassetes de Expressão

Os cassetes de expressão foram tratados conforme descrito na seção 4.11.3. Através da análise da figura 24, evidencia-se a liberação de um fragmento com aproximadamente 200pb, nas canaletas 2,3 e 4, que correspondem, respectivamente, aos cassetes de expressão Jk26, Jk53 e JkFS.

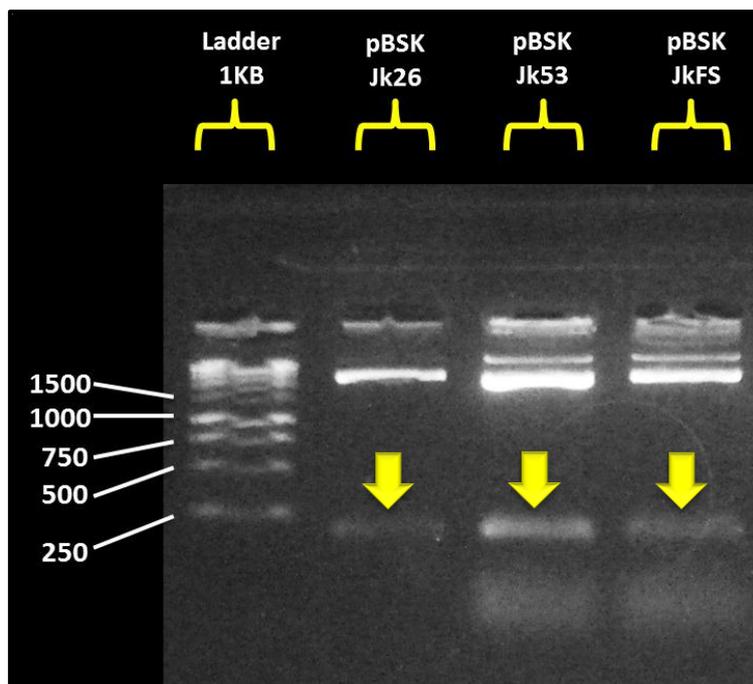


Figura 24 – Perfil eletroforético da digestão dos vetores pBSK contendo os cassetes JK26, JK53 e JKFS, utilizando *NotI*. O controle negativo é representado por (-). As setas

indicam os fragmentos correspondem aos cassetes de expressão. Gel de agarose 2%, brometo de etídio 0,01%, 20 minutos de corrida, 100V.

5.4 Linearização e Defosforilação do Vetor pUNA

O vetor pUNA foi incubado com *NotI*, para sua linearização, de acordo com as condições reacionais ilustradas na tabela 14, apêndice A. Após digestão enzimática e inativação térmica da enzima (65°C/15 min), pode-se observar na figura 25 que o vetor foi linearizado, haja vista o perfil de migração plasmidial frente ao controle. Após purificação da banda, o material foi tratado com a enzima SAP.

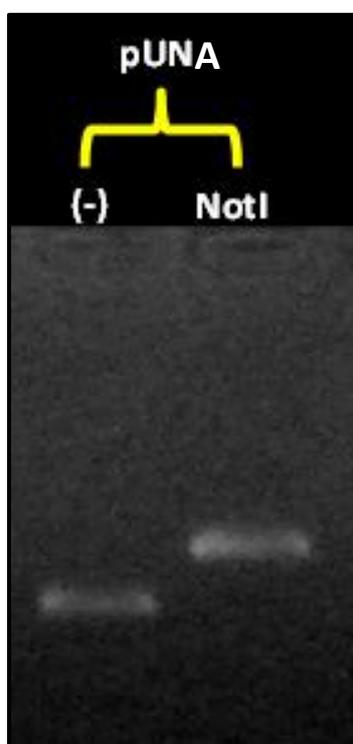


Figura 25 – Perfil eletroforético da digestão do vetor pUNA, utilizando a enzima *NotI*. O controle negativo é representado por (-). Gel de agarose 0,8%, brometo de etídio 0,01%, 40 minutos de corrida, 100V.

5.5 Ligação dos Cassetes de Expressão no Vetor pUNA

Os cassetes de expressão foram inseridos conforme descrito na seção 4.11.3. Para confirmação da ligação, utilizando a enzima *NotI*, a figura 26 ilustra o resultado da digestão, para cada sistema de ligação. Os fragmentos indicados pelas setas correspondem aos cassetes de expressão, liberados após a digestão enzimática, e desta forma, confirmando a ligação do inserto.

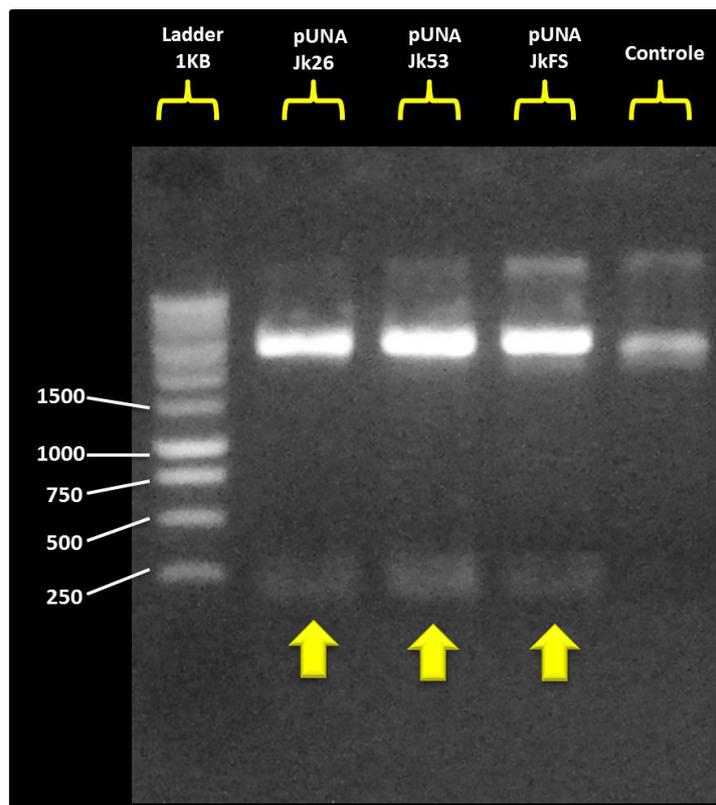


Figura 26 – Perfil eletroforético da digestão dos vetores pUNA-JK26, pUNA-JK53 e pUNA-JKFS, utilizando *NotI*, para confirmação da inserção dos cassetes de expressão. Gel de agarose 1%, brometo de etídio 0,01%, 40 minutos de corrida, 100 V.

A partir da ligação dos cassetes de expressão no vetor pUNA, estes vetores passaram a se denominar **p26**, **p53** e **pFS**.

5.6 Digestão e Purificação da Sequência Codificadora da GFP

A figura 27 ilustra o perfil eletroforético da digestão do vetor pBSK-GFP frente ao seu respectivo controle. A primeira canaleta ilustra o marcador de peso molecular, a segunda o vetor pBSK contendo a sequência codificadora da GFP e a terceira o resultado da digestão enzimática do referido vetor, utilizando as enzimas *NdeI* e *BamHI*. O fragmento de DNA indicado pela seta, resultado da digestão enzimática, juntamente com a distância relativa de migração eletroforética deste inserto frente ao marcador molecular, confirma a liberação da sequência codificadora da GFP, a qual possui aproximadamente 720 pb.

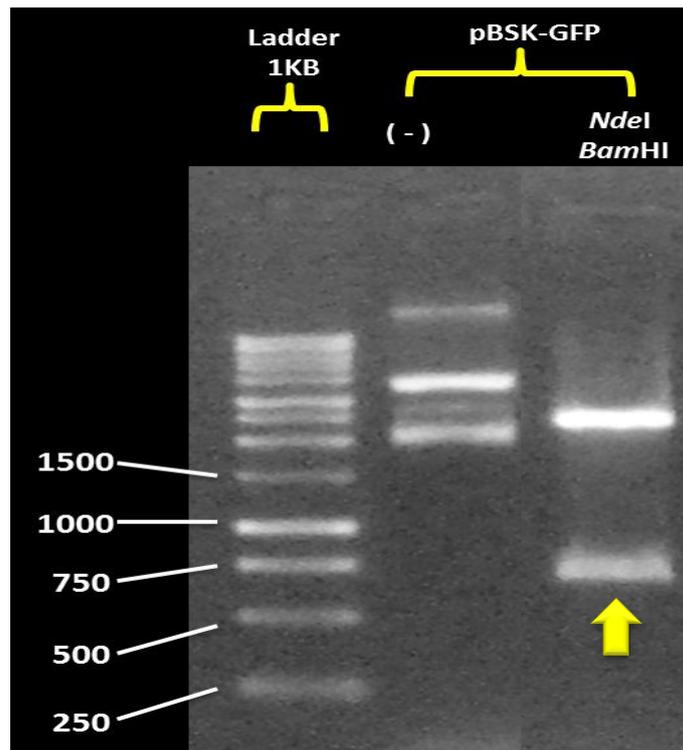


Figura 27 – Perfil eletroforético da digestão do vetor pBSK-GFP contendo o gene da GFP, utilizando *NdeI* e *BamHI*. O controle negativo é representado por (-). A seta indica o fragmento correspondente ao gene da GFP. Gel de agarose 1%, brometo de etídio 0,01%, 20 minutos de corrida, 100V.

Após digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e separação das bandas no gel de agarose, o fragmento indicado pela seta foi purificado.

5.7 Introdução da Sequência Codificadora da GFP nos Cassetes de Expressão

O resultado dos procedimentos realizados nas seções 4.11.5 e 4.11.6 está ilustrado na figura 28, confirmando a ligação do gene da GFP aos vetores construídos. As setas, ilustradas nas canaletas 3,4 e 5, indicam a liberação de um fragmento de aproximadamente 750 pb, quando da dupla digestão dos vetores p26G, p53G e pFSG com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Resultado este, que confirma a proposta de construção deste trabalho. A sequência codificadora da GFP possui aproximadamente 720 pb.

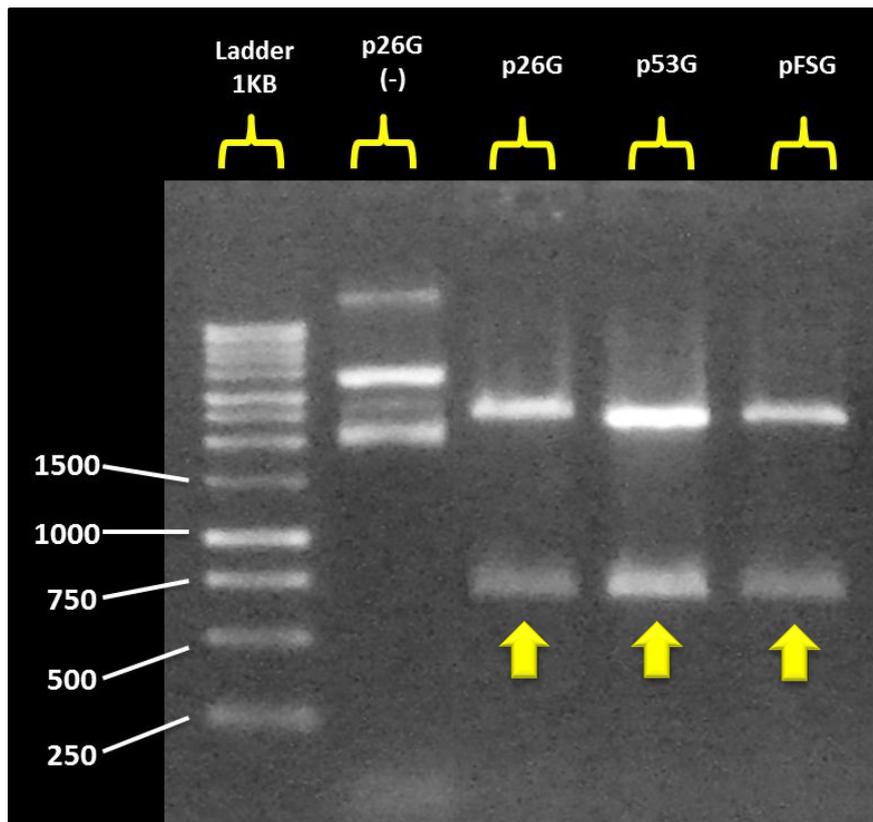


Figura 28 – Perfil eletroforético da digestão dupla dos vetores p26G, p53G e pFSG utilizando *NdeI* e *BamHI*. O controle negativo é representado por (-). O inserto liberado corresponde ao gene da GFP. Gel de agarose 0,8%, brometo de etídio 0,01%, 40 minutos de corrida, 100V.

A fim de ratificar os resultados anteriores, na figura 29 é possível confirmar a ligação do gene da GFP aos cassetes de expressão. Nesta figura pode-se observar a liberação de um fragmento que corresponde ao conjunto cassete de expressão + sequência codificadora da GFP, o qual possui aproximadamente 900 pb. As setas indicam a liberação de fragmentos de DNA, nas raias 2, 3 e 4, com pesos moleculares próximos à 1000pb, que representam o resultado da digestão dos vetores p26G, p53G e pFSG com a enzima *NotI*.

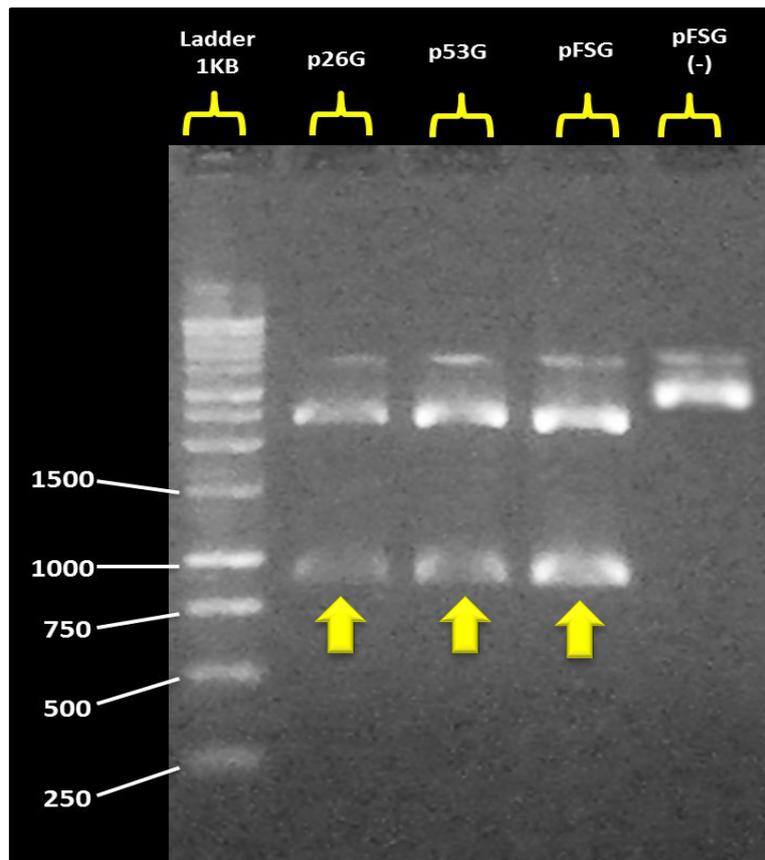


Figura 29 - Digestão dos vetores p26G, p53G e pFSG utilizando *NotI*. O inserto liberado corresponde ao conjunto cassete de expressão + GFP. O controle negativo é representado por (-). Gel de agarose 0,8%, brometo de etídio 0,01%, 40 minutos de corrida, 100V

5.8 Mapa Físico dos Plasmídeos Recombinantes Construídos

Ao término das construções, os plasmídeos p26G, p53G e pFSG apresentam as configurações ilustradas nos mapas vetoriais da figura 30. O vetor p26G representa os elementos básicos que são comuns aos demais, a diferença está na sequência nucleotídica de cada promotor.

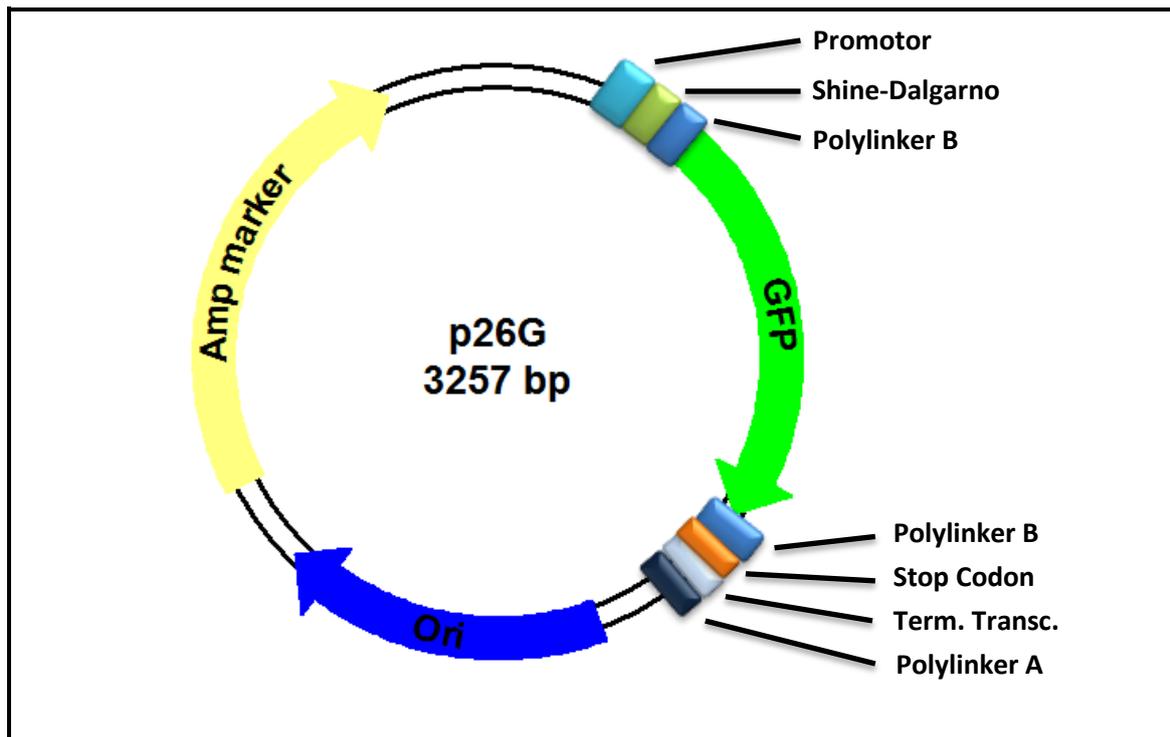


Figura 30 – Mapa físico plasmidial para todos os vetores construídos, aqui representado pelo vetor p26G.

5.9 Perfil de Crescimento Bacteriano e Expressão da GFP

Como padrão de comparação, utilizou-se o clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de DNA/CAM/UFAM, o qual utiliza o vetor comercial de expressão pGS21a ao qual foi inserido o gene da GFP, e aqui denominado de pGS21aG (pGS21a+GFP).

A figura 31 ilustra os frascos de erlenmeyer ao final do experimento, contendo os experimentos anteriormente descritos.

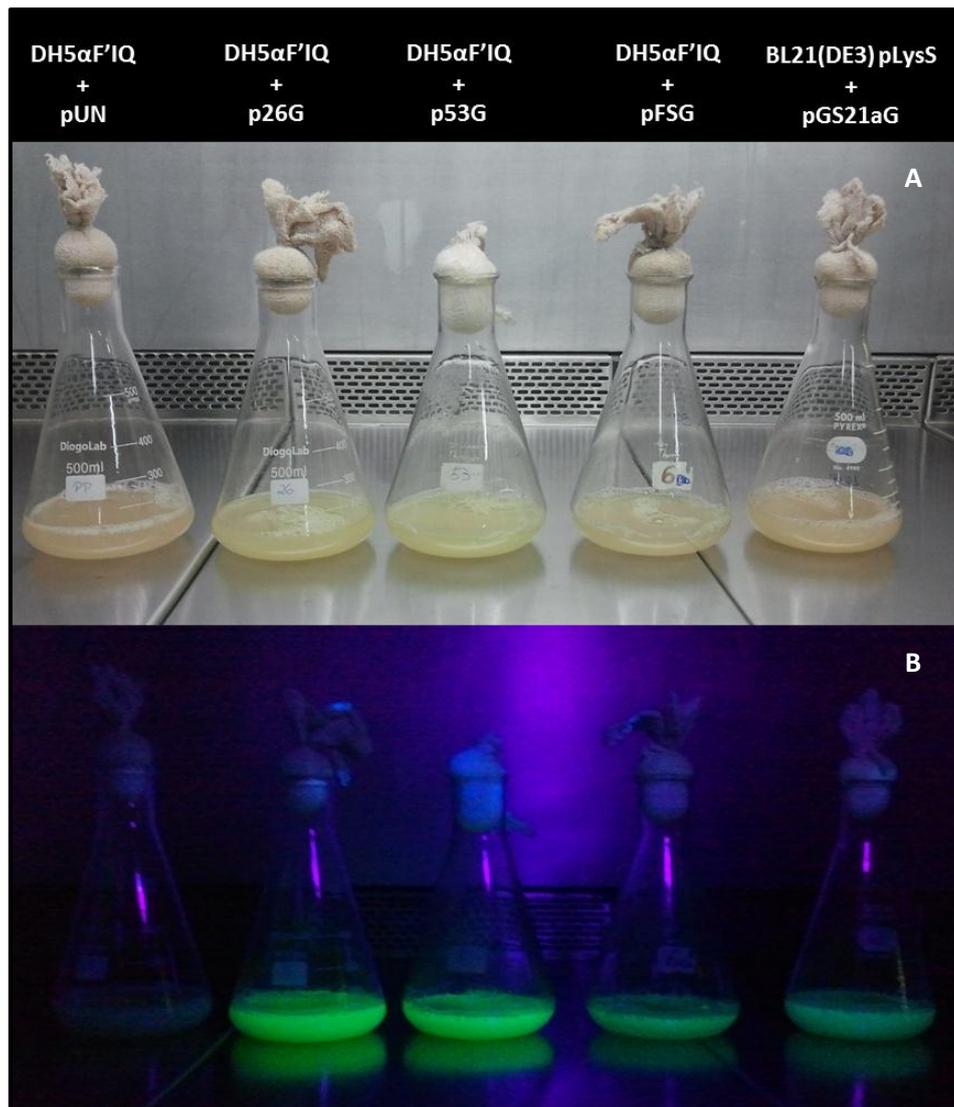


Figura 31 – Frascos de erlenmeyer visualizados ao final do experimento, para cada clone recombinante indicado. A – Luz visível. B – Luz ultravioleta, 365nm.

Quando visualizados sob luz ultravioleta (365nm), os clones recombinantes DH5 α F'IQ+p26G e DH5 α F'IQ+p53G, visualmente, são os que apresentam maior intensidade de fluorescência, quando comparados aos demais.

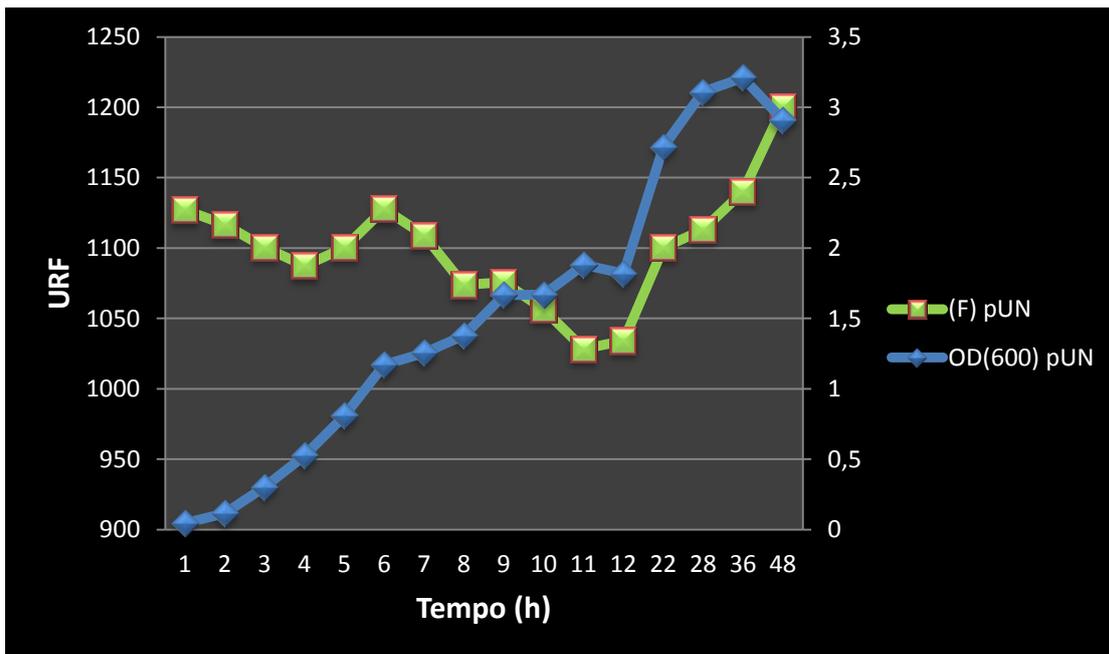


Figura 32 – Curva de crescimento bacteriano e fluorescência em função do tempo para o clone recombinante DH5αF'IQ + pUNA. A coluna da esquerda representa a fluorescência emitida em URF (Unidade Relativa de Fluorescência). A coluna da direita representa a densidade ótica bacteriana (OD₆₀₀). (F) = Fluorescência.

A figura 32 ilustra o perfil do crescimento bacteriano do clone recombinante DH5αF'IQ + pUNA, o qual foi utilizado como controle do experimento. Durante o tempo de experimento a densidade ótica varia de 0 a 2,9, enquanto que a fluorescência emitida varia de aproximadamente 1100 a 1200 URF (Unidade Relativa de Fluorescência).

Os valores de fluorescência obtidos para este controle foram tomados como *baseline* e descontados dos valores obtidos para os demais experimentos.

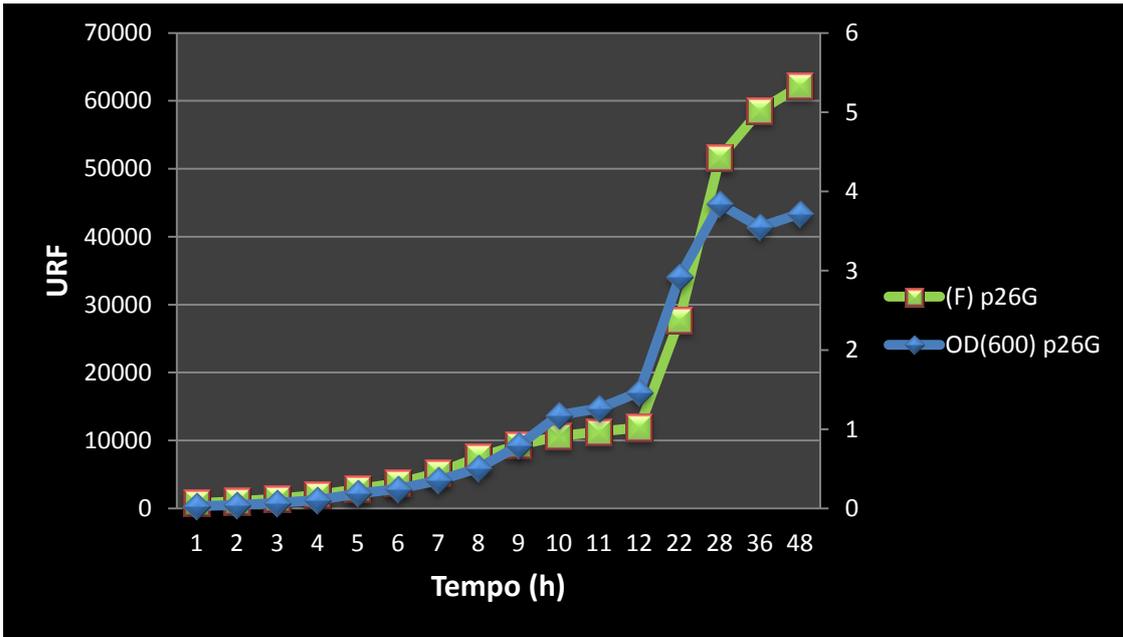


Figura 33 - Curva de crescimento bacteriano e fluorescência em função do tempo para o clone recombinante DH5αF'IQ + p26G. A coluna da esquerda representa a fluorescência emitida em URF (Unidade Relativa de Fluorescência). A coluna da direita representa a densidade ótica bacteriana (OD₆₀₀). (F) = Fluorescência.

A figura 33 ilustra o perfil do crescimento bacteriano do clone recombinante DH5αF'IQ + p26G. Durante o tempo de experimento a densidade ótica varia de 0 a 3,7, enquanto que a fluorescência emitida varia de aproximadamente 800 a 62000 URF (Unidade Relativa de Fluorescência).

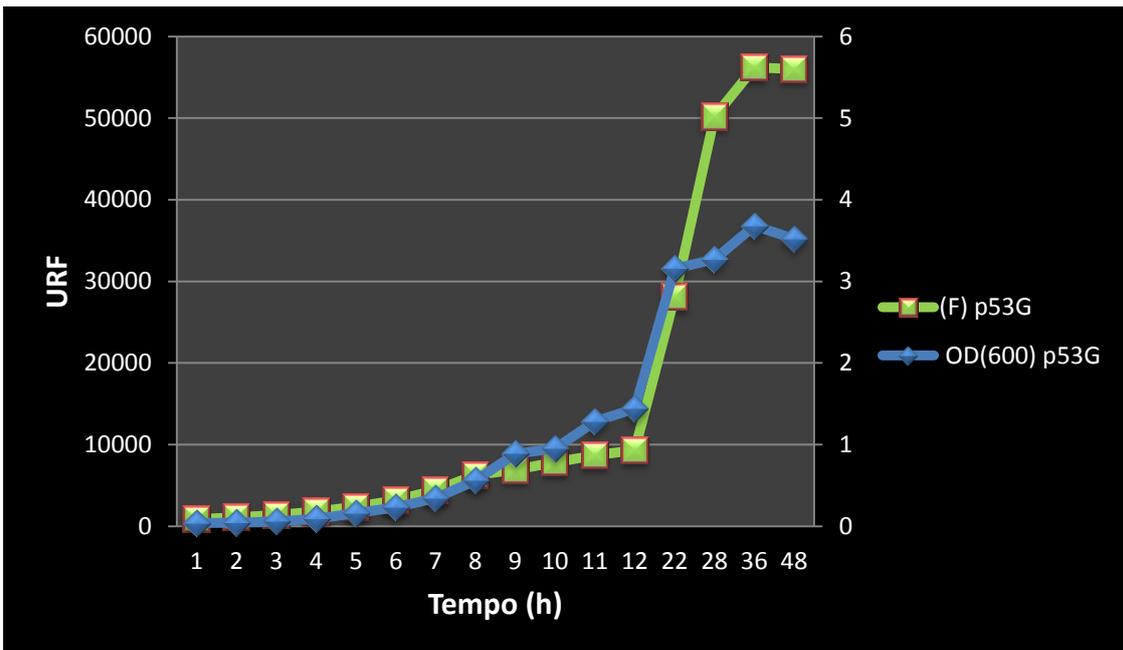


Figura 34 - Curva de crescimento bacteriano e fluorescência em função do tempo para o

clone recombinante DH5 α F'IQ + p53G. A coluna da esquerda representa a fluorescência emitida em URF (Unidade Relativa de Fluorescência). A coluna da direita representa a densidade ótica bacteriana (OD₆₀₀). (F) = Fluorescência.

A figura 34 ilustra o perfil do crescimento bacteriano do clone recombinante DH5 α F'IQ + p53G. Durante o tempo de experimento a densidade ótica varia de 0 a 3,5, enquanto que a fluorescência emitida varia de aproximadamente 860 a 56000 URF (Unidade Relativa de Fluorescência).

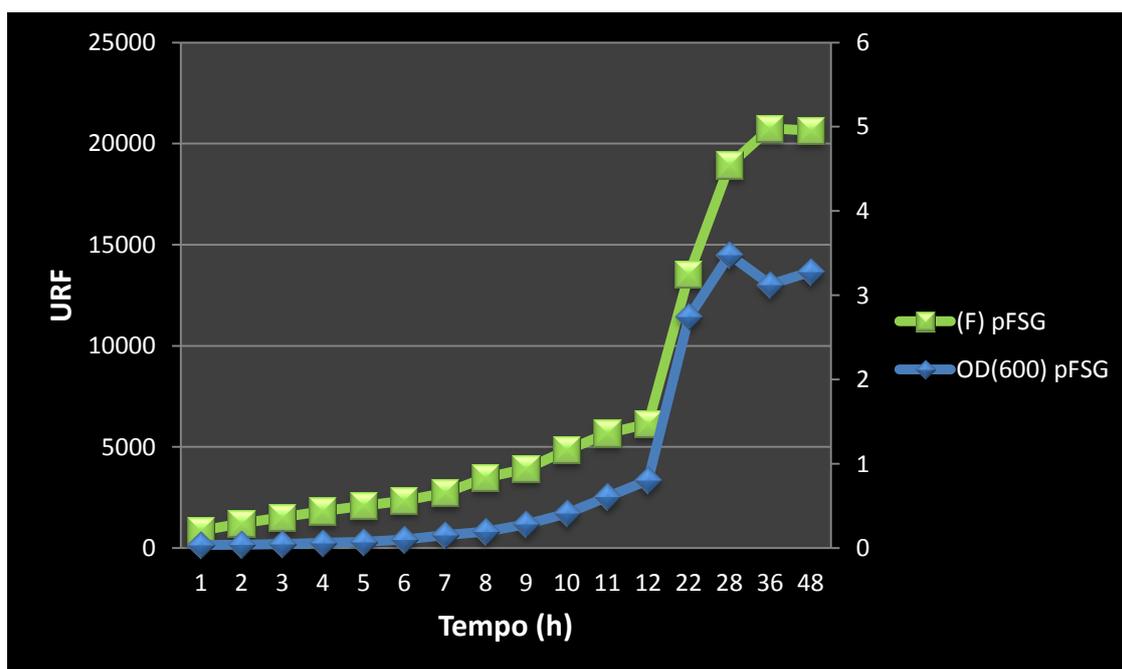


Figura 35 - Curva de crescimento bacteriano e fluorescência em função do tempo para o clone recombinante DH5 α F'IQ + pFSG. A coluna da esquerda representa a fluorescência emitida em URF (Unidade Relativa de Fluorescência). A coluna da direita representa a densidade ótica bacteriana (OD₆₀₀). (F) = Fluorescência.

A figura 35 ilustra o perfil do crescimento bacteriano do clone recombinante DH5 α F'IQ + pFSG. Durante o tempo de experimento a densidade ótica varia de 0 a 3,3, enquanto que a fluorescência emitida varia de aproximadamente 870 a 20600 URF (Unidade Relativa de Fluorescência).

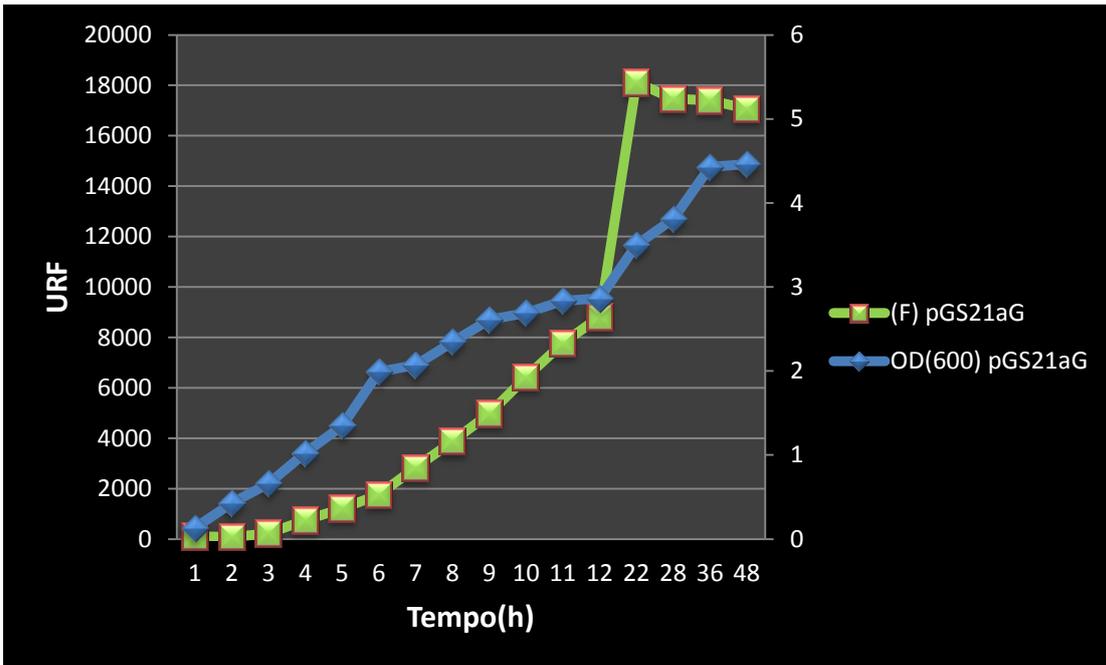


Figura 36 - Curva de crescimento bacteriano e fluorescência em função do tempo para o clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG. A coluna da esquerda representa a fluorescência emitida em URF (Unidade Relativa de Fluorescência). A coluna da direita representa a densidade ótica bacteriana (OD_{600}). (F) = Fluorescência

A figura 36 ilustra o perfil do crescimento bacteriano do clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG. Durante o tempo de experimento a densidade ótica varia de 0,1 a 4,5, enquanto que a fluorescência emitida varia de aproximadamente 114 a 17100 URF (Unidade Relativa de Fluorescência).

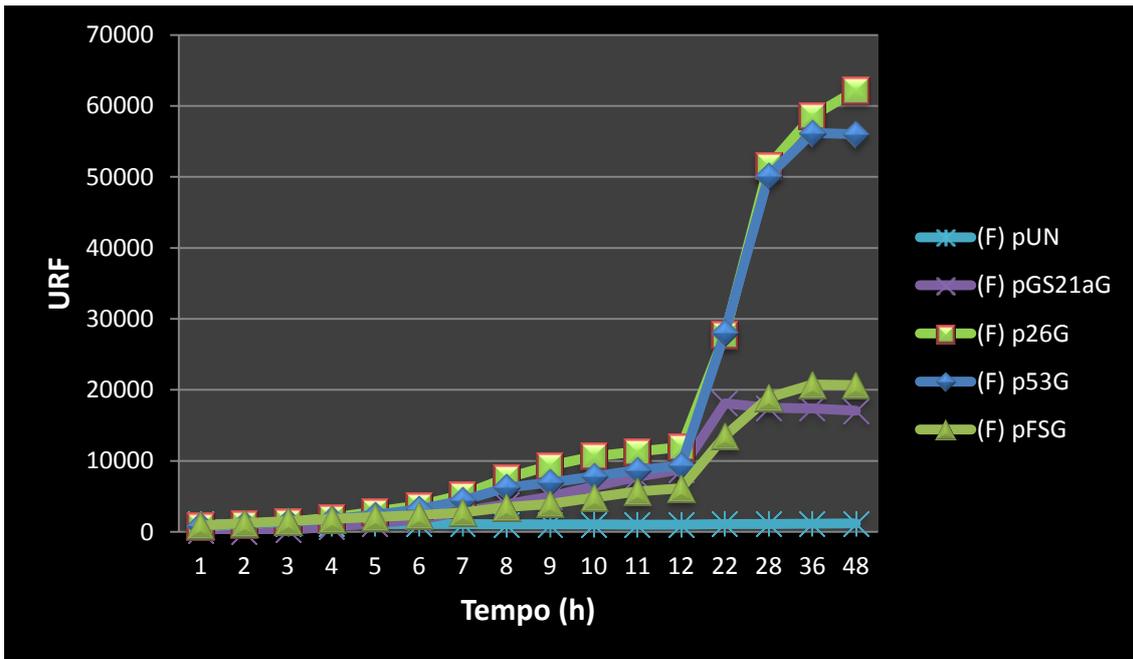


Figura 37 - Curvas de fluorescências em função do tempo dos clones recombinantes, sobrepostas. A coluna da esquerda representa a fluorescência emitida em URF (Unidade Relativa de Fluorescência). (F) = Fluorescência

A figura 37 ilustra o perfil de fluorescência emitida ao longo do tempo para os clones recombinantes descritos anteriormente. De uma maneira geral, os clones recombinantes DH5 α F'IQ + p26G e DH5 α F'IQ + p53G apresentam uma fluorescência três vezes maior, ao final do experimento, do que os clones recombinantes DH5 α F'IQ + pFSG e BL21(DE3)pLysS + pGS21aG.

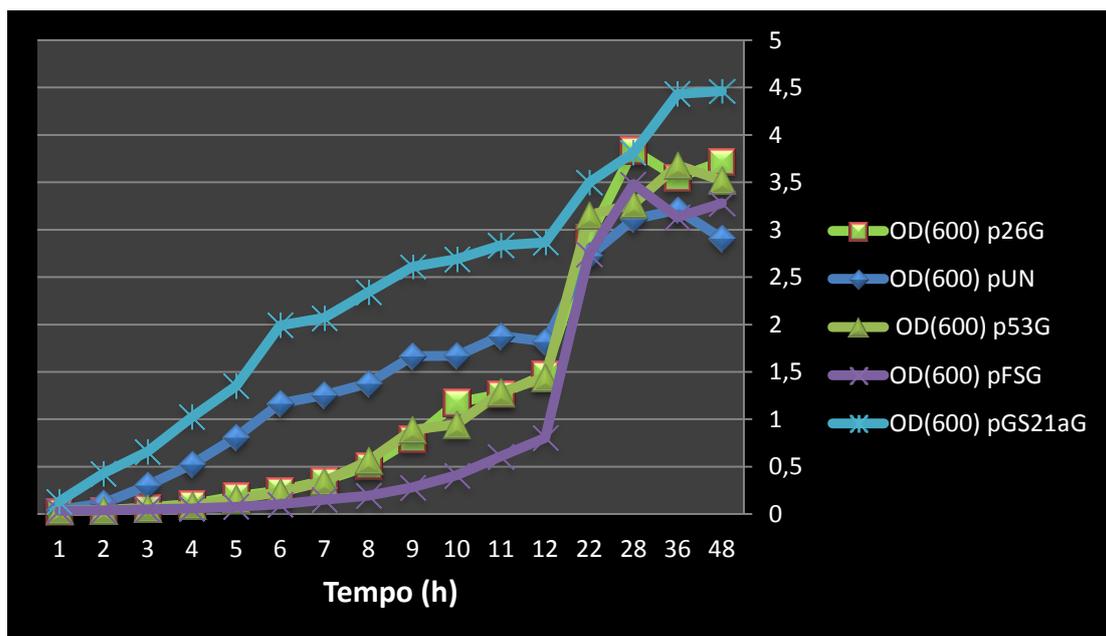


Figura 38 - Curvas de crescimento bacteriano em função do tempo dos clones

recombinantes, sobrepostas. A coluna da direita representa a densidade ótica bacteriana (OD_{600}).

A figura 38 descreve as curvas dos crescimentos bacterianos em função do tempo para os clones recombinantes em tela. Os dados foram obtidos através da leitura da densidade ótica, medida em 600nm. De acordo com o gráfico, o clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG apresenta a maior taxa de crescimento ao longo do tempo e o clone recombinante DH5 α F'IQ + pFSG apresenta a menor taxa de crescimento, comparativamente.

Tendo em vista os dados publicados no trabalho de Miksch e colaboradores, 2005, estudo o qual serviu de referência para a sequência das regiões promotoras desta dissertação, e considerando a mesma metodologia para o ensaio de fluorescência, pode se observar algumas diferenças importantes, quando comparados os resultados:

- Densidade ótica (OD_{600}) – No trabalho de referência a OD_{600} atinge o valor de 1,0 entre 4 e 5 horas. No presente trabalho, o mesmo valor é observado entre 9 e 12 horas de crescimento bacteriano, aproximadamente. Estes dados denotam um crescimento lento.
- Emissão de fluorescência – No trabalho de referência, nos gráficos apresentados, os valores de fluorescência se tornam constantes entre 9 e 12 horas. No presente trabalho, os valores de fluorescência começam a atingir um platô após 36 horas de cultivo.

5.10 Análise da Expressão Heteróloga da Proteína GFP em *E.coli* em Meio Líquido

A expressão da proteína recombinante verde fluorescente pode ser observada na figura 39, a qual possui massa molecular de aproximadamente 26,8 kDa, conforme o cálculo teórico de massa molecular a partir da sequência de 239 resíduos de aminoácidos do gene da GFP, o qual é de 26.867,22 Da. Além disso, o marcador de peso molecular corrobora a massa molecular aproximada do produto de expressão. Na mesma figura é possível observar que o clone recombinante DH5 α F'IQ + pUNA, o qual

é utilizado como controle, apresenta uma expressão basal de proteínas na região de 28 kDa.

Ainda no mesmo gel, pode-se observar o perfil de expressão da proteína verde fluorescente para os clones recombinantes desenvolvidos neste trabalho, em diferentes tempos do experimento desenvolvido na seção 5.11. A figura 40 ilustra o mesmo gel, visualizado sob luz ultravioleta (365nm) previamente à coloração com o azul de comassie.

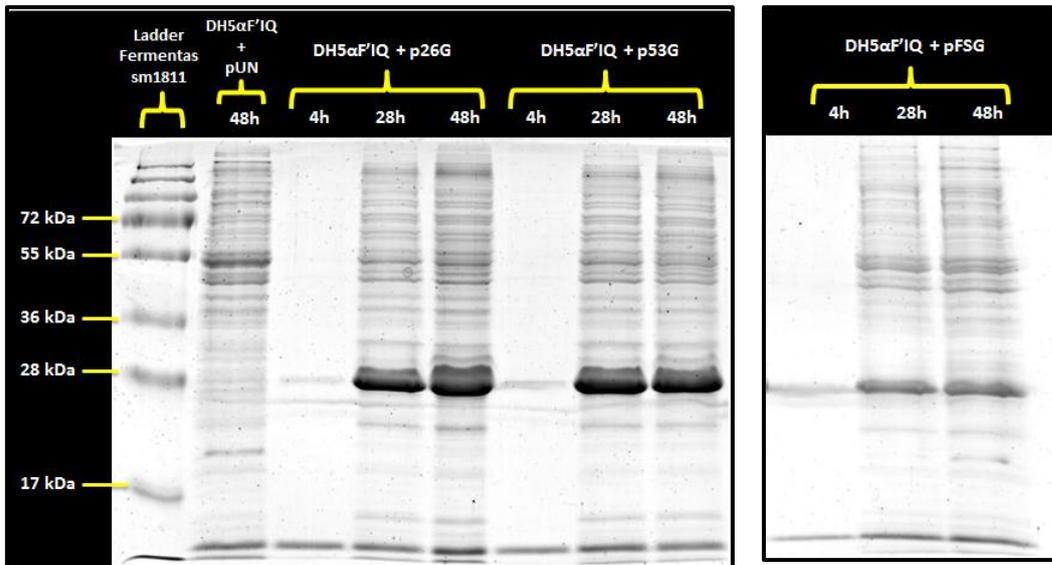


Figura 39 - Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelos clones recombinantes indicados em cada figura. Aliquotas dos tempos 4h, 28h e 48h de cada experimento. Revelação com azul de comassie.

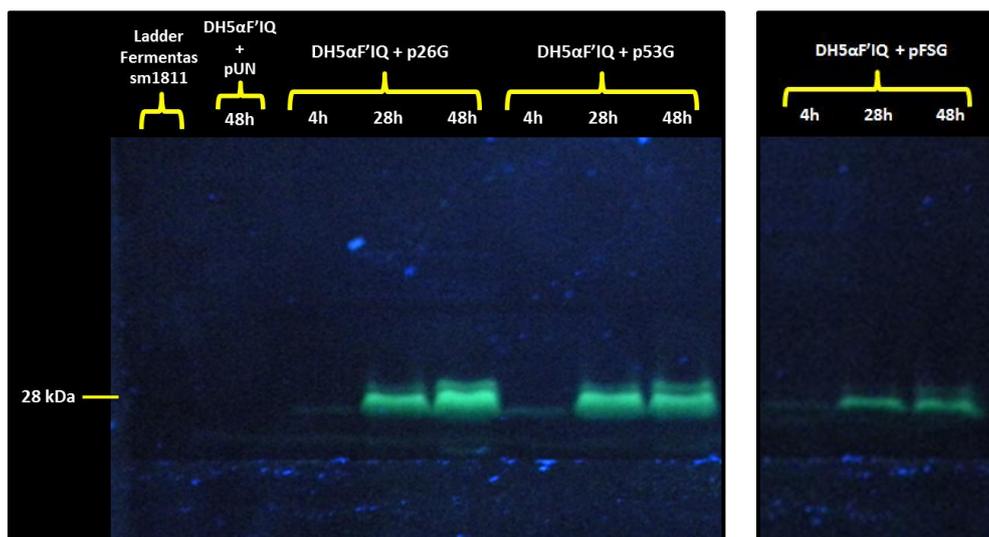


Figura 40 - Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelos clones recombinantes indicados em cada figura. Aliquotas dos tempos 4h, 28h e 48h de experimento, para cada experimento. Visualização sob luz ultravioleta, 365nm.

As amostras do final do experimento, tempo 48h, foram comparadas lado-a-lado para a avaliação do perfil eletroforético, figura 41. Para fins de comparação utilizou-se o clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG, o qual possui um promotor forte (promotor T7).

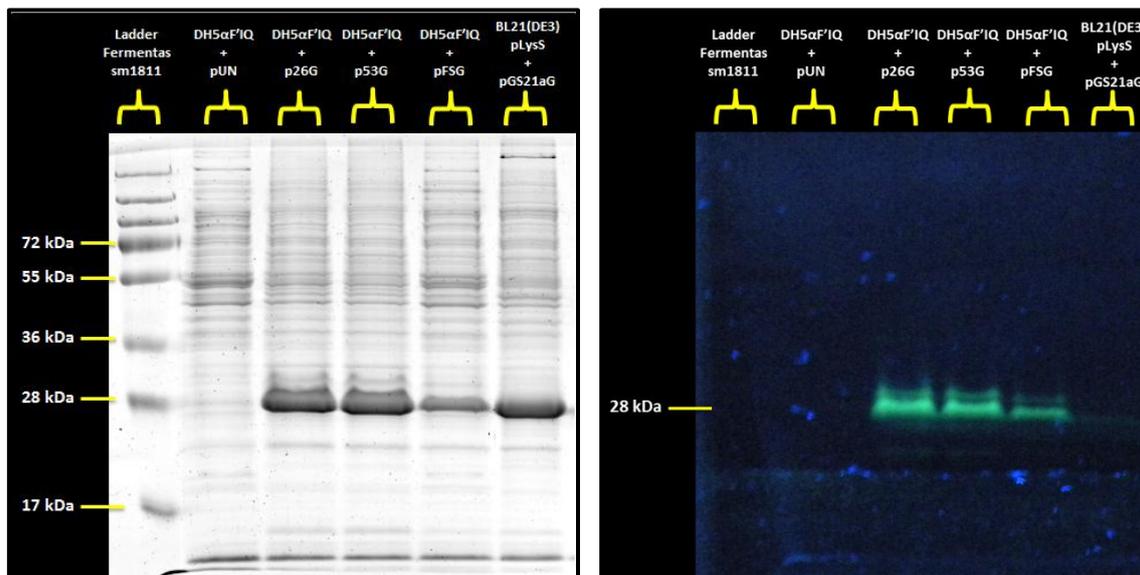


Figura 41 - Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelos clones recombinantes indicados em cada figura, após 48h de crescimento. A – Gel corado com azul de comassie. B – Gel visualizado sob luz ultravioleta (365nm), previamente à coloração com o azul de comassie.

Pode-se observar que os clones recombinantes DH5αF'IQ + p26G e DH5αF'IQ + p53G são os que apresentam a maior quantidade de proteína expressa, sendo que o clone que contém o vetor p26G expressa mais GFP que o p53G. O clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG apresenta uma boa expressão proteica, entretanto, quando se observa o produto da expressão sob luz ultravioleta fica evidente que a formação do fluoróforo está prejudicada, o qual é formado pelo rearranjo dos aminoácidos Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷. Este resultado pode ser um reflexo do enovelamento incorreto da proteína, durante sua expressão.

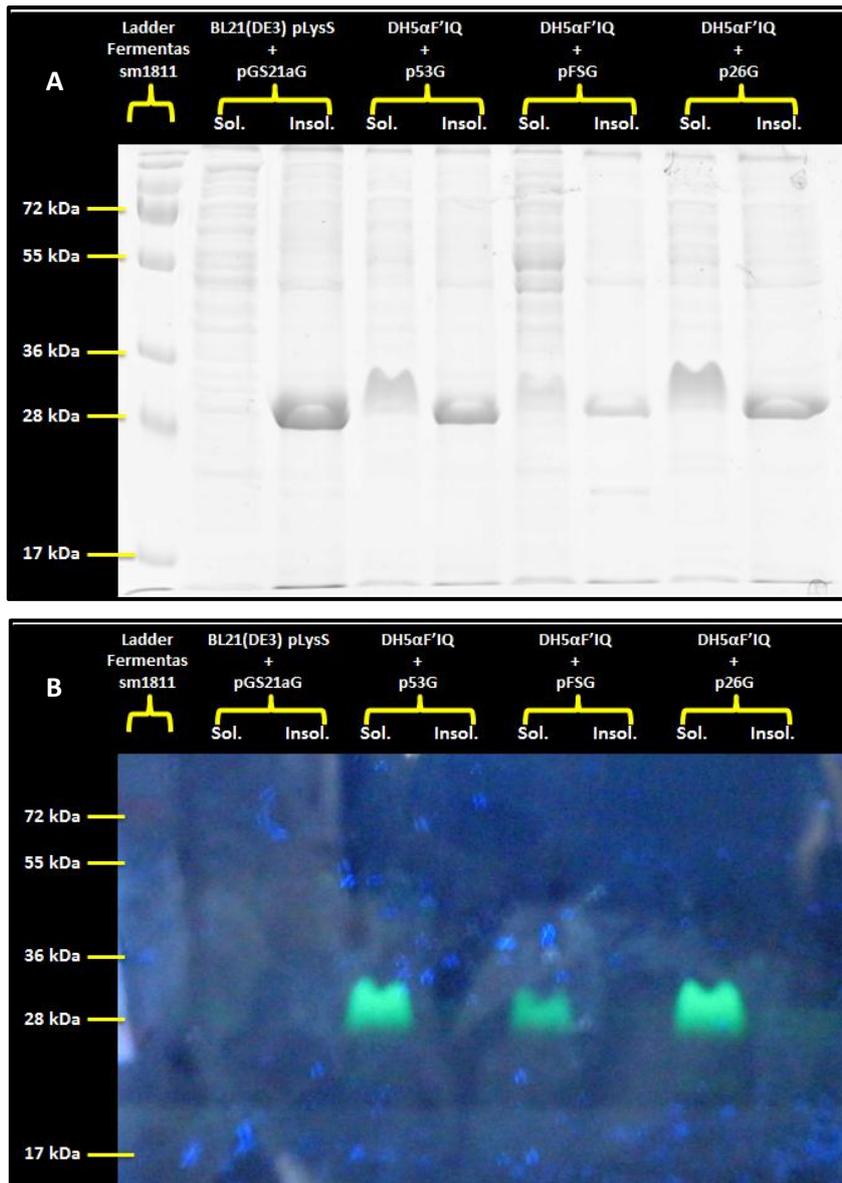


Figura 42 - Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelos clones recombinantes indicados em cada figura, após 48h de crescimento. A – Gel corado com azul de comassie. B – Gel visualizado sob luz ultravioleta (365nm), previamente à coloração com o azul de comassie.

Após obtenção dos extratos de proteínas, estes foram separadas em frações solúveis e insolúveis, conforme ilustrado e descrito na figura 42. O gel em questão contém as alíquotas do tempo final de cada experimento, tempo 48h.

Observa-se no mesmo gel que os clones recombinantes produzidos neste trabalho, contendo os vetores p26G, p53G e pFSG, e o clone recombinante controle apresentam uma banda na região de aproximadamente 27 kDa, tanto na fração solúvel como na insolúvel quando o gel é corado com o azul de *coomassie*. Entretanto, quando

observa-se o gel sob luz ultravioleta, fica evidente que a correta formação do fluoróforo na proteína verde fluorescente está relacionada a fração proteica solúvel, enquanto que mal pode-se observar fluorescência na fração insolúvel. Por outro lado, o clone recombinante utilizado como controle, BL21(DE3)pLysS + pGS21aG, apresenta uma fraca fluorescência na fração solúvel e praticamente nenhuma fluorescência na fração insolúvel.

Em consonância com os demais dados anteriores, o clone recombinante DH5 α F'IQ + p26G é o que apresenta maior intensidade de fluorescência na fração solúvel, seguido do clone recombinante DH5 α F'IQ + p53G e por último o DH5 α F'IQ + pFSG.

5.11 Microscopia de Fluorescência

Na figura 43 observa-se em A o clone recombinante DH5 α F'IQ + pUNA, o qual foi utilizado como controle para este experimento, e em B o clone recombinante DH5 α F'IQ + p26G. Fica evidente que a distribuição da proteína verde fluorescente encontra-se dispersa por todo o citoplasma. Ademais, o clone que possui o vetor p26G possui alteração de forma e alongamento citoplasmático, quando comparado ao controle.

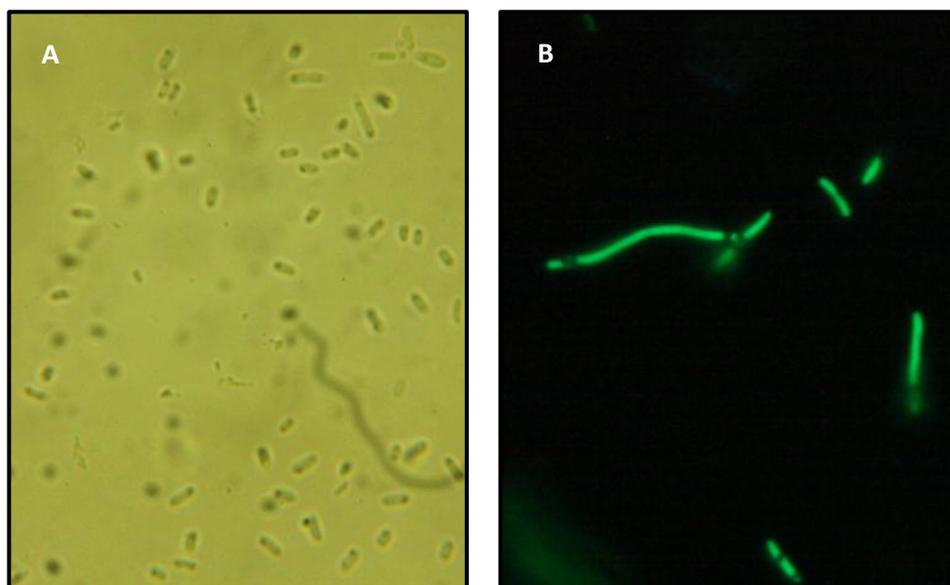


Figura 43 – Microfotografia ótica e de fluorescência. Imagens obtidas utilizando lente objetiva de 100X e óleo de imersão. A - Clone recombinante DH5 α F'IQ + pUNA (controle), observado com fonte de luz branca. B – Clone recombinante DH5 α F'IQ + p26G, observado com fonte de luz ultravioleta e conjunto de filtros para visualização da fluorescência da GFP.

A figura 44 compara a forma bacteriana e a distribuição da proteína verde fluorescente no citoplasma do clone recombinante DH5 α F'IQ + p53G frente ao clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG, o qual utiliza um vetor comercial que possui um promotor T7.

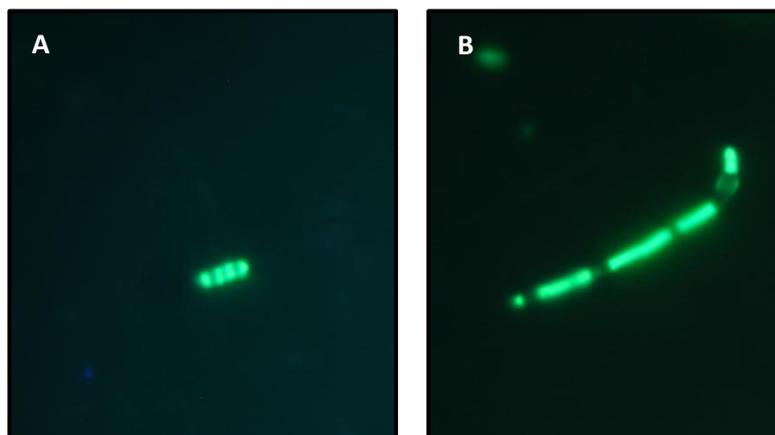


Figura 44 - Microscopia óptica de fluorescência. Imagens obtidas utilizando lente objetiva de 100X e óleo de imersão, observadas com fonte de luz ultravioleta e conjunto de filtros para visualização da fluorescência da GFP. A - Clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG. B - Clone recombinante DH5 α F'IQ + p53G.

Todos os clones recombinantes, a saber DH5 α F'IQ + p26G, DH5 α F'IQ + p53G e DH5 α F'IQ + pFSG apresentaram alteração de forma, tornando-se muito mais longos que o clone recombinante BL21(DE3)pLysS + pGS21aG.

Este fenômeno de plasticidade morfológica é também denominado de filimentação. Este processo está relacionado com a sobrevivência bacteriana quando exposta a ambientes/situações estressantes. Especificamente, é o resultado do crescimento bacteriano concomitante com a ausência de divisão celular, que resulta em um organismo alongado que possui múltiplas cópias cromossômicas. Geralmente, os fatores que levam a filimentação incluem mudanças metabólicas, dano ao DNA e alteração na estequiometria dos componentes da divisão celular (Justice, Hunstad *et al.*, 2008).

Ainda neste sentido, os vetores p26, p53 e pFS foram clonados com a sequência codificadora da ACP (β -Ketoacyl-ACP reductase), uma enzima da via dos ácidos graxos, do *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária (Karmodiya,

Srivastav *et al.*, 2005). Nesses experimentos também foram observados a filamentação da *E. coli*, durante a expressão da proteína recombinante. Desta maneira, pode-se evidenciar que os vetores de expressão construídos neste trabalho possuem relação direta com o processo de filamentação bacteriana.

Além disso, a filamentação pode ser decorrente de um desequilíbrio estequiométrico dos fatores de transcrição, especialmente o fator sigma S, que está sendo recrutado / demandado pelos promotores desenhados para os vetores de expressão aqui desenvolvidos. Este desequilíbrio do fator sigma S deve afetar a resposta ao estresse geral e a regulação dos genes de fase estacionária.

Esta plasticidade morfológica confere à bactéria maior capacidade de armazenamento da proteína recombinante expressa.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível validar experimentalmente todos os elementos que foram desenhados *in silico* para a construção dos vetores de expressão propostos neste trabalho.
- Os promotores aqui descritos para fase estacionária apresentaram uma expressão tardia em nossos experimentos.
- Quando se analisa o perfil de crescimento bacteriano dos clones recombinantes propostos neste trabalho frente ao controle e o padrão comercial, observa-se que os clones de *E. coli* contendo os plasmídeos desenvolvidos apresentam uma taxa de crescimento mais lenta.
- Analisando o perfil de expressão da proteína verde fluorescente ao termino do experimento, descrito na seção material e métodos, pode-se concluir que os clones que possuem os vetores p26 e p53 expressam a proteína recombinante com a formação correta do fluoróforo, em uma proporção três vezes maior que o padrão comercial, o qual utiliza um promotor forte (promotor T7).
- Analisando o gel de proteínas revelado com o corante azul de *coomassie*, pode-se concluir que os clones contendo os vetores p26 e p53 apresentam a maior quantidade de proteína recombinante expressa. Quando estas proteínas, presentes no gel, são analisados sob luz ultravioleta pode-se confirmar a correta formação dos fluoróforos
- O clone que possui o vetor comercial (pGS21a) apresenta uma expressão proteica da GFP proporcionalmente inferior a quantidade expressa pelos vetores p26 e p53, quando o gel de proteínas é corado com *coomassie blue*. Entretanto, quando o mesmo gel é analisado sob luz ultravioleta, percebe-se que a formação do fluoróforo está prejudicada, sendo a proporção de fluorescência ainda menor, quando comparada aos demais vetores.
- Ao analisar os clones recombinantes no microscópio de fluorescência, observa-se que os clones que possuem os vetores p26, p53 e pFS apresentam um alongamento (filamentação), resultando em um tamanho celular muito maior que o controle e o clone recombinante que possui o vetor pGS21a.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, J.; COOK, J. L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. **Anal Biochem**, v. 188, n. 2, p. 245-54, Aug 1 1990. ISSN 0003-2697 (Print)0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121064> >.

ALBERTS, B. et al. Molecular Biology of the Cell. 2002 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

AMANN, E.; BROSIUS, J.; PTASHNE, M. Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli. **Gene**, v. 25, n. 2-3, p. 167-78, Nov 1983. ISSN 0378-1119 (Print)0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6363212> >.

AZAM, T. A.; ISHIHAMA, A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from Escherichia coli. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. **J Biol Chem**, v. 274, n. 46, p. 33105-13, Nov 12 1999. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551881> >.

BARKER, M. M.; GAAL, T.; GOURSE, R. L. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. In: (Ed.). **J Mol Biol**. England: 2001 Academic Press., v.305, 2001. p.689-702. ISBN 0022-2836 (Print)0022-2836 (Linking).

BESSETTE, P. H. et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 24, p. 13703-8, Nov 23 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570136> >.

BROSIUS, J.; ERFLE, M.; STORELLA, J. Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. **J Biol Chem**, v. 260, n. 6, p. 3539-41, Mar 25

1985. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2579077> >.

BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 1, p. 57-65, Jan 2004. ISSN 1740-1526 (Print)1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035009?dopt=Citation> >.

BUCK, M. et al. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. **J Bacteriol**, v. 182, n. 15, p. 4129-36, Aug 2000. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894718> >.

BUSBY, S.; EBRIGHT, R. H. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. In: (Ed.). **Cell**. United States, v.79, 1994. p.743-6. ISBN 0092-8674 (Print)0092-8674 (Linking).

CHATTERJI, D.; OJHA, A. K. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. v. 4, n. 2, p. 160–165, 1 April 2001 2001. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00182-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00182-X) >.

CUBITT, A. B. et al. Understanding, improving and using greenfluorescentproteins. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89099-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89099-4) >.

DAY, R. N.; DAVIDSON, M. W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. **Chem Soc Rev**, v. 38, n. 10, p. 2887-921, Oct 2009. ISSN 1460-4744 (Electronic)0306-0012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19771335> >.

DE BOER, H. A.; COMSTOCK, L. J.; VASSER, M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 1, p. 21-5, Jan 1983. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6337371> >.

DEHASETH, P. L.; ZUPANCIC, M. L.; RECORD, M. T., JR. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. **J Bacteriol**, v. 180, n. 12, p. 3019-25, Jun 1998. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620948> >.

FIGGE, J. et al. Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by E. coli lac repressor in monkey cells. In: (Ed.). **Cell**. United States, v.52, 1988. p.713-22. ISBN 0092-8674 (Print)0092-8674 (Linking).

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. **Curr Protoc Protein Sci**, v. Chapter 5, p. Unit 5 24 1-29, Aug 2010. ISSN 1934-3663 (Electronic)1934-3655 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814932> >.

GAAL, T. et al. Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. **Science**, v. 278, n. 5346, p. 2092-7, Dec 19 1997. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405339> >.

GOLDSTEIN, J.; POLLITT, N. S.; INOUE, M. Major cold shock protein of Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 1, p. 283-7, Jan 1990. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404279> >.

GOULDING, C. W.; PERRY, L. J. Protein production in Escherichia coli for structural studies by X-ray crystallography. In: (Ed.). **J Struct Biol**. United States, v.142, 2003. p.133-43. ISBN 1047-8477 (Print)1047-8477 (Linking).

GOURSE, R. L.; ROSS, W.; GAAL, T. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. In: (Ed.). **Mol Microbiol**. England, v.37, 2000. p.687-95. ISBN 0950-382X (Print)0950-382X (Linking).

GREIVE, S. J.; VON HIPPEL, P. H. Thinking quantitatively about transcriptional regulation. In: (Ed.). **Nat Rev Mol Cell Biol**. England, v.6, 2005. p.221-32. ISBN 1471-0072 (Print)1471-0072 (Linking).

GRUBER, T. M.; GROSS, C. A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 441-66, 2003. ISSN 0066-4227 (Print)0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527287?dopt=Citation> >.

GUZMAN, L. M. et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. **J Bacteriol**, v. 177, n. 14, p. 4121-30, Jul 1995. ISSN 0021-9193 (Print)1098-5530 (Electronic).

HELMANN, J. D. Sigma Factors in Gene Expression. In: (Ed.). **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. ISBN 9780470015902.

HENGGE, R. Proteolysis of σ S (RpoS) and the general stress response in Escherichia coli. v. 160, n. 9, p. 667-676, November 2009 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2009.08.014> >.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 373-95, table of contents, Sep 2002. ISSN 1092-2172 (Print)1092-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208995?dopt=Citation> >.

HUANG, B.; SHI, Z.; TSAI, M. D. A small, high-copy-number vector suitable for both in vitro and in vivo gene expression. **Gene**, v. 151, n. 1-2, p. 143-5, Dec 30 1994. ISSN 0378-1119 (Print)0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7828863> >.

ISHIHAMA, A. Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 499-518, 2000. ISSN 0066-4227 (Print)0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018136?dopt=Citation> >.

JONES, P. G.; VANBOGELEN, R. A.; NEIDHARDT, F. C. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 169, n. 5, p. 2092-5, May 1987. ISSN 0021-9193 (Print)1098-5530 (Electronic).

JUSTICE, S. S. et al. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. In: (Ed.). **Nat Rev Microbiol**. England, v.6, 2008. p.162-8. ISBN 1740-1534 (Electronic)1740-1526 (Linking).

KARMODIYA, K.; SRIVASTAV, R. K.; SUROLIA, N. Production and purification of refolded recombinant *Plasmodium falciparum* beta-ketoacyl-ACP reductase from inclusion bodies. **Protein Expr Purif**, v. 42, n. 1, p. 131-6, Jul 2005. ISSN 1046-5928 (Print)1046-5928. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.02.008> >.

KORZHEVA, N. et al. A structural model of transcription elongation. In: (Ed.). **Science**. United States, v.289, 2000. p.619-25. ISBN 0036-8075 (Print)0036-8075 (Linking).

LEE, N.; FRANCKLYN, C.; HAMILTON, E. P. Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI2* activates the *araBAD* operon promoter. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 8814-8, Dec 1987. ISSN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic).

LODISH, H. et al. *Molecular Cell Biology*. 2000 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

LOEWEN, P. C. et al. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. **Can J Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 707-17, Aug 1998. ISSN 0008-4166 (Print)0008-4166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830102> >.

MARTINEZ-ANTONIO, A.; COLLADO-VIDES, J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. In: (Ed.). **Curr Opin Microbiol**. England, v.6, 2003. p.482-9. ISBN 1369-5274 (Print)1369-5274 (Linking).

MIKSCH, G. et al. The sequence upstream of the -10 consensus sequence modulates the strength and induction time of stationary-phase promoters in Escherichia coli. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 69, n. 3, p. 312-20, Dec 2005. ISSN 0175-7598 (Print)0175-7598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0016-8> >.

_____. Libraries of synthetic stationary-phase and stress promoters as a tool for fine-tuning of expression of recombinant proteins in Escherichia coli. In: (Ed.). **J Biotechnol**. Netherlands, v.120, 2005. p.25-37. ISBN 0168-1656 (Print)0168-1656 (Linking).

MIYADA, C. G.; STOLTZFUS, L.; WILCOX, G. Regulation of the araC gene of Escherichia coli: catabolite repression, autoregulation, and effect on araBAD expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 13, p. 4120-4, Jul 1984. ISSN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic).

MOONEY, R. A.; DARST, S. A.; LANDICK, R. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? **Mol Cell**, v. 20, n. 3, p. 335-45, Nov 11 2005. ISSN 1097-2765 (Print)1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16285916?dopt=Citation> >.

MURAKAMI, K. S.; MASUDA, S.; DARST, S. A. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. In: (Ed.). **Science**. United States, v.296, 2002. p.1280-4. ISBN 1095-9203 (Electronic)0036-8075 (Linking).

NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: the future looks bright. In: (Ed.). **Biochem Pharmacol**. England, v.58, 1999. p.749-57. ISBN 0006-2952 (Print)0006-2952 (Linking).

NICHOLL, D. S. T. **An Introduction to Genetic Engineering**. 3rd ed. 2008. Disponível em: < http://books.google.com.br/books/about/An_Introduction_to_Genetic_Engineering.html?hl=pt-BR&id=g1v6WMHVkTgC >.

OBERG, K. et al. Nativelike secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. **Biochemistry**, v. 33, n. 9, p. 2628-34, Mar 8 1994. ISSN 0006-2960 (Print)0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8117725> >.

PAKHOMOV, A. A.; MARTYNOV, V. I. GFP family: structural insights into spectral tuning. In: (Ed.). **Chem Biol**. England, v.15, 2008. p.755-64. ISBN 1074-5521 (Print)1074-5521 (Linking).

PEREZ-RUEDA, E.; COLLADO-VIDES, J. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in Escherichia coli K-12. In: (Ed.). **Nucleic Acids Res**. England, v.28, 2000. p.1838-47. ISBN 1362-4962 (Electronic)0305-1048 (Linking).

QING, G. et al. Cold-shock induced high-yield protein production in Escherichia coli. In: (Ed.). **Nat Biotechnol**. United States, v.22, 2004. p.877-82. ISBN 1087-0156 (Print)1087-0156 (Linking).

ROSS, W.; ERNST, A.; GOURSE, R. L. Fine structure of E. coli RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. **Genes Dev**, v. 15, n. 5, p. 491-506, Mar 1 2001. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238372> >.

SCHNEIDER, D. A.; ROSS, W.; GOURSE, R. L. Control of rRNA expression in Escherichia coli. In: (Ed.). **Curr Opin Microbiol**. England, v.6, 2003. p.151-6. ISBN 1369-5274 (Print)1369-5274 (Linking).

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. **J Cell Comp Physiol**, v. 59, p. 223-39, Jun 1962. ISSN 0095-9898 (Print)0095-9898 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13911999> >.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. In: (Ed.). **J Mol Biol**. England, v.189, 1986. p.113-30. ISBN 0022-2836 (Print)0022-2836 (Linking).

STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol**, v. 185, p. 60-89, 1990. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199796> >.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 509-44, 1998. ISSN 0066-4154 (Print)0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759496> >.

TSUJIKAWA, L.; TSODIKOV, O. V.; DEHASETH, P. L. Interaction of RNA polymerase with forked DNA: Evidence for two kinetically significant intermediates on the pathway to the final complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 3493-8, Mar 19 2002. ISSN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic).

UGRINOV, K. G.; CLARK, P. L. Cotranslational folding increases GFP folding yield. In: (Ed.). **Biophys J**. United States: 2010 Biophysical Society. Published by Elsevier Inc, v.98, 2010. p.1312-20. ISBN 1542-0086 (Electronic)0006-3495 (Linking).

VASINA, J. A.; BANEYX, F. Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major Escherichia coli cold shock promoter cspA. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, n. 4, p. 1444-7, Apr 1996. ISSN 0099-2240 (Print)1098-5336 (Electronic).

VINCENTE LLI, R. et al. Medium-scale structural genomics: strategies for protein expression and crystallization. **Acc Chem Res**, v. 36, n. 3, p. 165-72, Mar 2003. ISSN 0001-4842 (Print)0001-4842 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12641473> >.

WALDO, G. S. et al. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. **Nat Biotechnol**, v. 17, n. 7, p. 691-5, Jul 1999. ISSN 1087-0156 (Print)1087-0156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404163> >.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2006. In: (Ed.). **Nat Biotechnol.** United States, v.24, 2006. p.769-76. ISBN 1087-0156 (Print)1087-0156 (Linking).

WEBER, H. et al. Genome-wide analysis of the general stress response network in Escherichia coli: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. In: (Ed.). **J Bacteriol.** United States, v.187, 2005. p.1591-603. ISBN 0021-9193 (Print)0021-9193 (Linking).

WELSH, S.; KAY, S. A. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. In: (Ed.). **Curr Opin Biotechnol.** England, v.8, 1997. p.617-22. ISBN 0958-1669 (Print)0958-1669 (Linking).

WILSON, K. S.; VON HIPPEL, P. H. Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 19, p. 8793-7, Sep 12 1995. ISSN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic).

WOOD, K. V. Marker proteins for gene expression. In: (Ed.). **Curr Opin Biotechnol.** England, v.6, 1995. p.50-8. ISBN 0958-1669 (Print)0958-1669 (Linking).

WOSTEN, M. M. Eubacterial sigma-factors. In: (Ed.). **FEMS Microbiol Rev.** Netherlands, v.22, 1998. p.127-50. ISBN 0168-6445 (Print)0168-6445 (Linking).

YIN, J. et al. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. In: (Ed.). **J Biotechnol.** Netherlands, v.127, 2007. p.335-47. ISBN 0168-1656 (Print)0168-1656 (Linking).

ZHANG, G. et al. Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. In: (Ed.). **Cell.** United States, v.98, 1999. p.811-24. ISBN 0092-8674 (Print)0092-8674 (Linking).

ZHANG, Y. B. et al. Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge. In: (Ed.). **Protein Expr Purif**. United States, v.36, 2004. p.207-16. ISBN 1046-5928 (Print)1046-5928 (Linking).

8 APÊNDICE A

Tabela 09 – Descrição da reação enzimática e condições reacionais para avaliação da presença do sítio de *NdeI* no vetor pUN.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pUN (200ng)	2 µL	37°C	1 h 30 min
BSA 10X (1µg/ µL)	1 µL		
<i>NdeI</i> (20U/ µL)	1 µL		
Tampão NEB3 10X	1 µL		
H ₂ O	5 µL		
Volume Total	10 µL		

Tabela 10 – Descrição da reação enzimática e condições reacionais para eliminação do sítio de *NdeI* no vetor pUN.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pUN (200ng)	1 µL	12°C	0,5 h
Tampão NEB2 10X	1 µL		
dNTP _(s) 25mM	2 µL		
T4 DNA Pol 3U/ µL	1 µL		
H ₂ O	5 µL		
Volume Total	10 µL		

Tabela 11 – Descrição da reação enzimática e condições reacionais para ligação das extremidades do vetor pUN, após modificações.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pUN (100ng)	1 µL	16°C	16 h
T4 DNA Ligase (20U/µL)	0,5 µL		
Tampão Ligase 10X	0,5 µL		
H ₂ O	3 µL		
Volume Total	5 µL		

Tabela 12 – Descrição da reação enzimática e condições reacionais para inserção do polylinker A no vetor pUNA.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pUNA (100 ng)	1 µL	16°C	16 h
Polylinker A (1 µg)	3 µL		
T4 DNA Ligase (20U/ µL)	0,5 µL		
Tampão Ligase 10X	0,5 µL		

H ₂ O	5 µL		
Volume Total	10 µL		

Tabela 13 - Descrição da reação enzimática e condições reacionais para digestão dos cassetes de expressão sintetizados.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pBSK (400ng)	2 µL	37°C	2 h
BSA 10X (1ug/ µL)	1 µL		
<i>NotI</i> (10U/ µL)	1 µL		
Tampão NEB3 10X	1 µL		
H ₂ O	5 µL		
Volume Total	10 µL		

Tabela 14 - Descrição da reação enzimática e condições reacionais para linearização do vetor pUNA, utilizando a enzima *NotI*.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pUNA (200ng)	2 µL	37°C	2 h
BSA 10X (1ug/ µL)	1 µL		
<i>NotI</i> (10U/ µL)	1 µL		
Tampão NEB3 10X	1 µL		
H ₂ O	5 µL		
Volume Total	10 µL		

Tabela 15 - Descrição da reação enzimática e condições reacionais para defosforilação das extremidades 5' do vetor pUNA.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pUNA linear (100ng)	1 µL	37°C	1 h
SAP (1U/ µL)	1 µL		
Tampão SAP 10X	2 µL		
H ₂ O	16 µL		
Volume Total	20 µL		

Tabela 16 - Descrição da reação enzimática e condições reacionais para inserção do cassete de expressão no vetor pUNA.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pUNA linear (100ng)	1 µL	16°C	16 h
Cassete de expressão (300ng)	3 µL		

T4 DNA Ligase (20U/ μ L)	1 μ L		
Tampão T4 10X	1 μ L		
H ₂ O	4 μ L		
Volume Total	10 μ L		

Tabela 17 - Descrição da reação enzimática e condições reacionais para avaliação da inserção dos cassetes de expressão.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pUNA+k7s (200ng)	2 μ L	37°C	2 h
BSA 10X (1ug/ μ L)	1 μ L		
<i>NotI</i> (10U/ μ L)	1 μ L		
Tampão NEB3 10X	1 μ L		
H ₂ O	5 μ L		
Volume Total	10 μ L		

Tabela 18 - Descrição da reação enzimática e condições reacionais para digestão da sequência codificadora da GFP

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pBSK-GFP (200ng)	2 μ L	37°C	2 h
BSA 10X (1ug/ μ L)	1 μ L		
<i>NdeI</i> (20U/ μ L)	1 μ L		
<i>BamHI</i> (20U/ μ L)	1 μ L		
Tampão NEB4 10X	1 μ L		
H ₂ O	4 μ L		
Volume Total	10 μ L		

Tabela 19 - Descrição da reação enzimática e condições reacionais para inserção da sequência codificadora da GFP nos vetores p26, p53 e pFS.

Reação Enzimática			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor p26/p53/pFS linear (100ng)	1 μ L	16°C	16 h
Gene da GFP (300ng)	3 μ L		
T4 DNA Ligase (20U/ μ L)	1 μ L		
Tampão T4 10X	1 μ L		
H ₂ O	4 μ L		
Volume Total	10 μ L		