

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Construção de vetores de expressão em *Escherichia coli* com
promotores termorreguláveis de *Chromobacterium violaceum*

Renan Venicius Pinzon da Silva

Manaus

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0054/2010

Construção de vetores de expressão em *Escherichia coli* com promotores termorreguláveis de *Chromobacterium violaceum*

Relatório final das atividades realizadas no período de 08/10 a 06/11 pelo aluno Renan Venicius sob a orientação do Dr. Edmar Vaz de Andrade.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Bolsista Cnpq: Renan Venicius Pinzon da Silva

Manaus

2011

Sumário

Introdução	4
Objetivos	7
Geral	7
Específicos	7
Metodologia	8
Linhagens celulares	8
Construção do vetor de expressão Termorregulável	8
Resultados anteriores	8
Preparo de plasmídio recombinante	11
Seqüenciamento nucleotídico das regiões promotoras clonadas	11
Clonagem das regiões promotoras em vetores e expressão caça-promotor	11
Análise da atividade do promotor de termorregulável <i>C. violaceum</i> em <i>E. coli</i>	12
Resultados obtidos/esperados	13
Conclusões e Perspectivas	17
Cronograma de atividades	19
Referências	20
Anexos	22

1. Introdução

Promotores são seqüências de nucleotídeos capazes de interagir com a enzima RNA polimerase e direcionar a transcrição de segmentos adjacentes ao DNA. Em organismos procariotos, estes promotores são reconhecidos pela subunidade σ (sigma) da RNA polimerase promovendo a expressão de um determinado gene, pois permite a ligação estável ao DNA e em sítios específicos (NELSON & COX, 2006).

Na bactéria *E. coli*, observa-se a presença de fatores σ alternativos em resposta a alterações ambientais. Os fatores σ (Figura 3) são denominados de acordo com a massa molecular ou com o respectivo gene que os codificam. Dentre os mais estudados, tem-se o fator σ^{70} (expresso em condições fisiológicas normais de transcrição, proveniente do gene *rpoD*), σ^{32} (expresso em condições de choque térmico, proveniente do gene *rpoH*), σ^{54} (expresso em condições de privação de nitrogênio, quando a amônia está ausente no meio), dentre outros (LEWIN, 2001). Portanto, promotores que são induzidos em resposta a um aumento ou diminuição de temperatura são denominados de promotores termorreguláveis. Esses promotores reguláveis são essenciais na análise da função de genes em estudos de expressão gênica em que estes promotores são ativados (ou reprimidos) sendo que a atividade destes é avaliada de acordo com a taxa de expressão do seu produto gênico (SCHOFIELD *et al.*, 2003).

Quando uma célula é submetida a altas temperaturas, ocorre a síntese de diversas proteínas de choque térmico (*Hsp – Heat shock proteins*). A resposta de choque térmico é uma reação conservada nas células (FEDER & HOFMANN, 1999) e em diferentes organismos (YURA *et al.*, 1993). Proteínas sintetizadas em resposta a altas temperaturas são proteínas de choque térmico chamado (HSP) e sua indução aparece como uma reação universal de proteção ocorrendo em todos os organismos variando de procaríoto aos seres humanos (Lindquist, 1986; Wu, 1995; Gupta *et al.*, 2010). Entre outras contribuições, estes estudos têm fornecido evidências que sugerem que a existência de um sistema geral de resposta que o estresse pode ser ativado por vários fatores e, após ativação, proteger as células contra uma série de condições que põem em perigo a sua sobrevivência (Mager e Varela, 1993 ; Parsell e Lindquist, 1994).

Em *Drosophila sp.*, o promotor *Hsp70* é o mais estudado e utilizado em experimentos sob controle da temperatura (PELHAM & BIENZ, 1982). Dentre os trabalhos envolvendo o promotor de choque térmico *Hsp70* de *Drosophila sp.*, CADORET *et al.* (1997) realizaram experimentos com a ostra *Crassostrea gigas*, utilizando este promotor ligado a um gene repórter codificante para a enzima luciferase. Neste trabalho, estágios embrionários da ostra (oócitos e zigotos) e a fase larval foram bombardeados (por biobalística) com os plasmídeos recombinantes e submetidos a diferentes temperaturas. Os pesquisadores obtiveram como resultados uma maior atividade enzimática da luciferase quando esses embriões eram submetidos a uma temperatura de 40°C, indicando assim que a expressão do gene codificador para a luciferase era maior sob tal condição. Portanto, esse estudo comprovou que a temperatura é um indutor da expressão do gene repórter, caracterizando tal promotor como termorregulável.

A produção de proteínas heterólogas em células bacterianas é fundamental para o desenvolvimento de diversos produtos para uso humano ou veterinário, como vacinas, reagentes para diagnósticos, anticorpos recombinantes e outras proteínas com fins terapêuticos e comerciais. Assim, além de mudanças nas condições de cultivo celular como temperatura de incubação ou a adição de compostos nos meios de cultura, a engenharia de

vetores para expressão heteróloga é uma importante ferramenta para que haja uma melhora nos níveis de produção de proteínas com interesse biofarmacológico e industrial.

Um vetor é um fragmento de DNA manipulado e modificado utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante. Quando ele se presta á expressão em células bacterianas deve conter os seguintes elementos fundamentais para produção da proteína de interesse: **i)** um promotor que é uma região não-transcrita do plasmídio onde se organizará o complexo de iniciação da transcrição, composto pela RNA polimerase e seus fatores acessórios; **ii)** uma região denominada de Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC), compostas por uma serie de sítios para enzimas de restrição próprias para clonagem do gene de interesse; **iii)** um sinal de poliadenilação (caso o gene clonado seja de origem eucariótica), que é uma sequência que permitirá a adição de uma serie de resíduos de adenina na região 3' do RNA mensageiro (mRNA) correspondente a proteína de interesse, fazendo com que este fique estável na região hospedeira, sendo também um sinal terminador da transcrição; e finalmente: **iv)** uma origem de replicação e uma marca de seleção para facilitar a propagação do plasmídio (vetor) e a obtenção de grande quantidade do DNA plasmidial, fundamental para manipulação e a posterior inserção em células de bactérias. Estes vetores podem ainda possuir um gene de resistência a alguma marca de seleção que permita a produção e o isolamento de clones estáveis em células bacterianas (KUCHERLAPATI, R.; SKOULTCHI, 1984). Assim, diversos vetores comerciais para expressão foram desenvolvidos, tendo como arcabouço os componentes básicos acima descritos necessários para a produção de proteínas recombinantes. Entretanto, apesar de toda a tecnologia e de todas as inovações nesta área, a produção de proteínas recombinantes com fins terapêuticas, farmacológicos e comerciais ainda é um processo caro e laborioso.

Portanto, o objetivo deste trabalho consiste em construir vetores de expressão com sequências promotoras previamente identificadas de *C. violaceum* e reguladas pela temperatura, para assim utilizá-los em processos biotecnológicos, como uma alternativa de expressão heteróloga de proteínas. Com isso, há a diminuição do custo na expressão de uma proteína

recombinante e facilidade na execução desta etapa, já que a provável expressão seria regulada com a alteração de temperatura e não seriam utilizados indutores químicos, que geralmente tem um elevado custo financeiro. Adicionalmente, o desenvolvimento de vetores de expressão com promotor regulável por temperatura será importante por minimizar o efeito tóxico da expressão heteróloga para a hospedeira, uma vez que este é um fator limitante para a produção de proteínas recombinantes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Construir um vetor de expressão em *E. coli* com promotor termorregulável.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a sequência nucleotídica do promotor do gene *phasin*;
2. Subclonar o promotor do gene *phasin* de *C. violaceum* (P_*phasin*) no vetor pKK232-8 (Amersham);
3. Analisar a atividade promotora do P_*phasin* em *E. coli*.

3. Metodologia

3.1 Linhagens celulares

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens celulares de *E. coli* XL1-blue (Stratagene) e/ou TOP10 (Invitrogen), para o preparo de plasmídio recombinante; *E. coli* DH5aF'lq (Invitrogen) foi utilizada em sistemas de expressão recombinante para verificar a atividade do promotor derivado de *C. violaceum*.

3.2 Construção do vetor de expressão termorregulável

3.2.a Resultados anteriores (Andrade, E. V., resultados não publicados) que não correspondem às atividades propostas pelo o projeto identificado por PIB-B/0054/2010:

A região promotora do gene *phasin* foi isolada do DNA genômico de *C. violaceum* por PCR utilizando iniciadores específicos e clonados no vetor pGEMT- Easy (PROMEGA), obtendo-se o vetor recombinante pGRP_phasin (resultados anteriores, dados não publicados – Andrade, E. V.). Resumidamente, para identificação da região promotora do gene *phasin*, fez-se o uso dos dados publicados na anotação do genoma de *C. violaceum*, disponível em <http://www.brgene.Incc.br/cviolaceum/>. Nesta página, todas as ORFS anotadas de *C. violaceum* já possuem suas regiões promotoras identificadas, além de outras informações como detalhes da ORF, banco de dados utilizados para comparação das seqüências genômicas, resultados de BLAST, dentre outras. A seqüência promotora do gene codificador para *Phasin* (CV1366), obtidas como descrito acima foram submetidas às análises para desenho de iniciadores específicos. Os iniciadores específicos utilizados para amplificar a região correspondente ao promotor (Tabela 1) foram obtidos por síntese química a partir da seqüência nucleotídica do promotor depositada no banco de dados (<http://brgene.Incc.br/cviolaceum/>). Na extremidade 5' de cada

iniciador, foram inseridos sítios para endonucleases de restrição específicos para possibilitar a subclonagem do promotor no vetor pKK232-8 (AMERSHAM BIOSCIENCE).

Tabela 1. Iniciadores específicos para o promotor do gene *phasin* de *C. violaceum*. As regiões em destaque (sublinhadas) representam sítios específicos para a enzima de restrição *Bam* HI (*Foward*) e *Hind* III (reverso).

Nome do gene	Iniciador <i>Forward</i> (5'-3')	Iniciador <i>Reverse</i> (5'-3')
<i>phasin</i>	CG <u>GGATCCC</u> GCATCCCCCAAAGTAATGTAGG	CCCAAGCTTGGTGTA ^{AA} ACCTCCATTACGTG

O promotor do gene *phasin* foi amplificado por PCR com desnaturação inicial (95 °C/2 min), 30 x (95 °C/40 seg, 59 °C/40 seg e 72 °C/1 min) e 72 °C/5 min utilizando o seguinte sistema de reação:

Tabela 2. Preparo do sistema de reação para amplificar o promotor do gene *phasin*. *Promega®.

Reagentes do sistema	Volume / reação
Água	9,8 µL *
*Tampão 5X sem MgCl ₂	5 µL
*MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µL
*dNTPs (10 mM)	0,5 µL
Iniciador <i>Forward</i> (5pmoles/µl)	1,0 µL
Iniciador Reverso (5pmoles/µl)	1,0 µL
*Taq (5U/µL)	0,3 µL
DNA (10 ng)	5,0 µL
Volume Total	25,0 µL

O fragmento amplificado (promotor) foi purificado a partir de gel de agarose e clonado em vetores de clonagem de produto de PCR pGEM-T Easy (Figura 1) (PROMEGA®) na presença de T4 DNA ligase, mantendo relação 3:1 (inserto:vetor). O sistema de clonagem foi utilizado para transformar células bacterianas *E. coli* (TOPO-10 INVINTROGEN) eletrocompetentes, seguido de seleção com ampicilina 200 µg/mL, IPTG e X-Gal. Os clones selecionados (colônias brancas) foram utilizados para extração de DNA plasmidial e análise por perfil de restrição (endonuclease *EcoRI*) e por seqüenciamento nucleotídico. O vetor recombinante obtido nesta etapa foi denominado por pGRP_Phasin, correspondendo ao pGEM-T-Easy com região promotora do gene *phasin*.

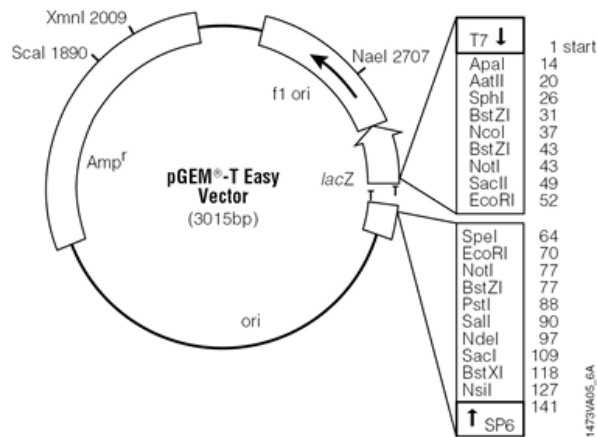


Figura 1. Vetor pGEM-T Easy. Em destaque é mostrado a região de múltiplos sítios de clonagem, onde é inserido o produto de PCR (PROMEGA®).

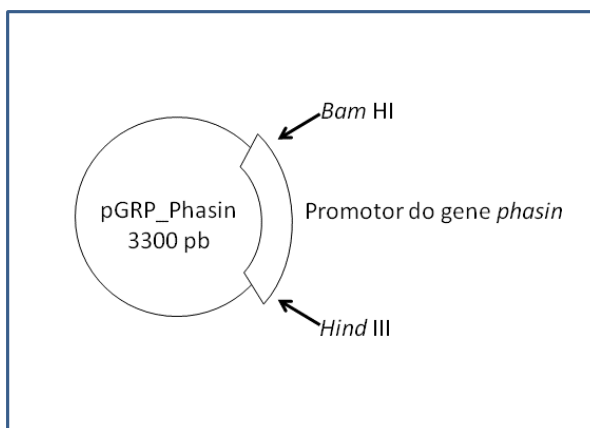


Figura 2. Vetor pGRP_Phasin. Em destaque é mostrado os dois sítios de restrição para clonagem flanqueando o promotor do gene *phasin*, que foram adicionados durante o isolamento gênico (Andrade, E. V., dados não publicados).

3.2.b Preparo de plasmídio recombinante:

Para preparo de DNA plasmidial, os clones de pGRP_Phasin foram inoculados em meio LB líquido com ampicilina 100 µg/mL e cultivados por 16 horas a 37°C sob agitação. Seguiu-se então a extração de DNA plasmidial para isolar os plasmídeos recombinantes. Estes plasmídeos foram submetidos à análise por perfil de restrição para confirmar a presença do inserto. Para esta análise utilizou-se a enzima *Eco* RI que flanqueia a região promotora clonada. Esse resultado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.c Seqüenciamento nucleotídico das regiões promotoras clonadas

Os clones recombinantes obtidos foram seqüenciados pelo método Sanger *et al.*(1977), utilizando-se seqüenciadores de DNA de alta performance tipo MEGABACE (Anexo 1). Para a reação de seqüenciamento foram utilizados iniciadores específicos para o vetor (T7 e SP6 (PROMEGA)). Foram realizadas análises de alinhamento em banco de dados para verificar a acuracidade do procedimento de isolamento e clonagem, comparando-se com a sequência genômica de *C. violaceum* disponível em banco de dados (NCBI).

3.2.d Clonagem das regiões promotoras em vetores de expressão caça-promotor

A partir dos plasmídeos recombinantes obtidos como descrito (3.2.b), foram feitas digestões enzimáticas do vetor pGRP_phasin com enzimas de restrição específicas para liberação da sequência promotora (*Bam* HI e *Hind* III), para posterior subclonagem no vetor pKK232-8 (Figura 3) (Amersham®), submetido ao mesmo tratamento por perfil de restrição. Os sistemas para tratamento com endonucleases de restrição foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8%. As bandas correspondentes ao promotor do gene *phasin* e ao vetor pKK232-8 linearizado foram purificadas do gel utilizando o *kit GFX Band prep* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. O sistema purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificado

para se proceder às etapas de subclonagem. Para o preparo do sistema de ligação, o fragmento e o vetor linear foram misturados na proporção de 3:1 (3 moléculas de inserto:1 molécula de vetor). O sistema foi submetido à ligação com a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc.), por 16 horas a 16°C. Após ligação, o sistema foi utilizado para transformação de células *E. coli* TOPO10 (Invitrogen) eletrocompetentes, seguido de seleção em meio LB/Agar com ampicilina 200µg/mL. Após seleção, os clones foram inoculados em meio LB líquido com ampicilina 100µg/mL e cultivados por 16 horas a 37°C sob agitação (180rpm). Seguiu-se então a extração de DNA plasmidial para isolar os plasmídeos recombinantes. Estes plasmídeos foram submetidos a análises por perfil de restrição para confirmar a presença da região promotora.

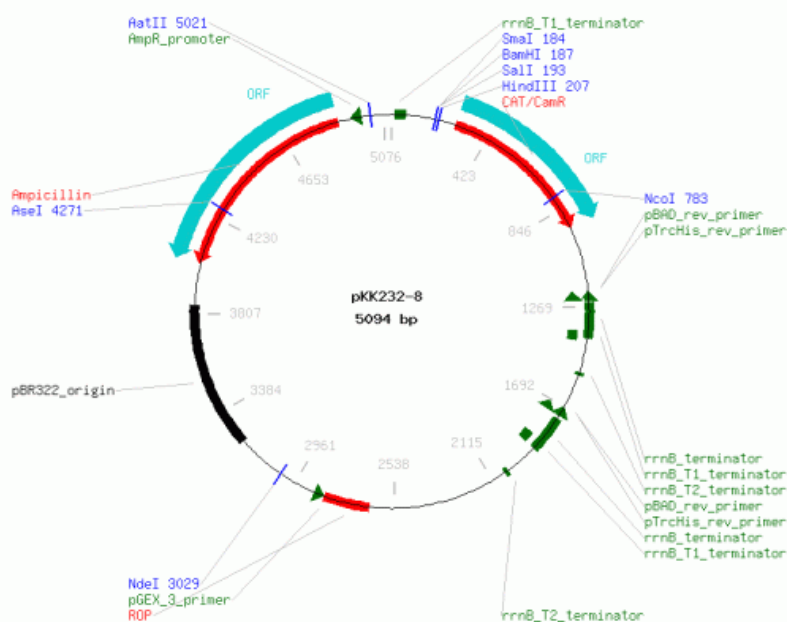


Figura 3. Vetor caça promotor pKK232-8. Em destaque o gene CAT/CamR, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol, destituído de promotor (Amersham®).

3.2.d. Análise da atividade do promotor de termorregulável *C.*

violaceum em *E. coli*

O vetor recombinante foi inserido por eletroporação em células *E. coli* DH5aF'lq (Invitrogen®) seguido de seleção em placas contendo meio LB/Agar

com ampicilina (200µg/mL). A análise da região promotora clonada foi realizada por um sistema de *replica plate*, sendo cada clone repicado em uma placa (LB/Agar) contendo ampicilina (100µg/mL) e placas (LB/Agar) contendo cloranfenicol (10µg/mL). Nesse sistema de seleção, o crescimento das colônias recombinantes foi feito em quatro diferentes temperaturas: 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. Como controle desse crescimento, os mesmos clones foram plaqueados em meio contendo ampicilina. A partir da placa contendo cloranfenicol (10µg/mL) os clones foram novamente repicados para um conjunto de placas contendo ampicilina (100µg/mL) ou cloranfenicol nas seguintes concentrações (10µg/mL, 20µg/mL e 34µg/mL).

4.Resultados obtidos

4.1.a Preparo de plasmídio recombinante:

Na figura 4 são mostrados os resultados obtidos por extração de DNA plasmidial. O rendimento foi de aproximadamente 40ng/µL (pKK232-8, amostra 1), 60ng/µL (pKK232-8, amostra 2) e 80ng/µL (pGRP_phasin clone 9).

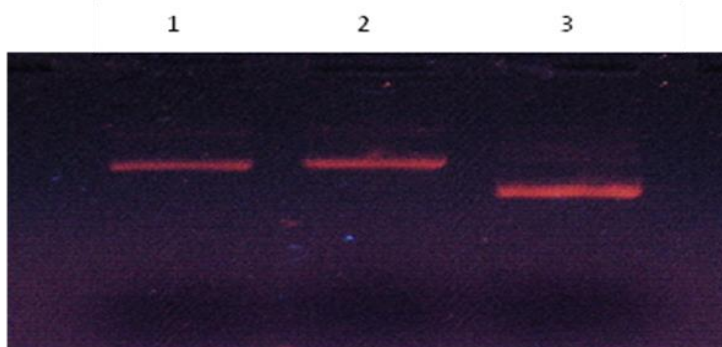


Figura 4. Perfil eletroforetico de vetores recombinantes. Para cada preparação de vetor foram utilizados 5µL de amostra, sendo analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A visualização foi realizada por coloração com brometo de etidio seguido de exposição a luz UV. 1- pKK232-8 amostra 1; 2- pKK232-8 amostra 2 ; 3 – pGRP_phasin clone 9.

O fragmento gênico clonado teve a estrutura linear confirmada por seqüenciamento nucleotídico (Figura 5). Após comparação da seqüência nucleotídica obtida com o banco de dados, seguido de alinhamento com o promotor do gene *phasin*, foi confirmado que o fragmento gênico clonado corresponde ao promotor do gene *phasin* de *C. violaceum*. Como pode ser

observado na figura 5 em destaque (sublinhado), os sítios para as endonucleases de restrição *Bam* HI e *Hind* III foram adicionados nas extremidades 5' e 3', respectivamente, do fragmento recombinante. A análise utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool – BLAST*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) não foi realizada, porque o fragmento clonado possui somente cerca de 300 pb, o que acarretaria em resultados com baixa confiabilidade.

```

ALINHAMENTO PHASINA
>PHASIN
ATCCCCAAAGTAATGTAGGAAC TGGTGGCGGTA
TCGTACAGACGGCGGTTTCGGGTACTTCTTGATGACCCGTTTCTCAACACTCATTAAACGC
TCCTGGTTTATCTTCGTGGTGTGTTGTCGCTGGCAATCTAACATAAA TACAACAGACTAG
GCAAATCTTCTACCCCTCAGCGCCCTGTGCTACA TTTACGCGTCATTGTGCGGCGCA
CAATACCCCTCAACGGAACACAGTCGGACCCCATTTCCACGTAATGGAGGTTTTACACC

>G9_inv_complementar
GGATCCCGCATCCCCAAAGTAATGTAGGAAC TGGTGGCGGT
ATCGTACAGACGGCGGTTTCGGGTACTTCTTGATGACCCGTTTCTCAACACTCATTAAACGC
CTCCTGGTTTATCTTCGTGGTGTGTTGTCGCTGGCAATCTAACATAAA TACAACAGACTAG
AGCAAATCTTCTACCCCTCAGCGCCCTGTGCTACA TTTACGCGTCATTGTGCGGCGC
ACAAATCCCTCAACGGAACACAGTCGGACCCCATTTCCACGTAATGGAGGTTTTACAC
CAAGCTT
>H9
CACCGAGACACAGCATNACGACAGAGTAGCTCAGCGTCAGCTATTGGTACTGAGGCCGGTACTATGACGGGATCGATCCCCAAGTATGTAGC
TGTGGGGTC
GCAGACGGGGCGGGTATCTGATGACCGGGTCCACACCAATTACGCCCTGTTAAATCTCGTGGTGTGGCTGGCAATCTACATAATTACAACAG
ATAGAGCAATTCTTACACCCCTCAGCGCCCTGTGTTAAITTTACGCGTCATTGTGCGGGC
ACAATACCCCTCAACGGAACACAGCGGCCGCCCATTTCCA CGTAATGGAGGT TTACA CCAAGCTTGG

PHASIN          -----ATCCCCAAAGTAATGTAGGAAC TGGTGGCGGTA TCGTACAGACGGCGGTT 51
G9_inv_complementar  GGATCCCGCATCCCCAAAGTAATGTAGGAAC TGGTGGCGGTTATCGTACAGACGGCGGTT 60
*****
PHASIN          CCGGTACTTCTTGATGACCCGTTTCTCAACACTCATTAAACGCTCCTGCTTATCTTCGT 111
G9_inv_complementar  CCGGTACTTCTTGATGACCCGTTTCTCAACACTCATTAAACGCTCCTGCTTATCTTCGT 120
*****
PHASIN          GGTCTTGTCGCGTGCATCTAACATAAA TACAACAGACTAGAGCAAATCTTCTACCCCT 171
G9_inv_complementar  GGTCTTGTCGCGTGCATCTAACATAAA TACAACAGACTAGAGCAAATCTTCTACCCCT 180
*****
PHASIN          CCTCAGCGCCCTGTGCTACATTACCGCTCATGTCGGGGCCACAATACCCCTCAACGGA 231
G9_inv_complementar  CCTCAGCGCCCTGTGCTACATTACCGCTCATGTCGGGGCCACAATACCCCTCAACGGA 240
*****
PHASIN          ACACAGTGGACCCCATTTCCACGTAATGGAGGTTTACACC----- 274
G9_inv_complementar  ACACAGTGGACCCCATTTCCACGTAATGGAGGTTTACACCAGCTT 289
*****

```

Bam H1- GGATCC
Hind - AAGCTT

Figura 5. Alinhamento da sequência do promotor recombinante do gene *phasin*. Alinhamento do da sequência nucleotídica obtida para o promotor recombinante do gene *phasin* com a sequência disponível em banco de dados. Para o alinhamento foi utilizada somente a sequência da reação em G9_inv_complementar. A reação em H9, por conter uma grande quantidade de bases com baixa confiabilidade, não foi utilizada para o alinhamento. *Phasin*: sequência do promotor do gene *phasin* disponível em banco de dados. As bases sublinhadas indicam sítios para enzimas de restrição.

4.1.b Clonagem das regiões promotoras em vetores de expressão caça-promotor:

Na figura 6 são mostrados os resultados obtidos por análise de restrição (*Bam* HI e *Hind* III) dos vetores pGRP_phasin e pKK232-8. Para o vetor pGRP_phasin (clone 9) foi visualizado um fragmento de aproximadamente 300

pb (Figura 6, poço 5), de acordo com o esperado, que corresponde ao promotor do gene *phasin*. Para o vetor pKK232-8, como os sítios para ambas enzimas se localizam na região de múltiplas clonagens, não foi visualizada liberação de inserto, sendo detectado somente o vetor linearizado. Na figura 7 são mostrados os resultados obtidos após a purificação do vetor pKK232-8 linearizado e do fragmento gênico. Como pode ser observado pelos resultados de purificação, o rendimento de promotor do gene *phasin* foi muito baixo. O mesmo resultado se repetiu em várias outras repetições, bem como para a purificação de outros fragmentos com tamanho aproximado (Andrade, E. V., comunicação pessoal).

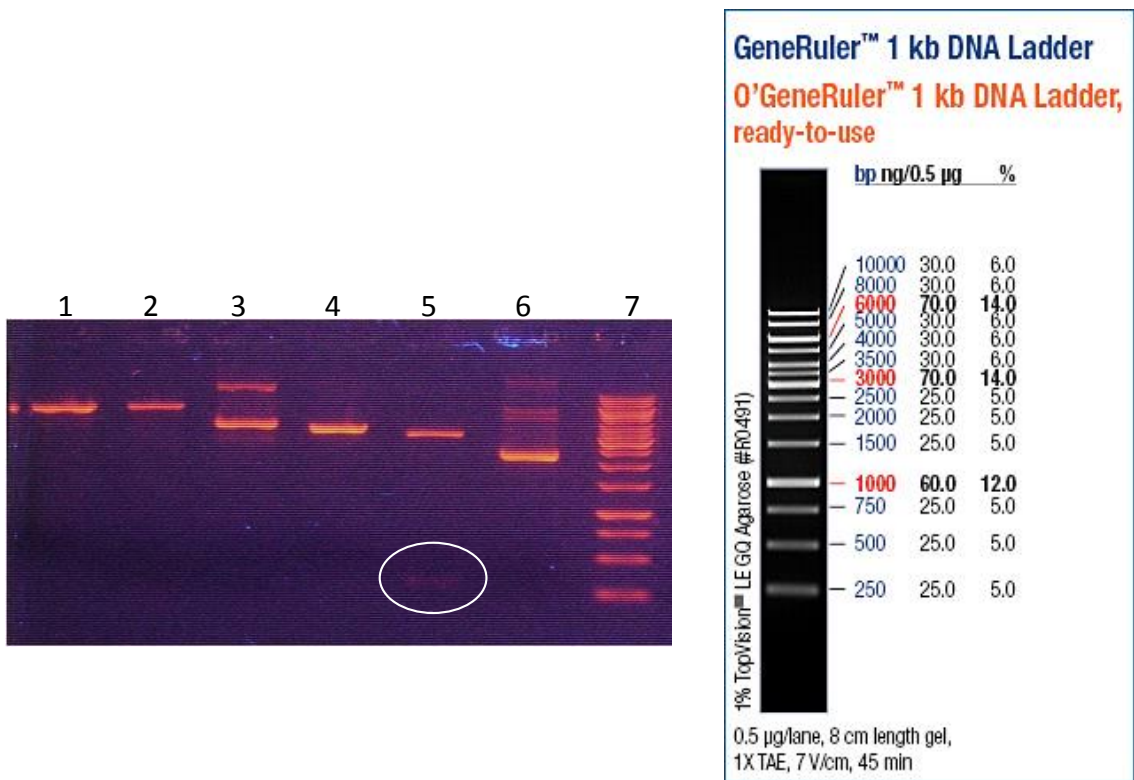


Figura 6. Análise dos vetores recombinantes por perfil de restrição. 1- pKK232-8 *Bam* HI; 2 – pKK232-8 *Bam* HI/*Hind* III; 3 – pKK232-8 não digerido; 4 – pGRP_phasin clone 9 *Bam* HI; 5 – pGRP_phasin clone 9 *Bam* HI/*Hind* III; 6 – pGRP_phasin clone 9 não digerido; 7- marcador (1 kb DNA ladder - Fermentas®).

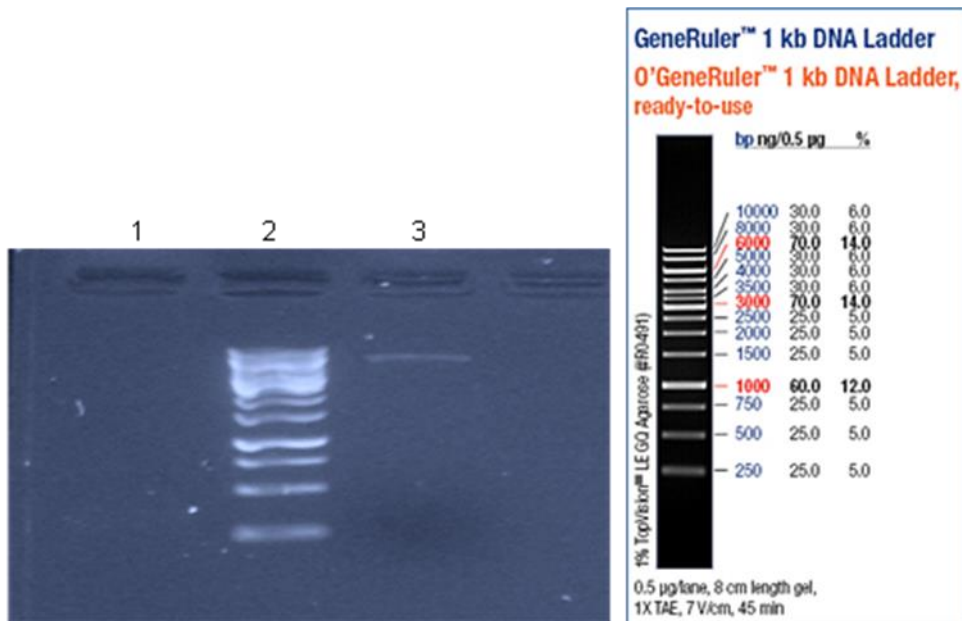


Figura 7. Análise de DNA purificado . 1-Promotor do gene *phasin*; 2- marcador (1 kb DNA ladder - Fermentas®); 3-pKK232-8 linearizado com

Embora tenham sido realizadas sucessivas repetições de sub-clonagem do promotor do gene *phasin* no vetor pKK232-8, não foram obtidos clones recombinantes. Este procedimento foi dificultado, em parte, pelo baixo rendimento do fragmento gênico correspondente ao promotor de *phasin* liberado do vetor pGP_*phasin*, como discutido acima. Desta forma, durante o preparo do sistema de ligação (sub-clonagem) do inserto ao vetor, a massa total de DNA no sistema de ligação foi muito baixa, o que explica a ausência de clones recombinantes após a transformação bacteriana com o sistema de ligação. A não conclusão desta etapa inviabilizou a conclusão dos objetivos propostos, particularmente no que se refere ao terceiro objetivo específico, que implica na análise da atividade do promotor clonado.

No intuito de complementar as atividades previstas no projeto proposto, foi realizada a análise da atividade promotora utilizando clones pKGROEL (Edmar Vaz de Andrade, dados não publicados). Este vetor foi construído por Edmar Vaz de Andrade, seguindo metodologia similar à descrita neste relatório. Resumidamente, consistiu no isolamento e clonagem do promotor termorregulável do gene de GroEL de *C. violaceum* no vetor pKK232-8. O cultivo de bactérias *E. coli* transformadas com o vetor pKGROEL possibilitou a

identificação de clones resistentes a cloranfenicol em todas as concentrações testadas (10µg/mL, 20µg/mL e 34µg/mL). Quanto ao efeito da temperatura na atividade do promotor, o mesmo foi ativo em todas as temperaturas testadas (25°C, 30°C, 35°C e 40°C). Estes resultados confirmaram dados anteriores obtidos por estudo proteômico de *C. violaceum* em condições de estresse térmico (pesquisa sob coordenação do Prof. Edmar Vaz de Andrade), no qual foi confirmada a expressão da proteína GroEL nas mesmas condições de temperatura testadas neste trabalho (Cordeiro, I. B).

Embora a atividade do promotor tenha sido demonstrada, não foi possível confirmar o efeito da temperatura sobre a sua atividade. Isso pode ser explicado, em parte, pelo fato de que a proteína GroEL foi expressa pelo *C. violaceum* em todas as temperaturas testadas, indicando um promotor funcional nas diferentes temperaturas testadas. Adicionalmente, a sobreposição entre as respostas para diversos tipos de estresse em bactéria tem sido demonstrada (Lee *et al.*, 2010; Ishibashi *et al.*, 2010) e essa reação de adaptação envolve mudanças específicas e gerais envolvendo taxa metabólica e nível de transcrição (Jozefczuk *et al.*, 2010). Desta forma, é possível que a presença do antibiótico cloranfenicol tenha elicitado uma resposta ao estresse comparável ao mecanismo de adaptação ao estresse térmico, e por isso inviabilizado a detecção de uma resposta específica ao estresse térmico. Entretanto experimentos adicionais deverão ser realizados a fim de investigar essa hipótese.

Contudo, estes resultados são importantes por demonstrar a viabilidade de se utilizar um promotor derivado de *C. violaceum* para a construção de vetor de expressão em *E. coli*. Abre também a perspectiva de se construir vetores de expressão para o *C. violaceum*, sendo uma etapa inicial para a construção de sistemas de clonagem e expressão utilizando o *C. violaceum* ao invés da *E. coli*, que é amplamente utilizada por várias empresas multinacionais. Por fim, o desenvolvimento de um sistema de expressão heteróloga utilizando o *C. violaceum* pode ser de grande impacto econômico, não somente para a região norte, como para todo o Brasil.

5. Conclusões e Perspectivas

- 5.1. A sequência nucleotídica do promotor do gene *phasin* clonada foi determinada;
- 5.2. A subclonagem do promotor do gene *phasin* de *C. violaceum* (P_*phasin*) no vetor pKK232-8 (Amersham) não foi obtida, apesar de sucessivas tentativas;
- 5.3. A análise da atividade promotora do P_*phasin* em *E. coli* não foi possível. Entretanto, a análise foi realizada com o promotor termorregulável do gene codificador para GroEL.

Neste estudo foi confirmado que o promotor derivado de *C. violaceum* (promotor do gene de GroEL) foi ativo em bactérias *E. coli* podendo ser utilizado na proposição da construção de vetores de expressão com promotor termorregulável em *E. coli*. No intuito de concluir o projeto proposto, serão realizados novos procedimentos visando a sub-clonagem do promotor do gene *phasin* no vetor pKK232-8, bem como o estudo de sua funcionalidade em *E. coli*.

6. Cronograma de atividades

Nº	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
		2010					2011						
1	Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Preparo de plasmídio recombinante	X	X	X									
3	Seqüenciamento nucleotídico das regiões promotoras clonadas		X	X	X								
4	Clonagem das regiões promotoras em vetores de expressão caça-promotor				X	X	X	X					
5	Análise da atividade do promotor termorregulável de bC. violaceum em E. coli						X	X	X	X			
6	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)									X	X	X	
7	Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												X

7.Referências

- AMERSHAM BIOSCIENCES, LIFE SCIENCE. Disponível em <http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/brasil_homepage>. Acesso em junho 2009.
- CADORET, J.P.; BOULO, V.; GENDREAU, S.; MIALHE, E. Promoters from *Drosophila* heat shock protein and Cytomegalovirus drive transient expression of luciferase introduced by particle bombardment into embryos of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Biotechnology*, v.56, p.183-189, 1997.
- INVITROGEN, LIFE TECHNOLOGIES. Disponível em < <http://www.invitrogen.com.br/>>. Acesso em junho 2009.
- CORDEIRO, I.B. Proteoma de *Chromobacterium violaceum* em condições de estresse térmico. Dissertação de Mestrado – Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2009.
- Ishibashi K, Shimada K, Kawato T, Kaji S, Maeno M, Sato S, Ito K (2010) Inhibitory effects of low-energy pulsed ultrasonic stimulation on cell surface protein antigen C through heat shock proteins GroEL and DnaK in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 76:751–756.
- KUCHERLAPATI, R.; SKOULTCHI, A. I. introduction of purified genes into bacteria cells, *CRC Crit Ver Biochem*. 16(4): 349-37379, 1984
- Jozefczuk S, Klie S, Catchpole G, Szymanski J, Cuadros-Inostroza A, Steinhauser D, Selbig J, Willmitzer L (2010) Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* 6:364.
- LEWIN, B. *Genes VII*, Editora Artmed, 7ª Edição, Porto Alegre – RS, 2001.
- Lindquist S (1986) A resposta de choque térmico. *Ann Ver. Biochem* 55: 1151-1191
- Lindquist S, Craig EA (1988) As proteínas de choque térmico. *Ann Rev Genet* 22: 631-677
- Mager, WH and Varela, JCS (1993). Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* **10**, 253–258.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**, Editora Sarvier, 4ª Edição, São Paulo - SP, 2006.
- PELHAM, H.R.B.; BIENZ, M. A synthetic heat-shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *The EMBO Journal*, v.1 (11), p.1473 – 1477, 1982.

RETTORI, D. Estudos Físico-Químicos e Biológicos da Violaceína: Um pigmento produzido por *Chromobacterium violaceum*. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

SCHOFIELD, D.A.; WESTWATER, C.; HOEL, B.D.; WERNER, P.A.; NORRIS, J.S.;

STRATAGENE, AGILENT TECHNOLOGIES DIVISION. Disponível em <http://www.stratagene.com/homepage/default.aspx>. Acesso em junho 2009.

VASCONCELOS, A.; ALMEIDA, D.; HUNGRIA, M.; GUIMARÃES, C. T.; ANTÔNIO, R. V.; ALMEIDA, F.C.; ALMEIDA, L. G. P.; ALMEIDA, R.; ALVES-GOMES, J. A.; ANDRADE, E. M.; ARARIPE, J.; FLORÊNCIO DE ARAÚJO, M. F.; ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, V.; BAPTISTA, A. J.; BATAUS, L. A. M.; BATISTA, J.; BELÓ, A.; VAN DEN BERG, C.; BOGO, M.; BONATTO, S.; BORDIGNON, J.; BRIGIDO, M. M.; BRITO, C. A.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CARDOSO, D.; CARNEIRO, N. P.; CARRARO, D. M.; CARVALHO, C. M. B.; CASCARDO, J. C.; CAVADA, B. S.; CHUEIRE, L. M. O.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CUNHA-JUNIOR, N. C.; FAGUNDES, N.; FALCÃO, C. L.; FANTINATTI, F.; FARIAS, I. P.; FELIPE, M. S. S.; FERRARI, L. P.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; FRANCO, G. R.; FREITAS, N. S.; FURLAN, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; GOMES, E. A.; GONÇALVES, P. R.; GRANGEIRO, T. B.; GRATTAPAGLIA, D.; GRISARD, E. C.; HANNA, E. S.; JARDIM, S. N.; LAURINO, J.; LEOI, L. C. T.; LIMA, L. F. A.; LOUREIRO, M.F.; DE LYRA, M. C. C. P.; MADEIRA, H. M. F.; MANFIO, G. P.; MARANHÃO, A. Q.; MARTINS, W. S.; ZINGARETTI DI MAURO, S. M.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R.; MEISSNER, R. V.; MOREIRA, M. A. M.; DO NASCIMENTO, F. F.; NICOLÁS, M. F.; OLIVEIRA, J. G.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXÃO, R. F. C.; PARENTE, J. A.; PEDROSA, F. O.; PENA, S. D. J.; PEREIRA, J. O.; PEREIRA, M.; COSTA PINTO, L. S. R.; PINTO, L. S.; PORTO, J. I. R.; POTRICH, D. P.; RAMALHO-NETO, C. E.; REIS, A. M. M.; RIGO, L. U.; RONDINELLI, E.; DO SANTOS, E. B. P.; SANTOS, F. R.; SCHNEIDER, M. P. C.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, A. M. R.; COSTA DA SILVA, A. L.; SILVA, D. W.; SILVA, R.; SIMÕES, I. C.; SIMON, D.; SOARES, C. M. A.; SOARES, R. B. A.; SOUZA, E. M.; DE SOUZA, K. R. L.; SOUZA, R. C.; STEFFENS, M. B. R.; STEINDEL, M.; TEIXEIRA, S. R.; URMENYI, T.; VETTORE, A.; WASSEM, R.; ZAHA, A.; SIMPSON, A.J.G. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Brazilian National Genome Project Consortium – PNAS, v.100 (20), p.11660-11665, 2003.

8. Anexos

Anexo 1. Protocolo para a reação de sequenciamento.

Para a reação de seqüência são necessários:

1. Pré-Mix (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da Amersham Bioscience).
2. Iniciador *Forward* ou *Reverse* (5,0 pmol/ μ L).
3. Água Milli-Q sendo completar o volume final de 10 μ L

(Placa p/PCR 96 wells c/borda-Sorenson Cód 23080)

4. Adesivo selador (**selador para placa SORENSON resistente a álcool Cód. 21950**)

Reação para um tubo	Volume (01tubo)	Volume (03 tubos) *
H ₂ O q.s.p	___ μ L	
Iniciador (5,0 pmoles/ μ L)	1,0 μ L	3,0 μ L
Pré - mix	2,0 μ L	6,0 μ L
DNA (100 ng para produto de PCR)	___ μ L	xx
Volume final	10,0 μL	

* **prepara-se uma mistura (mix) de reação para três tubos para corrigir qualquer erro de pipetagem.**

Preparar o pré-mix só na hora que for utilizar (sensível à luz)

Distribuir 3 μ L de mix para cada poço da microplaca

Condições de ciclagem:

1-95°C 15 seg.

2-55°C 20 seg.

3-60°C 1:20 min.

4-04° C Forever

PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO.

Para 10,0 µl da reação usa-se:

- ✓ 1,0 µL de acetato de amônia
- ✓ 27,5 µL etanol absoluto.
- ✓ OBS : acetato de amônio faz parte do kit de sequenciamento *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da Amersham Bioscience

PRECIPITAÇÃO

1. Após a adição de 1 µL acetato de amônio e dar um spin,
2. Adicionar 27,5µL de etanol absoluto 100 % **MERCK**, selar bem (**selador para placa SORENSON resistente a álcool Cód. 21950**) e então vortexar vigorosamente por 1 minuto (FUNDAMENTAL)
3. Incubar 20 min temperatura ambiente, protegido da luz, coberto com papel laminado.
4. Centrifugar 40 min 4000 g a 4 °C.
5. Virar a placa e despejar o conteúdo (com bastante força).
6. Adicionar 120 µL de etanol 70% por poço selar bem com o mesmo selo (**selador para placa SORENSON resistente a álcool Cód. 21950**) e vortexar alguns segundos.
7. Centrifugar 10 min (na máxima velocidade de qualquer centrífuga) 4 °C.
8. Virar a placa e despejar o conteúdo, com força.
9. Centrifugar um pulso de alguns segundos com a placa invertida (não passar 700 g)
10. Deixar secar até evaporar o etanol (15 minutos)

11. Adicionar 10 μ l de loading buffer e vortexar muito bem (FUNDAMENTAL!)
12. Selar **com** (Selador Thermal Seal Sealing Film PCR-COD. TS-321-31-101 **não resistente a álcool**) e centrifugar um pulso de alguns segundos a placa (não passar 700 g).