

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais

Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE PROMOTORES PARA OBTENÇÃO DE
SEQÜÊNCIAS PARA *ESCHERICHIA COLI***

GISELE BARRETO MOREIRA

Manaus, Amazonas

Maior, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GISELE BARRETO MOREIRA

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE PROMOTORES PARA OBTENÇÃO DE
SEQÜÊNCIAS PROMOTORAS PARA *ESCHERICHIA COLI***

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

Dissertação apresentada ao PIPG-
BTRN como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas área de
concentração em Genética,
Conservação e Biologia Evolutiva

Projeto financiador: Metagenoma
de bactérias de ambientes naturais
da Amazônia. CT_Amazônia/
CNPq
Processo: 553351/2005-2

Manaus, Amazonas

Maiο, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Gisele Barreto

Construção de biblioteca de promotores para obtenção de seqüências para *Escherichia coli*
Manaus: INPA/UFAM
2008.

69 p. ilustr.

Dissertação de Mestrado - Área de concentração Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. Biologia Molecular; 2. Seqüências promotoras; 3. *Escherichia coli*

Sinopse:

Obteve-se seqüências promotoras para *Escherichia coli* a partir de plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*, isolado do Rio Negro, Manaus, Amazonas.

Palavras-chave:

Engenharia genética, vetor caça-promotor, *Chromobacterium violaceum*

Dedico este trabalho ao Senhor Jesus Cristo, o único que é
verdadeiramente digno de ser chamado de Mestre;
A minha família, pelo
compromisso que representam com meu passado e meu
futuro;
E a minha mãe, Rosa Júlia, *in memoria*.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao grande Deus, Senhor Jesus Cristo, por revigorar minha fé, reacender minha esperança, fazer-me vencer todos os obstáculos, por manter inquebrantável a energia e renovada a coragem, nos momentos de desalento e cansaço que me banharam durante a realização deste trabalho.
- ❖ Ao CNPq pela bolsa de Mestrado concedida, sem a qual não teria tido condições de dedicar-me a um sonho por dois anos ininterruptos.
- ❖ A minha família (tias Ana e Laura, mana Gabi e vó Têca) que apesar de pequena, sempre foi grande no amor incondicional, valores e confiança em mim depositados.
- ❖ Ao meu querido orientador Dr. Spartaco Astolfi Filho pelo conhecimento, aprendizagem, apoio, paciência e carinho. Por ter aberto as portas do Laboratório de Tecnologia de DNA Recombinante e permitido assim, eu que vim de longe, dar meus passos iniciais, tal como um bebê quando descobre o chão.
- ❖ Ao professor Co-orientador Dr. Edmar Vaz de Andrade, pela co-orientação, pelos conselhos em momentos cruciais, palavras amigas e zelo demonstrado.
- ❖ Ao grupo do DNA Forense do Estado do Amazonas pelo grande apoio, sem o qual não teria concluído a dissertação, em especial à Daniella Koshikene.

- ❖ À Dra Eliana Feldberg pela ajuda inicial e crucial na verificação da bibliografia.

- ❖ A Daniel Libório, pelo que temos sido juntos.

- ❖ À amiga Márcia Neiva, pelos conselhos, confiança, amizade e ajuda nos momentos mais precisos, por sempre me escutar e pelo seqüenciamento na hora precisa.

- ❖ Às amigas Fabíola Rodrigues, Luciana Batista, Laura Bernardes, Natasha Verdasca, Michely Araújo, Frida Mesel, Michele Soeiro, Monique Godinho e Renata Shimidt pelos sorrisos, lágrimas, sonhos e realidade somados e compartilhados; pela cumplicidade, amizade, força, companheirismo e momentos de alegria, e em especial a Luna, pela ajuda com a bibliografia.

- ❖ Ao amigo Daniel Dutra pela amizade e apoio.

- ❖ À Dina pelos toques e socorro sempre presente.

- ❖ Ao casal Raquel e Gustavo por terem permitido que a música fosse presente nesses dois anos, em especial à Raquel pela bela voz e bolsa de canto doada a mim, permitindo que eu me dedicasse um pouco a esta arte; e a Gustavo pela figura que é, uma pessoa muito querida.

- ❖ Ao casal Lívio e Gírlene, pelos risos, descontração, conselhos, por tudo.

- ❖ Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de DNA Recombinante, Myrna Sayuri, Cecília Fonseca, Viviane, Isabelle Cordeiro, Tiago Oliveira e Marcos Pessoa pelos momentos de descontração e auxílio.

- ❖ À Patrícia e Elza por todo o auxílio e amizade.

*“Porque o Senhor que dá a sabedoria,
e de sua boca é que procedem a ciência e a prudência.”*

Pv 2,6

RESUMO

O interesse por ferramentas de manipulação genética, que aumentem a produção de proteínas heterólogas, por microorganismos, cresceu nos últimos anos. Para tal há necessidade de não apenas da clonagem do gene de interesse no vetor, mas de um cassete de expressão otimizado, tanto em nível transcricional como traducional, que permita que a célula cresça e que após a indução, quando necessário, possibilite que a proteína heteróloga assuma a conformação correta (Schumann & Ferreira, 2004). Em todas as estratégias de expressão desenvolvidas, utilizam-se seqüências denominadas de promotoras. Estas em seres procariontes precedem o gene e sinalizam à RNA polimerase o início da transcrição. As seqüências promotoras utilizadas nos cassetes de expressão podem ser obtidas a partir de DNA natural ou podem ser construídas sinteticamente, sendo selecionadas com o uso de vetores caça-promotor. Estes possuem em sua estrutura um gene repórter, desprovido de promotor, justaposto a uma região de um ou mais sítios de clonagem, à qual são inseridas as seqüências de interesse. Este trabalho teve como objetivo a clonagem de promotores a partir de uma preparação enriquecida de plasmídeos de *Chromobacterium violaceum* CVT2, clone isolado no Rio Negro nas imediações do Hotel Tropical. Essa bactéria é Gram-negativa, saprófita, pertencente à família Neisseriaceae (Ordem Neisseriales, classe Betaproteobacteria), típica de águas e solos tropicais e subtropicais (Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2003), sendo amplamente encontrada no Rio Negro (Haselkorn R, 2003). Fragmentos da fração plasmidial produzidos por *Sau3AI* foram ligados ao sítio de *BamHI* do vetor caça-promotor e o sistema de ligação utilizado para transformar *E. coli* (Top10) para resistência à ampicilina. Dos 130 clones transformantes obtidos 47 foram recombinantes pois mostraram a capacidade de crescer na presença de cloranfenicol. A maior parte dos clones recombinantes mostrou resistência a apenas 50ug/mL de cloranfenicol, sendo que dois deles cresceram até 100ug/mL e um até 500ug/mL. Dos clones recombinantes, 8 foram escolhidos e seus DNAs plasmidiais extraídos e serviram de molde para determinação das seqüências dos fragmentos clonados, sendo que 5 delas foram determinadas completamente. Em três insertos foi possível identificar as regiões -10 e -35 pelo programa BPRM. O clone recombinante que apresentou maior crescimento em cloranfenicol (500ug/mL) foi o que apresentou as regiões -10 e -35 com o espaçamento de 17 pares de bases e uma região rica em T a jusante da região -35, o que são características de promotores mais fortes.

ABSTRACT

The interest in tools of genetic manipulation, which increase the production of heterologous proteins, by microorganisms, has grown in recent years. For this there is need not only the cloning of the gene of interest in the vector, but a optimized expression cassette, as well in transcriptional level as translational, allowing the cell to grow and that after the induction, when necessary, which allows the heterologous proteins take the correct conformation (Schumann & Ferreira, 2004). In all strategies of expression developed are used sequences named promoters. These, beings in prokaryotes, are localized before of the gene and signal for the RNA polymerase the starting site of the transcription. The promoters sequences used in expression cassettes can be obtained from natural DNA or can be made synthetically, being selected with the use of probe vector. The probe vector has a reporter gene, devoid of promoter, downstream a region of one or more sites of cloning, which are inserted the sequences of interest. The aimed this work was the cloning of promoters from an enriched preparation of plasmids *Chromobacterium violaceum* CVT2, isolated in Rio Negro, near the Hotel Tropical. This is gram-negative bacteria, saprophyte, belonging to the family Neisseriaceae (Order Neisseriales, class Betaproteobacteria), being typical of tropical and subtropical water and soil (Andrighetti-Fröhner et al., 2003) and is widely found in Rio Negro (Haselkorn, 2003). Fragments of plasmid fraction produced by *Sau3AI* were linked to the site of the *BamHI* of the probe vector and the system used to transform *E. coli* (Top10) for resistance to ampicillin. Of the 130 transformants clones, 47 were recombinants because showed the ability to grow in the presence of chloramphenicol. Most of recombinant clones showed resistance only in 50ug/mL of chloramphenicol, where two of them grew until 100ug/mL and until 500ug/mL. Of the recombinant clones, 8 were chosen and their DNAs plasmids extracted and used to determine the sequences of fragments cloned. These, 5 were completely sequenced. In three inserts were unable to identify the regions -10 and -35 for the programme BPRM. The recombinant clone that showed higher growth in chloramphenicol (500ug/mL) was what made the regions -10 and -35 with the spacing of 17 pairs of bases and a region rich in T downstream of -35 region, which are characteristics of the strongest promoters.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Sequências promotoras e a transcrição gênica em <i>E.coli</i>	3
1.1.1. Controle do início da transcrição	4
<i>RNA polimerase</i>	5
<i>Sequências promotoras</i>	7
1.2. Como obter sequências promotoras?	10
1.2.1. Vetores de Seleção de Promotores (VSP) ou caça-promotores	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. MATERIAIS	15
3.1.1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	15
3.1.2. Plasmídeos	15
3.1.3. Oligonucleotídeos	15
3.1.4. Reagentes	16
3.1.5. Meios de cultura	16
3.1.6. Enzimas	16
3.1.7. Tampões e soluções	16
3.2. MÉTODOS	18
3.2.1. Obtenção das sequências promotoras	18
3.2.1.1. Extração de DNA plasmidial de <i>Chromobacterium violaceum</i>	18
<i>Eletroforese de DNA plasmidial de <u>C. violaceum</u> em gel de agarose</i>	18
3.2.1.2. Cinética enzimática de <i>C. violaceum</i> CVT2	19
3.2.1.3. Extração das enzimas pelo método de fenol/clorofórmio e precipitação dos fragmentos	19
3.2.2. Clonagem no vetor caça-promotor pKK232-8	20
3.2.2.1. Extração do DNA plasmidial	20
3.2.2.2. Sistema de digestão do plasmídeo pKK232-8	20
3.2.2.3. Extração das enzimas pelo método de fenol/clorofórmio e precipitação dos fragmentos	21
3.2.2.4. Desfosforilação do plasmídeo pKK232-8	21

3.2.2.5. Ligação dos fragmentos de DNA plasmideal de <i>Chromobacterium violaceum</i> CVT2 ao vetor PKK232-8	22
3.2.2.6. Transformação genética de <i>Escherichia coli</i> por eletroporação	23
a) Preparo de células <i>Escherichia coli</i> eletrocompetentes	23
b) Procedimento de eletroporação	24
3.2.2.7. Obtenção dos clones recombinantes	24
3.2.3. Análise dos clones recombinantes	24
3.2.3.1. PCR a partir dos clones recombinantes	24
3.2.3.2. Crescimento em Meio Líquido	25
3.2.3.3. Extração de plasmídeos dos clones recombinantes	26
3.2.3.4. Análises das seqüências promotoras	26
a) Reação de sequenciamento	26
b) Precipitação e determinação das seqüências de nucleotídeos	27
3.2.3.5. Etapas de bioinformática	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Obtenção dos plasmídeos	29
4.2. Clonagem de Fragmentos de DNA no Vetor Caça-Promotor	30
4.3. Obtenção dos clones recombinantes	33
4.4. Análise das seqüências promotoras	40
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7. APÊNDICE	61

Lista de Figuras

Figura 1- Ciclo de transcrição pela RNA polimerase de <i>Escherichia coli</i>	3
Figura 2- Estrutura do fator σ^{70} ligando-se aos hexâmeros -10 e -35 em <i>E. coli</i> ,	6
Figura 3- Seqüência consenso de promotores de <i>E. coli</i> .	7
Figura 4- Seqüências de promotores fortes de <i>E. coli</i> .	9
Figura 5- Representação esquemática do plasmídeo caça-promotor pKK232-8	12
Figura 6- Representação esquemática do preparo de células eletrocompetentes	23
Figura 7- Perfil eletroforético da preparação plasmideal de <i>Chromobacterium violaceum</i> CVT2	29
Figura 8- Perfil eletroforético do plasmídeo pKK232-8	30
Figura 9- Perfil eletroforético da cinética de digestão dos plasmídeos de <i>C.violaceum</i> com a enzima de restrição <i>Sau3AI</i> .	31
Figura 10- Perfil eletroforético do produto de digestão do plasmídeo pKK232-8	32
Figura 11- Perfil eletroforético da precipitação dos sistemas de digestão dos plasmídeos utilizados	33
Figura 12- Réplica-plate dos clones transformantes com sistema de ligação	34
Figura 13- Perfil eletroforético do produto de amplificação dos insertos dos clones recombinantes	36
Figura 14- - Representação gráfica do crescimento em meio líquido LB dos clones 10 e 14	38
Figura 15- Representação gráfica do crescimento em meio líquido LB dos clones 21, 23, 27 e 32	39
Figura 16- Representação gráfica do crescimento em meio líquido LB dos clones 39 e 43	40
Figura 17 – Análise eletroforética dos plasmídeos recombinantes seqüenciamento automático de DNA.	41
Figura 18 – Representação da qualidade do seqüenciamento pelo software <i>ScoreCard</i> .	42

Lista de Tabelas

Tabela 1- Proteínas recombinantes produzidas em larga escala, em diversos setores econômicos	2
Tabela 2- Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados	15
Tabela 3- Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições	16
Tabela 4- Tampões e soluções utilizadas, com suas respectivas composições	17
Tabela 5- Enzimas de restrição e respectivas seqüências de corte	22
Tabela 6- Clones recombinantes resistentes a diferentes concentrações de cloranfenicol	35
Tabela 7- Seqüência nucleotídica dos promotores derivados de plasmídio de <i>C. violaceum</i>	43
Tabela 8- Resultado da análise de similaridade das seqüências obtidas pelo programa <i>Blastn</i> .	44
Tabela 9- Análise das regiões -10 e -35 dos insertos clonados, pelo programa <i>BPROM</i>	47
Tabela 10- Conteúdo GC/AT das seqüências obtidas.	48

1. INTRODUÇÃO

O interesse por ferramentas de manipulação genética, que aumentem ou regulem a produção de determinadas proteínas recombinantes por microrganismos, tem crescido nos últimos anos (Solem & Jensen, 2002). Este interesse está sedimentado, entre outros fatores, na descoberta de novos microrganismos. Os esforços em seqüenciar genomas de seres escolhidos da biodiversidade implicam na descoberta de novos recursos genéticos cujos produtos são aplicados na indústria, seja com fins terapêuticos, alimentícios ou de outro setor biotecnológico. Exemplo desses usos é a clonagem em plantas, de genes microbianos codificadores de resistência à ação deletéria de fatores ambientais, ou genes microbianos codificadores de substâncias osmoreguladoras que facilitariam o seu crescimento em ambientes muito secos ou de elevada salinidade (Candeias, 1991). Outra importante aplicação é a obtenção de microrganismos capazes de produzir compostos químicos, enzimas ou combustíveis a partir de substratos não renováveis e não poluidores do ambiente (Candeias, 1991). Na tabela 1, há exemplos de uso, em larga escala, de proteínas no setor industrial. Por exemplo, há produção de interferon alfa humano com atividade biológica contra infecções ocasionadas por vírus e contra algumas formas de tumores malignos humanos, de vacinas e de reagentes biológicos usados na identificação e quantificação de proteínas específicas (Candeias, 1991). A grande maioria dessas aplicações tem como modelo experimental a bactéria *Escherichia coli*, o microrganismo mais utilizado para produção de proteínas recombinantes (Miksch *et al.*, 2005; Jana & Deb, 2004) por ser muito conhecido e de fácil manipulação.

Tabela 1- Proteínas recombinantes produzidas em larga escala, em diversos setores econômicos.

TIPO DE PRODUTO	INDICAÇÃO DE USO
Insulina humana	Diabetes
Vacina anti-hepatite	Prevenção da hepatite B
Alteplase	Prevenção de infarto do miocárdio
Interferon-a-2b	Tratamento da leucimia
Fator anti-hemofílico	Hemofilia A
Hormônio do crescimento humano	Deficiência do crescimento
Interferon-β	Tratamento da esclerose múltipla
Protease, lípase, celulase, amilase	Detergentes e sabão em pó
Lipases	Produção de papel
Pectinase	Produção de sucos e vinhos
Chomosina	Produção de queijos
Amilase e amiloglicosidase	Produção de álcool

Quando se pensa em proteínas recombinantes para fins industriais, pensa-se também em expressão eficiente de tais proteínas em sua conformação nativa. Para tal expressão há necessidade de não apenas a clonagem do gene de interesse no vetor (sob controle de promotor induzível), mas de um cassete de expressão otimizado, tanto em nível transcricional como traducional, que permita que a célula cresça e que após a indução, quando necessária, possibilite que a proteína heteróloga assuma a conformação correta (Schumann & Ferreira, 2004).

O interesse em aumentar a expressão de determinados genes proporcionou o desenvolvimento de diferentes estratégias. As primeiras proteínas recombinantes eram produzidas por uma simples clonagem de um segmento de DNA em um plasmídeo multicópia (Hartley, 2006). Posteriormente, a combinação dos genes de interesse a seqüências promotoras fortes passou a ser utilizada (Hartley, 2006). Em seguida a esta combinação, foram adicionadas estratégias que potencializassem a expressão. Exemplos desses avanços são as seqüências *Shine-Dalgarno* muito eficientes, derivadas de genes de

proteínas virais como a da proteína 10 do fago T₇, e as seqüências que codificam para domínios protéicos específicos (*affinity tags*), a fim facilitar a purificação das proteínas recombinantes por meio de apenas um ciclo de cromatografia de afinidade (Waugh, 2005).

1.1. Seqüências promotoras e a transcrição gênica em *E.coli*

O interesse pelas seqüências promotoras não se dá apenas pelo uso biotecnológico, mas pela compreensão em si do processo transcricional, que permite melhorar tais utilizações. A transcrição permite o processamento da informação genética em uma escala espaço/temporal, onde o DNA será transcrito em RNA para posterior tradução. A homeostase desse processo implica em gasto de energia reduzido, a partir de uma regulação em função da necessidade do produto final, a proteína (deHaseth *et al.*, 1998).

O processo é dividido em três etapas (Figura 1): iniciação, alongação e terminação, onde pelo menos três seqüências do DNA e uma proteína estão envolvidas na transcrição gênica: (1) promotor, (2) terminadores transcripcionais, (3) seqüência regulatória e (4) RNA polimerase (RNAPol).

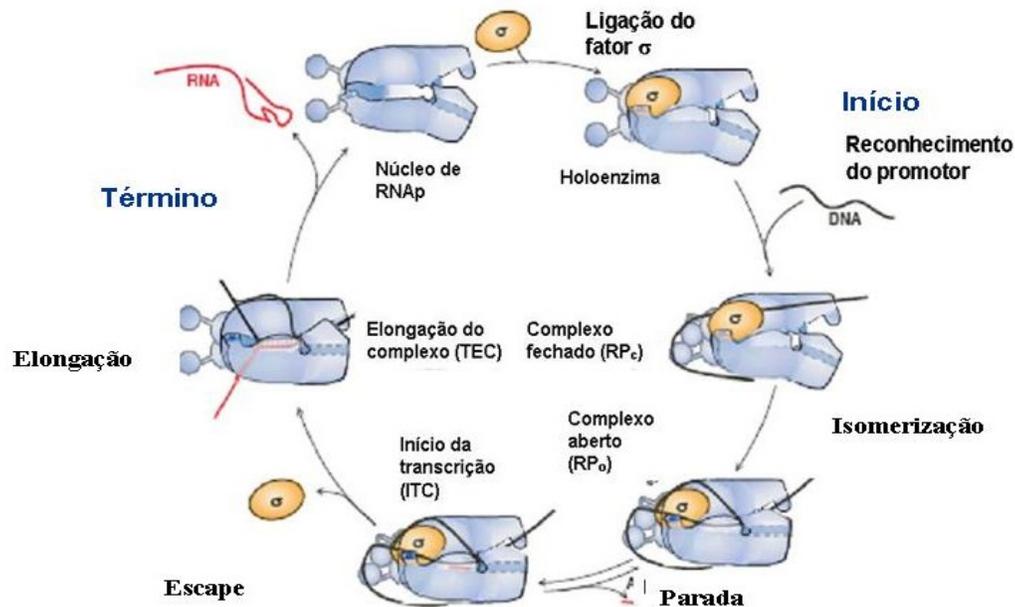


Figura 1- Ilustração do ciclo de transcrição pela RNA polimerase de *Escherichia coli*, modificado de Geszvain & Landick (Acesso em: 15 de set. 2006.), disponível em <http://www.bact.wisc.edu/landick>.

Por isso, o processo de síntese de RNA pode ser descrito como o ciclo que se inicia com a localização do promotor e termina com a liberação do transcrito por completo e do núcleo da enzima RNAPol. A nova ligação do core da enzima com o fator σ e o subsequente reconhecimento do promotor, completa o ciclo da transcrição (Travers & Burgess, 1969). Embora a síntese da fita de RNA seja altamente processiva, não é uniforme. A taxa de extensão da fita de RNA é variável com as condições fisiológicas, sendo adicionados na fita em formação, em média, de 20 a 50 nucleotídeos por segundo (Chan & Landick, 1994). Enquanto há adição dos nucleotídeos, o complexo formado por DNA, RNAPol e RNA (fita em formação) permanece parado por vários ciclos de adição de nucleotídeos, movendo-se após a adição de 8 ou 10 pares de bases (Krummel & Chamberlin, 1992). No processo de alongação a RNAPol frequentemente pára por períodos de vários segundos antes de continuar a alongação da cadeia de RNA (Uptain *et al.*, 1997). O término da síntese de RNA ocorre em sítios específicos, denominados de terminadores de transcrição, onde o transcrito de RNA tem alta probabilidade de ser liberado (Von Hippel & Yager, 1992). Existem duas classes de terminadores: rho-dependente e independentes de fatores rho (ρ). Rho é uma proteína essencial à *E. coli*, embora seu genoma possua poucos terminadores dependentes dela. A terminação da transcrição rho-dependente não possui características comuns como seqüência repetidas de base uracila (U). Possui a proteína rho que se liga a sítios específicos no início do RNA mensageiro (RNAm) e procede a migração ao longo da cadeia de RNA até encontrar a seqüência terminadora (Makrides, 1996). As terminações Rho-dependentes são mais complexas e, por isso não são utilizadas em sistema de expressão de proteína recombinante. A terminação rho-independente consiste na formação de estruturas em grampo no RNA a partir de seqüências autocomplementares da fita molde de DNA. Além disso, contém seqüências de 4 a 6 bases de nucleotídeos de adenina (A) que quando transcritas formam uma região rica em uracila. Como ligações do tipo Adenina/ Uracila (A/U) são ligações instáveis, a estrutura em grampo rompe parte da ligação DNA/RNA e o duplex A/U se dissocia, finalizando a transcrição. (Schumann & Ferreira, 2004).

1.1.1. Controle do início da transcrição

O principal passo na regulação da expressão gênica em procariotos é o controle do início da transcrição (Wertman *et al.*, 1984; Kobayashi *et al.*, 1990). Este processo tem início com a interação inespecífica e eletrostática da RNA polimerase (RNAP) à dupla fita (Figura 1), seguida de interações com regiões específicas do DNA, **as seqüências promotoras** (Carbonelli *et al.*, 1999; deHaseth *et al.*, 1998; Youderian, 1988). Nesta etapa há a formação do complexo fechado (RPC) entre a RNA polimerase (RNAP) e o DNA dupla fita (Camarero *et al.*, 2002). A partir da formação do RPC, há isomerização do complexo, junto com superenrolamento negativo e separação das fitas do DNA, para formação do complexo aberto (RPO) (DrLica *et al.*, 1999).

RNA polimerase

A RNA polimerase procariótica é formada por múltiplas cadeias polipeptídicas e possui massa de 480.000 daltons (Ishihama, 1981). Dentre as procarióticas, a RNAP de *E. coli* é uma das mais e melhor estudadas. Evolutivamente, há uma forte similaridade entre as seqüências de aminoácidos desta às de eucariotos e às de Archea. Estruturalmente, é constituída por um núcleo catalítico $\alpha_2\beta\beta'\omega$ (Typas & Hengge, 2006) e pelo fator σ (Luo *et al.*, 1996). O core da enzima ($\alpha_2\beta\beta'\omega$), apesar de ser responsável por quase toda a transcrição, não é capaz de iniciar este processo (Barne *et al.*, 1997).

Molecularmente, cada subunidade α da RNAP possui 36,5kDa, a subunidade β possui 150,6 kDa e β' 155,2kDa. Os domínios C-terminal e N-terminal da subunidade α são conectados por 14 resíduos de aminoácidos, constituindo um espaçador flexível (Zang & Darst, 1998). A porção N-terminal deste fator está envolvida na formação do dímero α_2 (core - holoenzima) e na ligação aos domínios β e β' (Ishihama *et al.*, 1987). O domínio C-terminal das duas subunidades a interage com a região -35 da seqüência promotora de um gene (Gourse *et al.*, 2000; Berezhnoy & Shckorbatov, 2005) e com outros ativadores de transcrição (Luo *et al.*, 1996).

A subunidade β liga-se a rNTPs (Luo *et al.*, 1996), enquanto que a β' tem ligação inespecífica ao DNA (Schumann & Ferreira, 2004). A função da subunidade ω mantém a correta conformação de $\alpha_2\beta$ (Gosh *et al.*, 2003). Já o reconhecimento da seqüência promotora pela RNAP se dá pela subunidade σ (Severinova *et al.*, 1996).

Existe uma variedade de fatores σ , sendo que cada um reconhece um conjunto de promotores diferentes (Jishage *et al.*, 1996). Existem, pelo menos, seis tipos de fator σ em

E. coli (Jishage *et al.*, 1996). Dependendo do potencial adaptativo, diferentes bactérias possuem diferentes tipos de fatores σ (Typas & Hengge, 2006). Segundo Gralla (1996) a maior parte dos promotores de *E. coli* é reconhecida pelo fator σ^{70} , principalmente dos genes transcritos durante o crescimento exponencial da célula (Loneto *et al.*, 1992). Este fator, geralmente, reconhece como núcleo de promotores as seqüências situadas entre -60 a +20 pb do início da transcrição (Berezhnoy & Shckorbatov, 2005). Em *E. coli*, a estrutura do fator σ consiste de quatro importantes regiões conservadas, denominadas 1, 2, 3 e 4. A região 2 é subdividida em quatro segmentos estruturais (2.1- 2.4) e a região 4 é dividida em dois (4.1 - 4.2) (Helmann & Chamberli, 1988). Quando o fator σ^{70} da RNAP interage com o DNA (Figura 2), a sub-região 2.4 (na porção C-terminal da região 2) reconhece o hexâmero -10 (situado 10 pb antes do início da transcrição) e a sub-região 4.2 (na extremidade C-terminal) reconhece o hexâmero -35 (situado 35 pb antes do início da transcrição) (Callaci *et al.*, 1999). A região estendida do sítio - 10 é reconhecida pela região 3.0 (Murakami *et al.*, 2002).

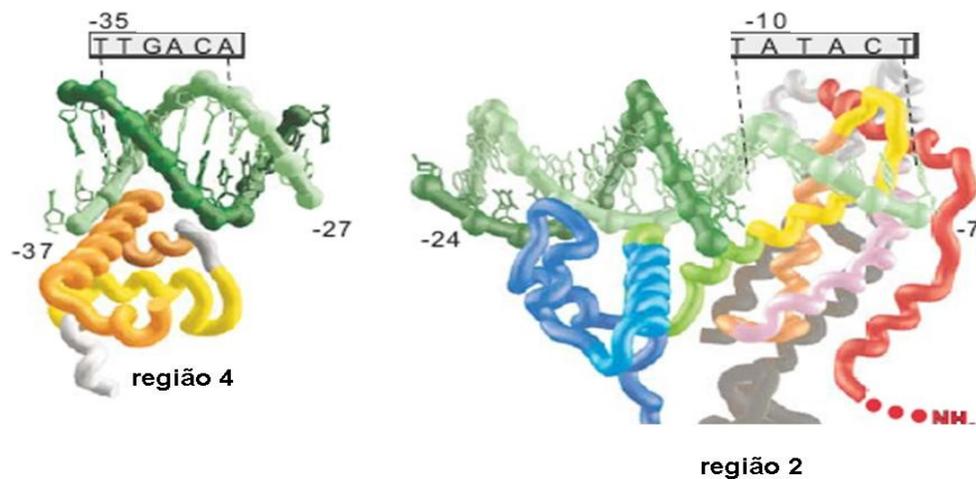


Figura 2- Estrutura do fator σ^{70} ligando-se aos hexâmeros -10 e -35 em *Escherichia coli*, modificado de Geszvain & Landick (Acesso em: 15 de set. 2006.), disponível em <http://www.bact.wisc.edu/landick>.

Seqüências promotoras

Segundo Stefano & Gralla (1980), duas questões fundamentais sobre expressão em *E.coli* são: o que distingue uma seqüência promotora de uma não promotora? E o que determina a taxa máxima de utilização de uma seqüência promotora?

Em relação ao que seria uma seqüência promotora, Calos, em 1978, conceituou promotor como sendo a região do DNA que precede o gene e sinaliza à RNAP para iniciar a transcrição. Já McClure, em 1985, afirmou que promotores são seqüências que afetam a localização do início da transcrição, a partir da interação com RNA polimerase. Para Makrides (1996) e Miksch *et al.* (2005) uma seqüência promotora para expressão heteróloga em *E.coli* deve ter as seguintes características: ser forte, proporcionar altas concentrações da proteína alvo em relação ao total celular, exibir o mínimo de expressão basal e ser induzível de forma simples (Makrides, 1996; Miksch, *et al.*, 2005).

Estruturalmente, a região promotora (figura 3) consiste de dois hexâmeros, um na posição -35 e outro na posição -10 (a partir do ponto de início da transcrição), de uma seqüência espaçadora entre os hexâmeros (Harley e McClure, 1983) e, em alguns casos, de “UP elements” que se localizam a montante (*upstream*) da região -35 (Berezhnoy & Shckorbatov, 2005).

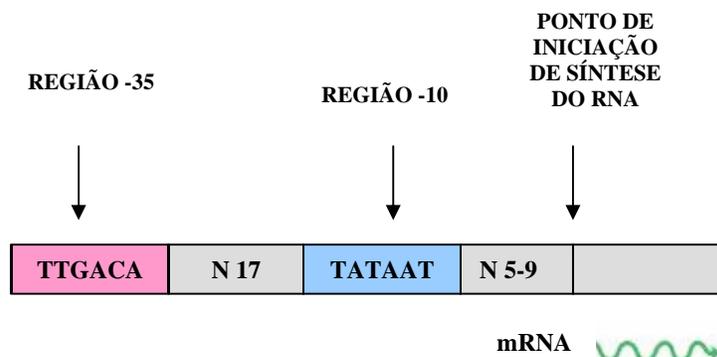


Figura 3- Seqüência consenso de promotores de *E. coli*. N indica qualquer nucleotídeo (modificada de Lehninger, 2001).

Os hexâmeros são seqüências conservadas intra e interespecificamente (Reddy *et al.*, 2005), por isso são denominadas de regiões consensuais (Fenton & Gralla, 2001). A

região -10 corresponde à seqüência ‘TATAAT’ e a região -35 à seqüência ‘TTGACA’ (Kiryu *et al.*, 2004). Cada nucleotídeo representado na seqüência consenso indica a base mais freqüente em uma determinada posição. De acordo com inúmeros estudos, o fator σ tolera certo nível de divergência nestas seqüências consensuais. Dentre os promotores já encontrados e reconhecidos pelo fator σ^{70} , verifica-se que estes possuem uma média de duas trocas nucleotídicas nos hexâmeros em relação à seqüência consenso (Jacques *et al.*, 2006). O fator σ^s , tolera uma maior degeneração nestas duas regiões que σ^{70} (Typas & Hengge, 2006). No que diz respeito à região espaçadora, está relacionada à rotação axial entre os dois hexâmeros (DrLica *et al.*, 1999), possibilitando a isomerização do RPc e a formação posterior do RPo de transcrição (Lozinski *et al.*, 1989). Diferentes fatores σ reconhecem espaçamentos de tamanhos diferentes, por exemplo, o fator σ^s reconhece de 15 a 19pb (Typas & Hengge, 2006). Já a região espaçadora reconhecida pelo fator σ^{70} varia entre 15 a 20pb. (Harley e McClure, 1983). Além destas regiões já citadas, existem promotores que apresentam uma quarta região conhecida como “*upstream elements*” que se localizam a montante da região -35, na maioria das vezes 40-60 pb antes do ponto de início da transcrição (Mitchell *et al.*, 2003). Esses elementos não são conservados como os hexâmeros (Ross *et al.*, 1998) e muitos são ricos em A-T. Essa seqüência geralmente interage com o domínio C-terminal da subunidade α da RNAP (Shawn *et al.*, 1998), sendo importantes para a eficiência do promotor (Carbonelli *et al.*, 1999).

Diante da problemática da Biologia Celular em entender a segunda pergunta feita anteriormente (o que determina a taxa máxima de utilização de uma seqüência promotora?), inúmeros estudos sobre as relações entre seqüências promotoras e suas forças têm sido publicados (Kiryu *et al.*, 2004). Exemplo disso são os trabalhos que demonstram como as diferentes combinações entre as seqüências presentes nos promotores e as diversas proteínas, que a estas seqüências se ligam, podem regular a transcrição em um determinado contexto celular (Edelman *et al.*, 1999). A essa relação, de como a seqüência promotora influencia na taxa de início de transcrição, denomina-se de força do promotor (Youderian, 1988). Segundo Lozinski *et al.* (1989), as seqüências promotoras têm fundamental papel na termodinâmica e cinética do processo inicial da transcrição. Grande parte dos trabalhos relaciona os hexâmeros mais similares às seqüências consensos a uma maior força do promotor (Kiryu *et al.*, 2004). Assim, divergências destas seqüências podem afetar a ligação da RNAP e a formação do complexo aberto (Berezhnoy & Shckorbatov, 2005) pela modificação da curvatura e da energia de ligação da RNAP ao DNA (Janga *et al.*, 2006).

que mudanças nesse espaçamento modificam a força do promotor. Outros elementos que aumentam a taxa transcricional são as seqüências *upstream* ao hexâmero – 35, que são ricas em A+T (Ross *et al.*, 1998 e Berezchnoy & Shckorbatov, 2005). Esses elementos, de acordo com Gourse *et al.* (1986), estimulam a transcrição em até 20x. O trabalho de Shawmn (1998) demonstrou que as seqüências UP que foram criadas “*in vitro*” aumentam cinco vezes mais a força do promotor do que comparando com a seqüência UP natural do promotor *rrnB P1*. Bauer *et al.* (1988) estudaram o promotor *pleuV* do operon de tRNA de *E. coli* examinando derivados deste promotor “*in vivo*”, os quais eram ligados ao gene *cat* e ao gene *lacZ*. Demonstraram que quando se removiam seqüências a jusante da região +11, em relação ao ponto do início da transcrição, a atividade não era afetada. Por outro lado, removendo seqüências a montante da região - 39 tinha uma redução da expressão de 10x mais.

1.2. Como obter seqüências promotoras?

As seqüências promotoras utilizadas nos cassetes de expressão podem ser obtidas a partir de organismos ou sinteticamente. Em ambos os casos, utilizam-se vetores caça-promotor que irão selecionar as seqüências com função promotora.

A construção sintética permite estudar a diferença da regulação da transcrição a partir de mutações. Jensen e Hammer (1998) construíram uma biblioteca de promotores sintéticos com atividade variável, por introdução de seqüências flanqueadoras às seqüências consenso -35 e -10 de promotores bacterianos. Um dos métodos de criação de mutações consiste da construção de bibliotecas de promotores sintéticos por meio do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de baixa fidelidade (*Error prone PCR*) o qual cria seqüências promotoras com mutações aleatórias.

No caso de uso de seqüências naturais, o material genético é digerido em inúmeros fragmentos de tamanhos diferentes. O interessante é que serão submetidas, a análise, seqüências que podem ter ou não, originalmente, função promotora (Dillard & Yotther, 1991). Trabalhos como de Dillard & Yotther (1991) identificaram a atividade promotora de seqüências geradas randomicamente, a partir da digestão com uma enzima de restrição de corte freqüente, do microorganismo *Streptococcus pneumoniae*. Entretanto, nesse trabalho não foi realizada a análise das seqüências com atividade promotora. Dhandayuthapani *et al.* (1998) analisaram cinco seqüências de *Mycoplasma pneumoniae* e duas de *M. genitalium*

que apresentaram atividade promotora em *E.coli*. Gupta, *et al.*, em 1993, verificaram a incidência, em *Mycobacterium tuberculosis*, de seqüências promotoras fortes para *E.coli*. Pátek *et al.*(2002) realizaram a identificação de atividade promotora de segmentos do genoma de *Corynebacterium glutamicum* e Piao *et al.*, em 2004, identificaram 17 fragmentos de *Propionibacterium freudenreichii*.

1.2.1. Vetores de Seleção de Promotores (VSP) ou caça-promotores

Vetores são veículos de clonagem utilizados na Engenharia Genética para a inserção de DNA exógeno dentro de um hospedeiro. A grande maioria são moléculas com replicação autônoma que apresentam marca de seleção, sítios únicos para enzimas de restrição que facilitem sua ligação ao DNA exógeno e origem de replicação para o hospedeiro (Astolfi- Filho *et al.*, 1985).

Devido sua fácil manipulação e a grande variabilidade de aplicações, os plasmídeos são os vetores mais simples e amplamente utilizados (Bataus, 1991). Estes consistem de DNA genético circular, extracromossomal, geralmente multicópia e encontrados tanto em *Archaea*, *Bacteria*, quanto em *Eukarya* (Woese *et al.*,1990).

A construção do plasmídeo pBR322 por Bolívar e Rodrigues no final da década de 70 deu origem a maioria dos plasmídeos hoje existente (Bataus,1991). O pBR322 possui genes de resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, com sítios únicos de restrição para uso em experimentos de clonagem, origem de replicação e um tamanho pequeno (4.363pb), razão pela qual é considerado um bom vetor de clonagem (Balbás, 1986).

Os vetores podem ser utilizados para várias finalidades que incluem seleção de clones recombinantes, seleção de origem de replicação, seleção de seqüências promotoras, expressão ou ainda expressão e secreção de uma proteína.

Os vetores caça-promotores contém em sua estrutura um gene repórter, desprovido do próprio promotor, justaposto a uma região de um ou mais sítios de clonagem (Bataus, 1991). Dessa forma, quando a seqüência promotora é inserida, possibilita a expressão do gene repórter e quantificação de tal expressão (Hautefort & Hinton, 2000).

Farinha, em 1989, construiu dois VSPs, o pQF40 e o PQF26 a partir do plasmídeo pRO1614, os quais continham o gene *tet* de resistência a tetraciclina e o gene *cat* de resistência a cloranfenicol, sem os promotores respectivamente. Brosius, em 1984, construiu o pKK232-8 (Figura 5), utilizando o gene *cat* como o gene repórter.

Cloranfenicol acetiltransferase (Cat) é a enzima responsável pela inativação (por acetilação) do antibiótico cloranfenicol, tornando as células resistentes a tal droga (Schlünzen *et al.*, 2001). Este vetor, com tamanho de 5094pb, contém múltiplos sítios de clonagem, gene de resistência à ampicilina, origem de replicação proveniente do plasmídio pBR322, gene *cat* do plasmídio pCM71 e outras regiões oriundas dos plasmídeos pKK3535 e pKK9-4. O pKK232-8, o qual será utilizado neste trabalho, apresenta inovações importantes em sua estrutura, tais como: terminadores fortes de transcrição que impedem a transcrição do gene *cat* por outros promotores existentes no vetor e códon de terminação da tradução nas três fases de leitura (a montante da região estrutural do gene CAT e a jusante dos sítios de clonagem). Desta forma não ocorre formação de proteínas híbridas com a proteína CAT garantindo que a expressão do gene *cat* esteja associada somente com a seqüência promotora clonada (Figura 5).

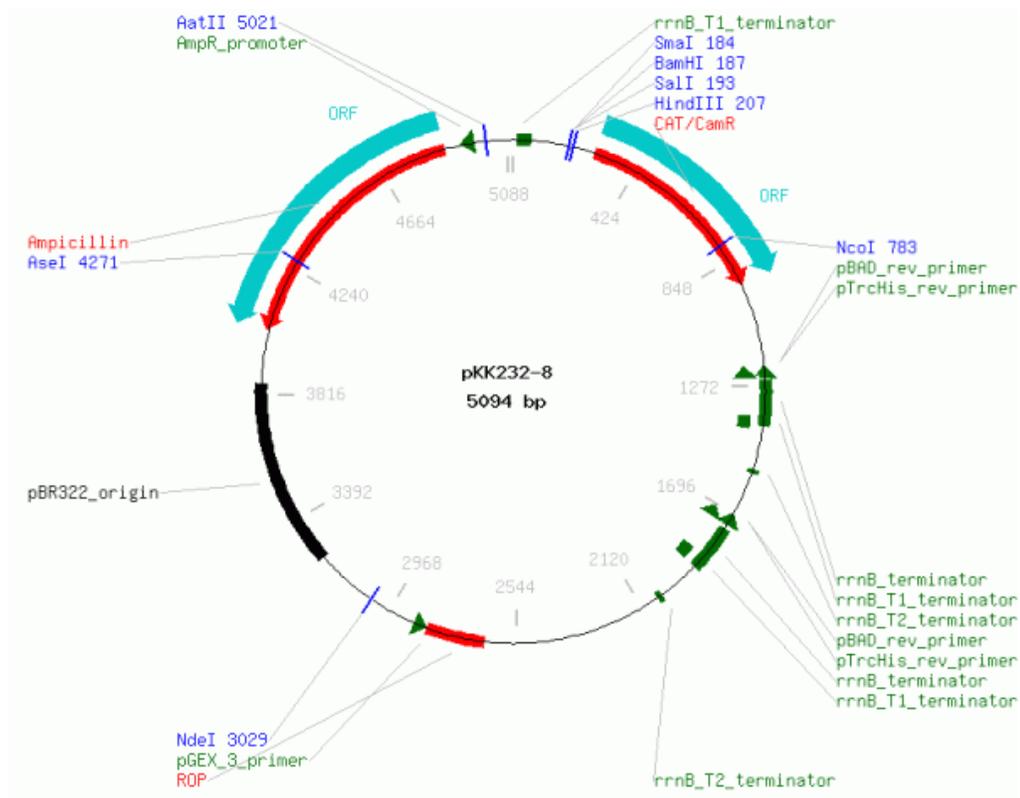


Figura 5- Representação esquemática do plasmídeo caça-promotor pKK232-8 utilizado para obtenção de seqüências promotoras.

Nesse trabalho foi utilizado como fonte de material genético, plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum* CVT2, clone isolado no Rio Negro, nas imediações do Hotel Tropical (Manaus, AM). Essa bactéria é gram-negativa, saprófita, pertencente à família Neisseriaceae (Ordem Neisseriales, Classe Betaproteobacteria) e é encontrada em águas e solos das regiões tropicais e subtropicais do mundo (Chattopadhyay *et al.*, 2002), sendo amplamente encontrada no Rio Negro (Haselkorn R, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Clonagem e análise de seqüências promotoras de *Chromobacterium violaceum* CVT2 funcionais em *E. coli*.

2.2. Objetivos Específicos

- Digerir o plasmídio natural de *Chromobacterium violaceum* CVT2 com *Sau3AI*;
- Clonar as seqüências no múltiplo sítio de clonagem do vetor caça-promotor pKK232-8;
- Obter clones resistentes a cloranfenicol;
- Determinar a seqüência nucleotídica dos promotores clonados;
- Selecionar promotores para o desenvolvimento de novos vetores de expressão para *E.coli* e *Chromobacterium violaceum* CVT2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Linhagens de *Escherichia coli*

A linhagem de *E. coli* utilizada neste trabalho foi a TOP10 (Invitrogen), que apresenta o seguinte genótipo: $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\Delta(ara-leu)$ 7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str^r*) *endA1* *nupG*.

3.1.2. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados foram os: plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum* CVT2 e vetor caça-promotor pKK232-8. O vetor pKK232-8 contém 5094 pb e possui o gene *cat*, desprovido de seqüência promotora, como gene repórter, flanqueados por terminadores de transcrição do tipo *rrnB_t1* e *rrnB_t2*. Possui, ainda, o gene que confere resistência a ampicilina como marcador de seleção.

3.1.3. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2. S1 e S2 correspondem aos oligonucleotídeos usados para amplificar regiões que flanqueiam a seqüência promotora e também para seqüenciar os fragmentos clonados.

Tabela 2- Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.
S1:*reverse*;S2:*forward*

	Seqüência 5' → 3'	Tama	Tm
S1	GGGTTATTGTCTCATGAGCGG	21	59,8
S2	GGTGTAACAAGGGTGAACACTATCC	25	61,7

3.1.4. Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram de grau analítico e compatível com o trabalho de biologia molecular (*molecular biology grade*). A água utilizada foi destilada e deionizada (água mili-Q).

As soluções foram esterilizadas a 120°C por 15 minutos ou, quando necessário, filtradas em membranas do tipo milipore com poro de 0,22µm.

3.1.5. Meios de cultura

A linhagem de *Escherichia coli* foi cultivada em meio LB líquido, meio LB sólido, meio SOB e em meio SOC. A composição de tais meios estão descritas na tabela 3.

Tabela 3- Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.

MEIOS CULTURA	DE	COMPOSIÇÃO
Meio LB (Luria-Bertani)		NaCl 1,0% Peptona 1,0% Extrato de Levedura 0,5% (pH 7,5)
Meio LB-Ágar		Meio LB adicionado de 1,5% (m/v) de ágar bacteriológico (pH 7,5)
Meio SOB		Triptona 0,2% Extrato de Levedura 0,5% NaCl 0,05% (pH 6,8 - 7,0)
Meio SOC		Meio SOB adicionado de: MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 10mM Glicose filtrada 20mM

3.1.6. Enzimas

As enzimas utilizadas foram *Sau3AI*, *Bam* HI, *Taq DNA Polimerase*, *Polinucleotídeo quinase*, *T4 DNA ligase*, *SAP* (*fosfatase alcalina de camarão*).

3.1.7. Tampões e soluções

Os tampões e soluções, com suas respectivas composições, estão listados na tabela 4.

Tabela 4- Tampões e soluções utilizadas, com suas respectivas composições.

SOLUÇÕES E TAMPÕES	CONSIDERAÇÕES
Ampicilina	Solução estoque: 10mg/mL. Solução de trabalho:100µg/mL (quando modificado será citado no teste).
Brometo de etídio	Solução estoque: 10mg/mL. Solução trabalho: 1 µg/mL
Cloranfenicol	Solução estoque: 10 mg/mL em etanol 70%. Solução de trabalho:100µg/mL (quando modificado será citado no teste).
Clorofórmio	hidratado
Clorofane	Fenol 1V; Clorofórmio 1V; β- hidroxiquinolina 0,05%, equilibrada com tampão T.E pH 7,5
Etanol	70% (V/V)
Fenol Saturado	Fenol 1V; β- hidroxiquinolina 0,05%, equilibrada com tampão T.E pH 7,5
Marcador Ladder	1000pb (1µg/µL)
MgCl₂	25 mM
NaCl	3,0 M
Solução I	Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM; EDTA 10 mM; RNase A 400 µg/mL
Solução II	NaOH 0,2M e SDS 1% (p/v)
Solução III	KAc.-Potássio 3 M, acetato 5 M.
Tampão de amostra de eletroforese 5x	Glicerol 30% (p/v) Azul de bromofenol 0,01% (p/v) TEB 5X
TBE	Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8,3

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção das seqüências promotoras

3.2.1.1. Extração de DNA plasmidial de *Chromobacterium violaceum*

Para a extração do DNA plasmidial, foi adaptado o protocolo de extração em pequena escala sem uso de clorofane (Sambrook *et al.*, 1989) cujos procedimentos executados foram:

- A partir da cultura crescida durante a noite centrifugou-se 3mL de cultura em um microtubo a 5000g/5min, descartando-se o sobrenadante;

- As células acumuladas no fundo do microtubo foram ressuspensas em 200µL de Tampão TE, e incubadas a temperatura ambiente por 5min.

- Foram adicionados 360µL de Solução II, responsáveis pela lise das células bacterianas, preparada na hora, misturado bem por inversão do tubo e mantido em temperatura ambiente por mais 5min.

- Adicionou-se 300µL de Solução III, que precipita o DNA cromossomal, misturou-se bem e incubou-se no gelo por 5min.

- Centrifugou-se o tubo a 12000g/5min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionou-se 750µL de isopropanol para precipitar o DNA e homogeneizou-se por inversão do tubo, deixando-o em repouso, em seguida, por 5min.

- Centrifugou-se o tubo a temperatura ambiente a 12000g/5min, e descartou-se o sobrenadante, retirando-se o excesso de álcool com o auxílio de uma micropipeta. Adicionou-se 1mL de etanol 70% a -20°C, sem ressuspender o sedimento, e centrifugou-se o tubo novamente por 5min.

- O sobrenadante foi descartado, e o sedimento secado por exposição ao ar e ressuspensado em 50 µL de tampão R, para redissolver o DNA e conservá-lo.

Eletoforese de DNA plasmidial. de C. violaceum em gel de agarose

A migração eletroforética do DNA em géis de agarose foi realizada em sistema de gel submerso em tampão TBE. O gel, a 0,8% foi preparado em TBE. As amostras (5 µL) a serem utilizadas foram misturadas com 0,2V de tampão de amostra 5X de eletroforese e aplicadas no gel. O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (90 a 110V) com

amperagem constante. As moléculas de DNA após coloração com brometo de etídeo foram visualizadas e fotografadas sob luz de onda ultravioleta (300 nm).

3.2.1.2. Cinética enzimática de *C. violaceum* CVT2

A cinética do isolado de *C. violaceum* CVT2 foi realizada com a enzima *SauA3I* (5'...GATC...3'), para qual foram estipulados os tempos zero, 3, 15, 30 e 60 minutos para interrupção da ação da enzima.

O sistema consistiu de um volume final de 75µL e esse sistema consistiu da seguinte forma:

H ₂ O (ultrapura)	46,5 µL
Solução Tampão 10X	7,5 µL
DNA	20 µL
<i>Sau3AI</i> (20U/ µL)	1 µL
Volume final	75 µL

A cada tempo estipulado as amostras de DNA plasmidial digeridas foram passadas imediatamente para um novo microtubo contendo 4µL de TEB 5X + 1µL de EDTA e aplicados em gel de agarose 0,8% para eletroforese.

3.2.1.3. Extração das enzimas pelo método de fenol/clorofórmio e precipitação dos fragmentos

Ao volume restante do sistema de digestão, adicionou-se volume de 1/20 de SDS 10% e homogenizou-se durante 3 minutos. Depois, adicionou-se igual volume de fenol, misturou-se por 5 minutos por inversão do tubo e centrifugou-se durante 3 minutos/12.000g. Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo, e adicionou-se igual volume de clorafane. Misturou-se por 5 minutos por inversão do tubo e centrifugou-se durante 3 minutos/12.000g. Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo, e adicionou-se igual volume de clorofórmio. Misturou-se por 5 minutos por inversão do tubo e centrifugou-se durante 3 minutos/12.000g. Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo. Adicionou-se volume de 1/10 de NaCl 3M, 1µL de glicogênio (2ug/µL) e 2,5 volume de Etanol 100% e deixou-se precipitando durante a noite a -20°C. No dia seguinte,

o precipitado foi coletado por centrifugação por 40 minutos a 12.000g. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de etanol 70% (-20°C) seguido de centrifugação a 12.000g/3min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento secado em capela de fluxo laminar vertical. Ao final, o sedimento foi dissolvido em 15 µL de água *milli-Q*. A seguir, 5 µL do material foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

3.2.2. Clonagem no vetor caça-promotor pKK232-8

3.2.2.1. Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina utilizando o Kit plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare Bioscience). Os clones de *E. coli* foram inoculados em 5mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina. A cultura foi incubada durante a noite (aproximadamente 16 horas) à 37°C sob agitação de 150 rpm. Uma alíquota de 3 mL da cultura foi transferida para um microtubo e centrifugada à 12000g por 30 segundos, em temperatura ambiente, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de solução I. A seguir, foi adicionado 200 µL de solução II, misturado por inversão várias vezes. Foram, a seguir, adicionados 400 µL de solução III e misturados por inversão do tubo várias vezes. Em seguida, centrifugou-se a 12000g por 5 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para uma coluna acoplada a outro tubo e centrifugou-se a 12000g por 1 minuto à temperatura ambiente. Descartou-se o centrifugado e adicionou-se, à coluna, 400 µL de tampão de lavagem e centrifugou-se por 30 segundos à temperatura ambiente. Descartou-se o centrifugado do tubo coletor e centrifugou-se o material da coluna novamente a 12000g por 1 minuto à temperatura ambiente. Transferiu-se a coluna a um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se, à coluna, 100 µL de água *milli-Q* e centrifugou-se a 12000g por 30 segundos à temperatura ambiente. O microtubo, contendo o DNA plasmidial, foi mantido a 4°C e o produto da extração foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.2.2. Sistema de digestão do plasmídio pKK232-8

O vetor pKK232-8 foi digerido com *Bam*HI por 2 horas a 37°C utilizando-se as seguintes proporções:

H ₂ O (ultrapura)	59 μL
Solução Tampão 10X	10 μL
BSA10X ()	10
DNA	20 μL
<i>Bam</i> HI (U/ μL)	1 μL
Volume final	100 μL

O produto de digestão (10μL) foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e fotografado sob luz u.v de 300nm.

3.2.2.3. Extração das enzimas pelo método de fenol/clorofórmio e precipitação dos fragmentos

Após a digestão, a enzima foi extraída do sistema pelo método de fenol clorofórmio e os fragmentos precipitados (conforme o descrito no item 3.2.1.3) e no final o material foi ressuspendido em 15 μL de H₂O. Em seguida, 5 μL foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e fotografado sob luz UV de 300nm.

3.2.2.4. Defosforilação do plasmídeo pKK232-8

O vetor digerido e precipitado foi defosforilado com a enzima SAP (fosfatase alcalina de camarão) por 30 minutos a 37°C. O Sistema de defosforilação continha:

Solução Tampão 10X	1,7 μL
DNA	14,8 μL
SAP (1U/ μL)	0,5 μL
Volume final	17 μL

Após a defosforilação a enzima foi inativada por 15 minutos a 65 °C.

3.2.2.5. Ligação dos fragmentos de DNA plasmidial de *Chromobacterium violaceum* CVT2 ao vetor PKK232-8

A ligação dos fragmentos digeridos de *Chromobacterium violaceum* CVT2 ao vetor caça-promotor linearizado foi realizada com:

Solução Tampão	1,5 µL
10X	
Inserto	1,5 µL
Vetor pKK232-8	1,5 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
(100U/ µL)	
Volume final	15 µL

O sistema de ligação foi incubado a 35° C por 30 minutos e a 16° C durante a noite. A enzima *Sau3AI* (inserto) tem uma seqüência de corte de 4 pares de base e a enzima *BamHI* tem uma seqüência de corte de 6 pares de bases (Tabela 5). A complementaridade entre os pares de bases GATC/CTAG proporciona a ligação do fragmento de DNA cromossomal ao DNA plasmidial.

Tabela 5- Enzimas de restrição e respectivas seqüências de corte.

Enzima	Seqüência de Corte
<i>Bam</i> HI	GGATCC CCTAGG
<i>Sau</i> 3AI	GATC CTAG

3.2.2.6. Transformação genética de *Escherichia coli* por eletroporação

a) Preparo de células *Escherichia coli* eletrocompetentes

O procedimento de preparo das células eletrocompetentes está esquematizado na figura 6.

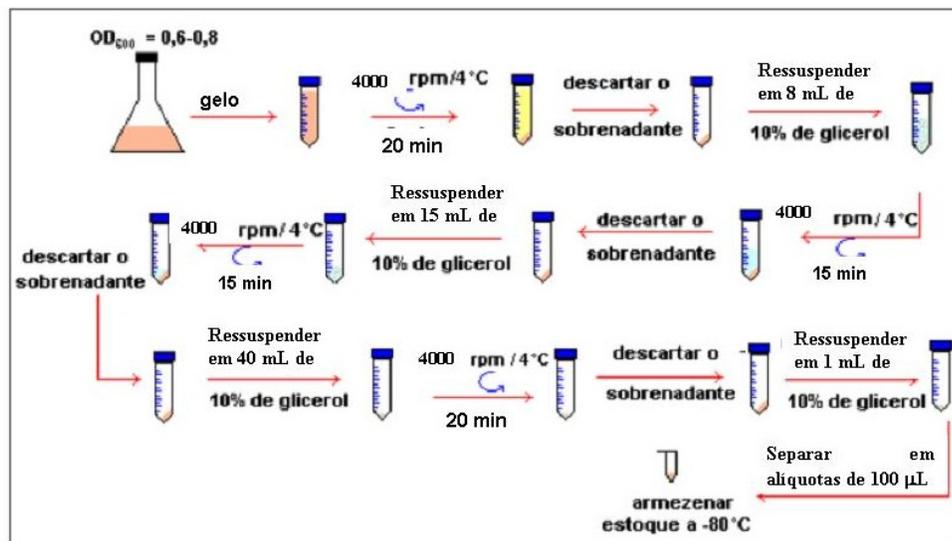


Figura 6- Representação esquemática do preparo de células eletrocompetentes.

Foi realizado um inóculo de células *E.coli* TOP10 (Invitrogen) em 20mL de meio SOB e incubado sob agitação de 150 rpm a 37°C durante a noite. Dessa cultura, 5 mL foi inoculado em 250 mL de meio SOB e a cultura incubada sob agitação de 150 rpm a 37°C até atingir $OD_{600} = 0,7$. Assim que OD foi alcançada, o frasco contendo a cultura foi esfriado no gelo por meia hora. Uma vez frio, a cultura foi dividida em tubos, cada um com 50 mL. As células foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado imediatamente e ressuspenso gentilmente até soltar o pellet, usando 8 mL de glicerol 10% estéril gelado. As células foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 15 min e o sobrenadante descartado. Os *pellets* foram ressuspenso em 15 mL de glicerol 10% frio e estéril, reunidos em um único tubo e centrifugados a 4.000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspenso o pellet em 40 mL de glicerol 10% frio e estéril e centrifugou-se por 20 minutos a 4000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso o *pellet* em 3 mL de glicerol 10% gelado e estéril e a concentração ajustada para 2,5 $OD_{600/mL}$. As células foram separadas em alíquotas de 100 µL, congeladas imediatamente em gelo e estocadas em freezer a - 70°C.

b) Procedimento de eletroporação

Uma alíquota do sistema de ligação (1µL) foi misturado em 100 µL células Top 10 (Invitrogen) eletrocompetentes e transferidos para a cubeta de eletroporação (0,2cm). Aplicou-se um pulso elétrico de 1900W, e imediatamente após o pulso, adicionou-se 500µL de meio SOC na cubeta, revigorando as células transformadas. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C com agitação (180 rpm). Em seguida, alíquotas foram plaqueadas em placas de petri com meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina (200µg/mL). Ao final do plaqueamento, as placas de Petri foram incubadas invertidas a 37°C durante a noite.

3.2.2.7. Obtenção dos clones recombinantes

Os clones transformantes foram submetidos a réplica-plate em placas de Petri com meio LB-sólido contendo ampicilina 100µg/mL e em placas de petri contendo cloranfenicol nas concentrações de 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 µg/mL. Foram utilizados, para essa técnica, palitos estéreis, os quais foram imediatamente descartados e autoclavados.

3.2.3. Análise dos clones recombinantes

3.2.3.1. PCR a partir dos clones recombinantes

Dos clones recombinantes, 12 foram amplificados com os *primers* S1 e S2, por PCR de colônia. Para isso os clones recombinantes e um clone com o pKK232-8 original foram inoculados em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (100µg/mL) e incubados sob agitação de 150 rpm a 37°C durante a noite. Desses, 250 µL foram misurados com 250 µL de glicerol 50% e armazenados em *freezer* -80. A PCR de colônia foi realizada com:

Células		2 μ L
H ₂ O (ultrapura)		6,05 μ L
Solução Tampão		1,25 μ L
10X		
MgCl ₂		1,25 μ L
DNTPs		1,25 μ L
S1		0,25 μ L
(10picoMoles/ μ L)		
S2		0,25 μ L
(10picoMoles/ μ L)		
T4	DNA	1 μ L
Polimerase		
Volume final		12,5 μ L

A reação em termociclador (*Eppendorf*[®], *MasterCycler gradient*) seguiu a termociclagem abaixo:

Temperatur	Ciclos	Tempo
94 °C	1	2 min
94 °C		20 s
58 °C	35	30 s
68 °C		2 min
4 °C	-	8

3.2.3.2. Crescimento em Meio Líquido

Dos clones recombinantes, 10 foram escolhidos para crescimento em meio líquido (LB) contendo o antibiótico cloranfenicol nas concentrações de 20, 50, 100, 200 e 500 μ g/mL. O crescimento foi acompanhado medindo-se a absorbância a 600 nm.

3.2.3.3. Extração de plasmídeos dos clones recombinantes

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina utilizando o Kit plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare Bioscience). Os clones de *E. coli* foram inoculados em 5mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina. A cultura foi incubada durante a noite (aproximadamente 16 horas) à 37°C sob agitação de 150 rpm. Uma alíquota de 3 mL da cultura foi transferida para um microtubo e centrifugada à 12000g por 30 segundos, em temperatura ambiente, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de solução I. A seguir, foi adicionado 200 µL de solução II, misturado por inversão várias vezes. Foram, a seguir, adicionados 400 µL de solução III e misturados por inversão do tubo várias vezes. Em seguida, centrifugou-se a 12000g por 5 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para uma coluna (com resina que adere o DNA) acoplada a um tubo coletor e centrifugou-se a 12000g por 1 minuto à temperatura ambiente. Descartou-se o centrifugado e adicionou-se, à coluna, 400 µL de tampão de lavagem e centrifugou-se por 30 segundos à temperatura ambiente. Descartou-se o centrifugado do tubo coletor e centrifugou-se o material da coluna novamente a 12000g por 1 minuto à temperatura ambiente. Transferiu-se a coluna a um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se, à coluna, 100 uL de água *milli-Q* e centrifugou-se a 12000g por 30 segundos à temperatura ambiente. O microtubo, contendo o DNA plasmidial, foi mantido a 4°C e o produto da extração foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.3.4. Análises das seqüências promotoras

a) Reação de sequenciamento

Baseando-se nos resultados das eletroforeses de plasmídeos, foi determinada a quantidade de DNA a ser usada na reação de sequenciamento. Utilizou-se o *kit* de sequenciamento (*DYEnamic ET TERMINATOR® AMERSHAM PHARMACIA™*) para sequenciamento a partir da extremidade 5'. Na reação de sequenciamento foram utilizados os seguintes reagentes para um volume final de 10µL:

Reagentes	Volume
Pré mix	4,0µL
<i>Primer</i> R1 Reverse (10ρmoles/µL)	1,0µL
<i>Primer</i> S1 Foward (10ρmoles/µL)	1,0µL
DNA	4,0 µL

A reação em termociclador (*Eppendorf*[®], *MasterCycler gradient*), seguiu as seguintes condições:

Temperatura	Ciclos	Tempo
95°C	1	25s
95°C		15s
50°C	30	20s
60°C		80s
4°C	-	8

b) Precipitação e determinação das seqüências de nucleotídeos

Os produtos da reação foram purificados por precipitação com etanol/acetato de amônio para retirada dos nucleotídeos não incorporados. Os *pellets* de DNA foram ressuspensos em 10µL de tampão de aplicação (*loading buffer*) e submetidos à eletroforese capilar no sequenciador automático *MegaBACE¹⁰⁰⁰ DNA Sequencing System* (*AMERSHAM/BIOSCIENCE*[™]).

3.2.3.5. Etapas de bioinformática

Os dados brutos provenientes do sequenciador de DNA foram submetidos e analisados pelos programas de *Base Calling* (*BaseCaller Cimaron 1.53 Slim Phredfy* e *ScoreCard* (*MegaBACE*[™]), os quais processam os dados gerados identificando as seqüências e atribuindo valores de qualidade para cada posição nucleotídica. Os *reads* selecionados foram submetidos em extensão de arquivo ABD e compactados para análise

via rede, no Laboratório de Bioinformática da Universidade de Brasília (UnB-www.biomol.unb.br) o qual utilizou o programa *Phred* para avaliação de qualidade de seqüenciamento e conversão dos arquivos binários (bin) para extensão fasta, phd e qual.

Após essas etapas as seqüências foram alinhadas usando o programa *Clustal.W* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) e submetidas ao programa *BPROM* (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) para identificação das regiões -10 e -35 das seqüências com função promotora. Estas mesmas seqüências nucleotídicas foram comparadas com outras mantidas em banco internacional de dados de genes (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos plasmídeos

Nas figuras 7 e 8, respectivamente, observa-se os produtos da extração plasmidial de *Chromobacterium violaceum* e de pKK232-8 utilizados neste trabalho. Como pode ser observado na figura 8, as diversas bandas indicam a presença de mais de um tipo de plasmídeo de tamanho bem maior que o do pUC 19 (2686 pb) ou um só plasmídeo com diversas formas topológicas (super-hélices). A fluorescência observada, de material retido no poço e rastro fluorescente entre as bandas, pode indicar contaminação com DNA cromosomal, o que se pode esperar pelo fato da metodologia utilizada não ser totalmente eficiente na eliminação do DNA cromosomal.

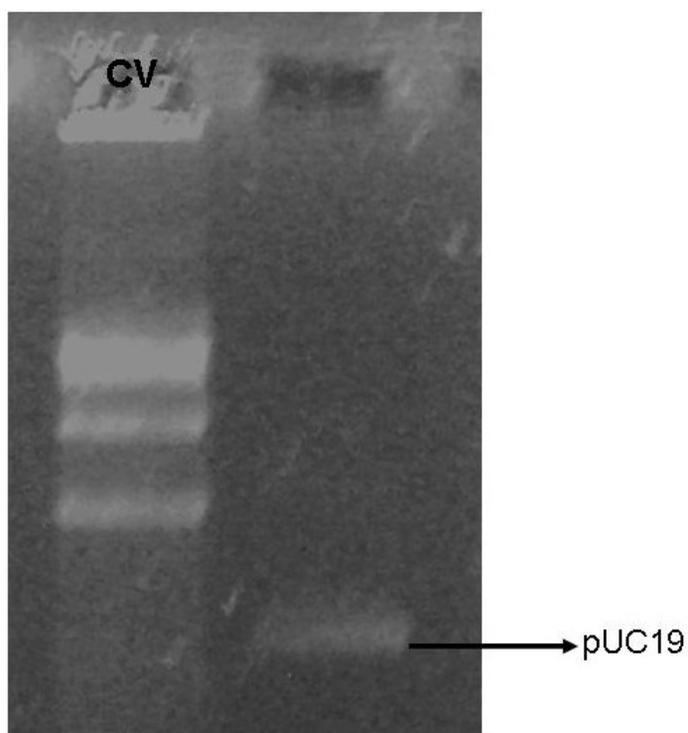


Figura 7- Perfil eletroforético dos plasmídeos extraídos da *Chromobacterium violaceum* CVT2 (CV) em gel de agarose 0,8%.

Na figura 8 pode-se observar o perfil eletroforético de duas mini-extrações do plasmídeo caça-promotor pKK232-8, com predominâncias diferentes de formas topológicas (super-hélice e circular relaxada). A da direita apresenta maior teor da forma super-helicoidal.

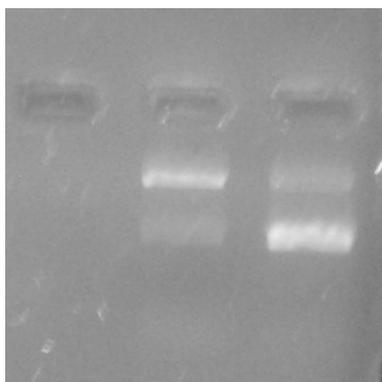


Figura 8- Perfil eletroforético de duas extrações do plasmídeo pKK232-8 (vetor caça-promotor) em gel de agarose 0,8%.

4.2. Clonagem de Fragmentos de DNA no Vetor Caça-Promotor

Para se produzir fragmentos de DNA da fração plasmidial extraída da linhagem de *C. violaceum* CVT2, para clonagem no vetor caça- promotor, inicialmente realizou-se uma cinética de digestão com a enzima *Sau3AI* (Figura 9). Observa-se que a partir de 15 minutos a digestão pode ser considerada completa (exaustiva). Como promotores de seres procariontes são de tamanho pequeno, decidiu-se clonar fragmentos produzidos por digestão exaustiva e por isso escolheu-se o tempo de digestão de 30min. Ainda, verifica-se que, na condição de digestão exaustiva, o DNA é fragmentado em sua maioria em fragmentos de 100 a 2000 pb.

O rastro entre as bandas bem definidas (DNA plasmidial) são provavelmente fragmentos oriundos da digestão do DNA cromosomal contaminante.

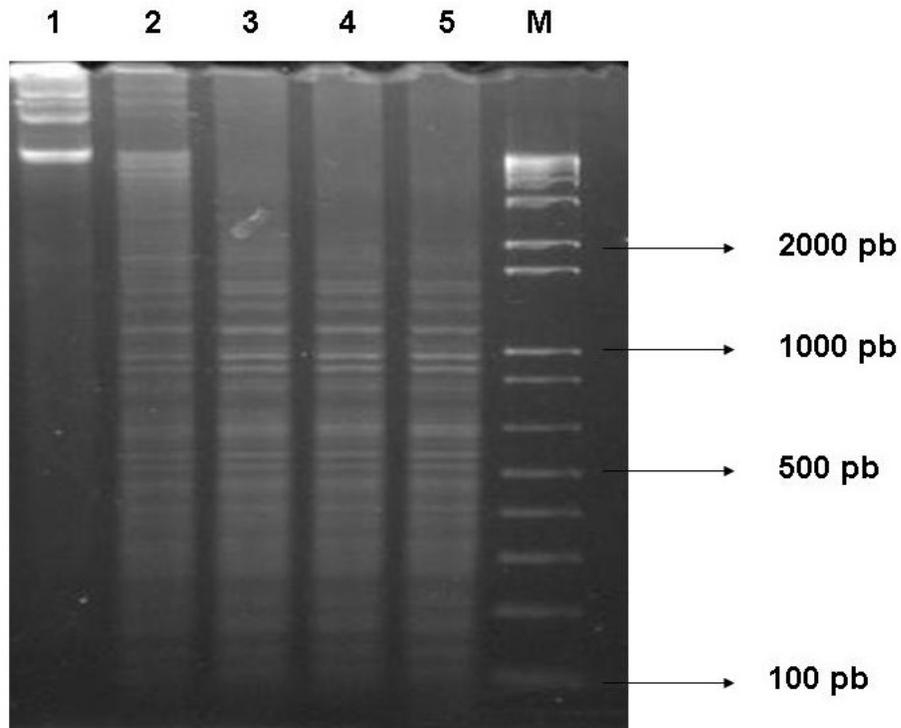


Figura 9- Perfil eletroforético de fragmentos de DNA produzidos durante a cinética de digestão dos plasmídeos de *C.violaceum* com a enzima de restrição *Sau3AI*. 1: Plasmídeo não digerido; 2: digerido por 3 minutos; 3: digerido por 15 minutos; 4: digerido por 30 minutos; 5: digerido por 60 minutos; M= marcador 1kb Plus da Invitrogen

Na figura 10 é mostrada a digestão do plasmídeo pKK232-8 com a enzima de restrição *Bam*HI, que corta no sítio de clonagem no vetor. Na figura temos material digerido comparado com o não digerido, apresentando perfis diferentes, sendo que o digerido apresentou como esperado uma única banda.

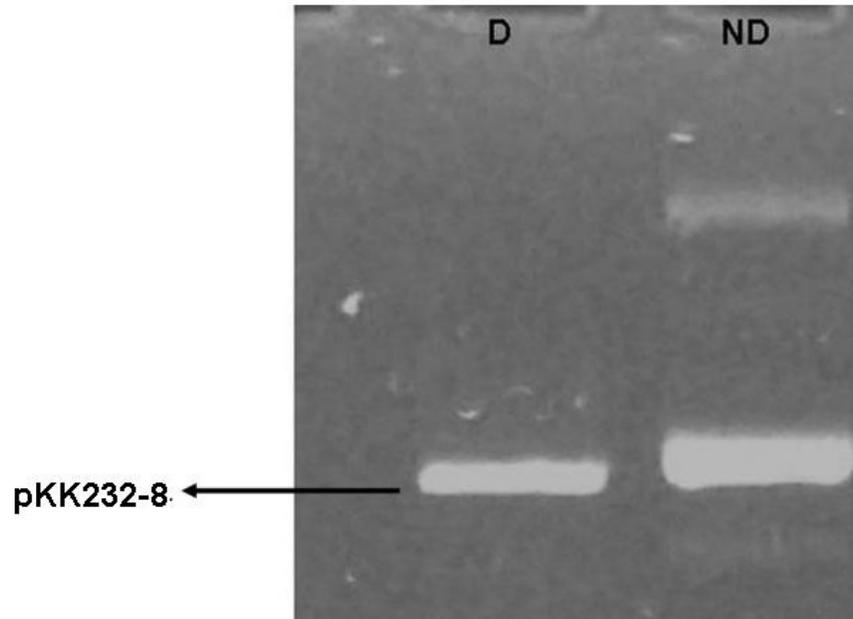


Figura 10- Perfil eletroforético do produto de digestão do plasmídeo pKK232-8 em gel de agarose 1%.
D: amostra digerida; ND: amostra não digerida.

Após a digestão do DNA plasmidial de *C.violaceum* e do pKK232-8 as enzimas foram extraídas pelo método do fenol/clorofórmio, e o DNA precipitado para melhoria da qualidade e concentração. Como mostra a figura 11, onde cerca de 1/3 do material disponível foi aplicado no gel, não houve uma grande perda de DNA (tanto do inserto quanto do vetor) durante o processo de purificação e precipitação dos sistemas de digestão, permitindo que o vetor caça-promotor pudesse ser então defosforilado e depois ligado aos insertos.



Figura 11- Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos de digestão do vetor pKK232-8 (A) e da fração plasmídial de *Chromobacterium violaceum* CVT2 (B) após os processos de extração e precipitação. M: marcador de 1 Kb, da Fermentas.

4.3. Obtenção dos clones recombinantes

Após a ligação, foram realizadas três transformações em células Top10 (Invitrogen), das quais se obteve 130 clones transformantes para a resistência à ampicilina. Quando estes foram submetidos à réplica-plate em cloranfenicol (Clf) nas concentrações de 20, 50, 100, 200 e 500µg/mL, apenas 51 demonstraram ser resistentes à cloranfenicol e, portanto recombinantes (39,23%), apresentando resistência ao antibiótico em pelo menos em uma das concentrações em estudo. Estes clones apresentam fragmentos funcionais na orientação apropriada, visto que esta é a condição fundamental para que cresçam nas condições de seleção (Denner & Spiegelman, 1986). Da réplica-plate em meio sólido (Tabela 6), 34 clones recombinantes (72%) apresentaram crescimento somente em 20µg/mL de cloranfenicol. Um número bem menor, 17 clones (36%), apresentou crescimento nas concentrações de 20 e/ou 50µg/mL. Apenas um clone (2%), denominado posteriormente de clone 43, apresentou crescimento nas concentrações de 20 a 200µg/mL (Figura 12). A grande maioria das seqüências mostrou ser capaz de garantir o crescimento apenas em 20µg/mL.

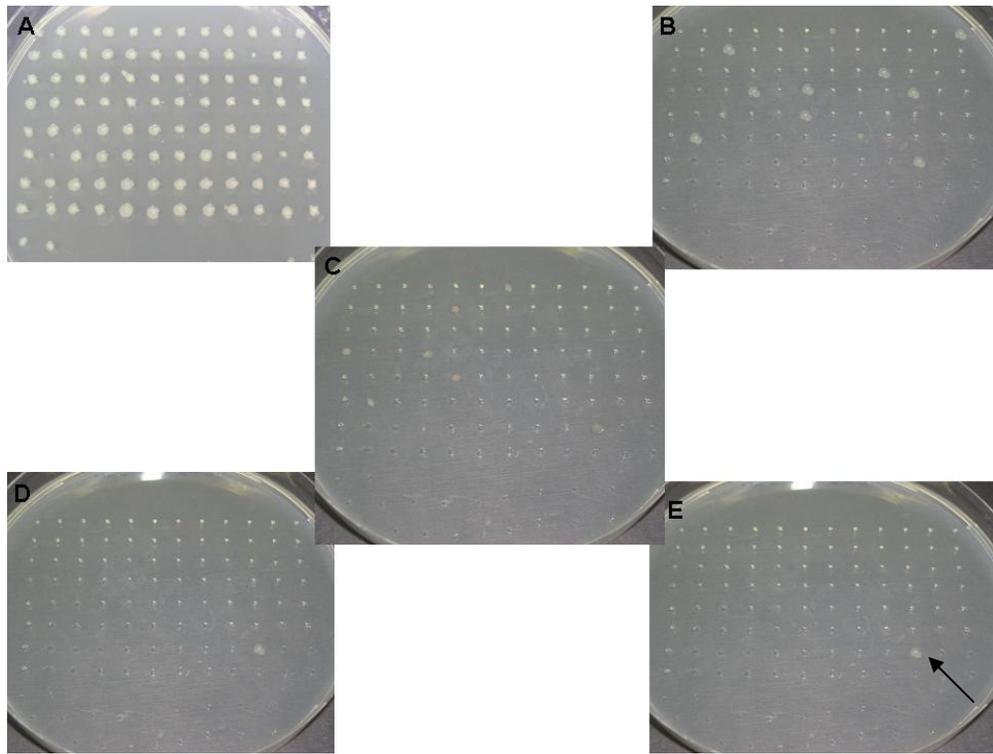


Figura 12- Réplica-plate em cloranfenicol e ampicilina dos clones transformantes com sistema de ligação dos fragmentos de *Chromobacterium violaceum* e o vetor pKK232-8. A seta indica o clone que cresceu a 20,50, 100 e 200 μ g/mL de cloranfenicol. A: placa com ampicilina (100 μ g/mL); B: 20 μ g/mL de cloranfenicol; C:50 μ g/mL cloranfenicol; D:100 μ g/mL; E:200 μ g/mL

Tabela 6- Clones recombinantes resistentes a diferentes concentrações de cloranfenicol. Os clones destacados com a cor vermelha foram os escolhidos para análise das sequências clonadas por sequenciamento. O sinal + indica o nível de crescimento: / colônias muito pequenas; + colônias pequenas; ++ colônias de médio tamanho; +++colônias grandes.

clone	20ug/ml	50ug/ml	100ug/ml	200ug/ml	500ug/ml
1	++				
2	+				
3	+				
4	++				
5	++				
6	+				
7	+				
8	/				
9	+				
10	+	+			
11	++				
12	+				
13	+				
14		++			
15	+				
16	++				
17	++				
18	+++				
19	+++				
20	+				
21	++	+			
22	++				
23	+	+			
24	+				
25	+				
26	+				
27	+	+			
28		/			
29	+				
30	++				
31	+				
32		+			
33	+				
34	+	/			
35		/			
36	+				
37	+				
38	++	/			
39	++	++			
40	++				
41	+				
42	+				
43	+++	+++	+++	++	
44		/			
45	/				
46	+				
47	+				

Foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho, clones que cresceram em 50µg/mL ou mais de cloranfenicol. Estes foram submetidos à PCR com os *primers* S1 e S2 (Figura 13) que amplificam uma região de 718 pb, flanqueadora do múltiplo sítio de clonagem do vetor caça-promotor. Todos os clones apresentaram *amplicons* com perfil eletroforético diferente do controle positivo. O controle positivo usado foi o vetor pKK232-8 sem região promotora (718pb). A maioria dos clones possui fragmentos relativamente pequenos, pois embora maiores, se diferenciaram muito pouco do vetor sem inserto, isso já era esperado visto que os fragmentos pequenos estavam em número maior durante o processo de clonagem. Contudo, fragmentos de grande tamanho foram inseridos, como as seqüências dos clones 23 e 43. O clone 23 apresentou cerca de 1500pb a mais que o controle positivo e o clone 43 cerca de 400 pares de base.

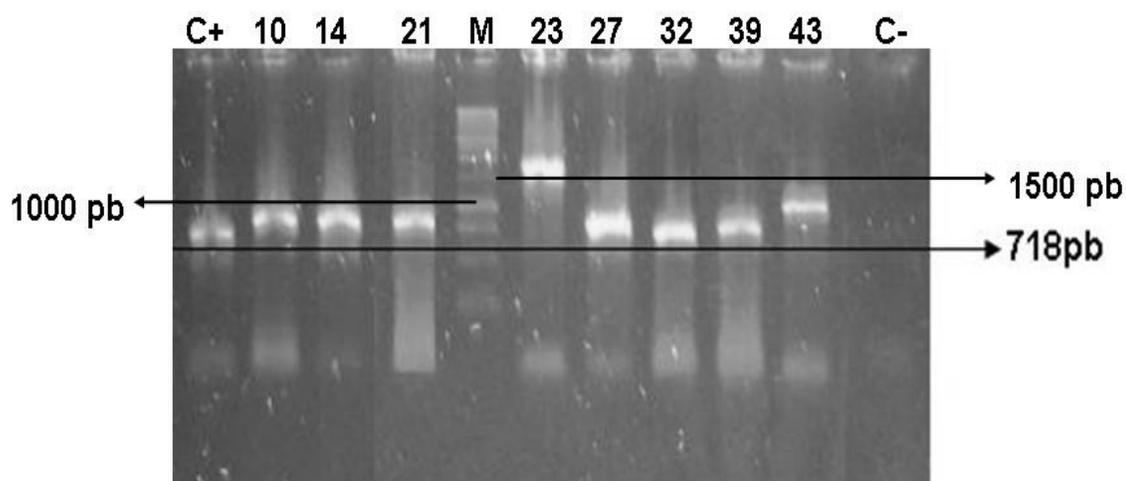


Figura 13- Perfil eletroforético dos produtos de amplificação a partir dos plasmídeos recombinantes (numeração arábica) em gel de agarose 1%. C+: pKK232-8 (*Amershan Pharmacia*); C-: controle negativo; M: marcador de 1 Kb, da *Fermentas*.

Os clones escolhidos para amplificação demonstraram possuir seqüências com função promotora, visto que cresceram em cloranfenicol. Isto foi confirmado pelo fato de terem seqüências amplificadas maiores que a do controle (Figura 13). Confirmada a presença de seqüência, esses clones foram cultivados em meio líquido (LB) contendo cloranfenicol nas mesmas concentrações utilizadas na réplica-plate. Os gráficos mostram os valores de cada leitura de absorbância a 550nm de dois pontos, um inicial (t0) e outro (t1), após 24 horas de cultivo. O clone controle, representado pelo vetor caça-promotor, teve o

resultado esperado, pois não apresentou crescimento, uma vez que o gene que confere resistência ao Clf se encontra desprovido de qualquer seqüência com função promotora.

Quando comparados os resultados da réplica-plate com os obtidos em crescimento líquido, foram verificadas divergências no crescimento dos clones. Diferentemente do ocorrido em placa, o clone 10 (Gráfico A da Figura 14) apresentou um crescimento melhor na concentração de 20µg/mL. Já o clone 14, que teve ausência de crescimento em placa na concentração de 20µg/mL, demonstrou maior capacidade de replicação nessa concentração que na de 50µg/mL (gráfico B da figura 14). Entretanto, ambos os clones não cresceram em meio líquido com 100µg/mL de cloranfenicol (Figura 14), o que também ocorreu em placa, crescendo apenas com 20µg/mL e 50µg/mL de cloranfenicol.

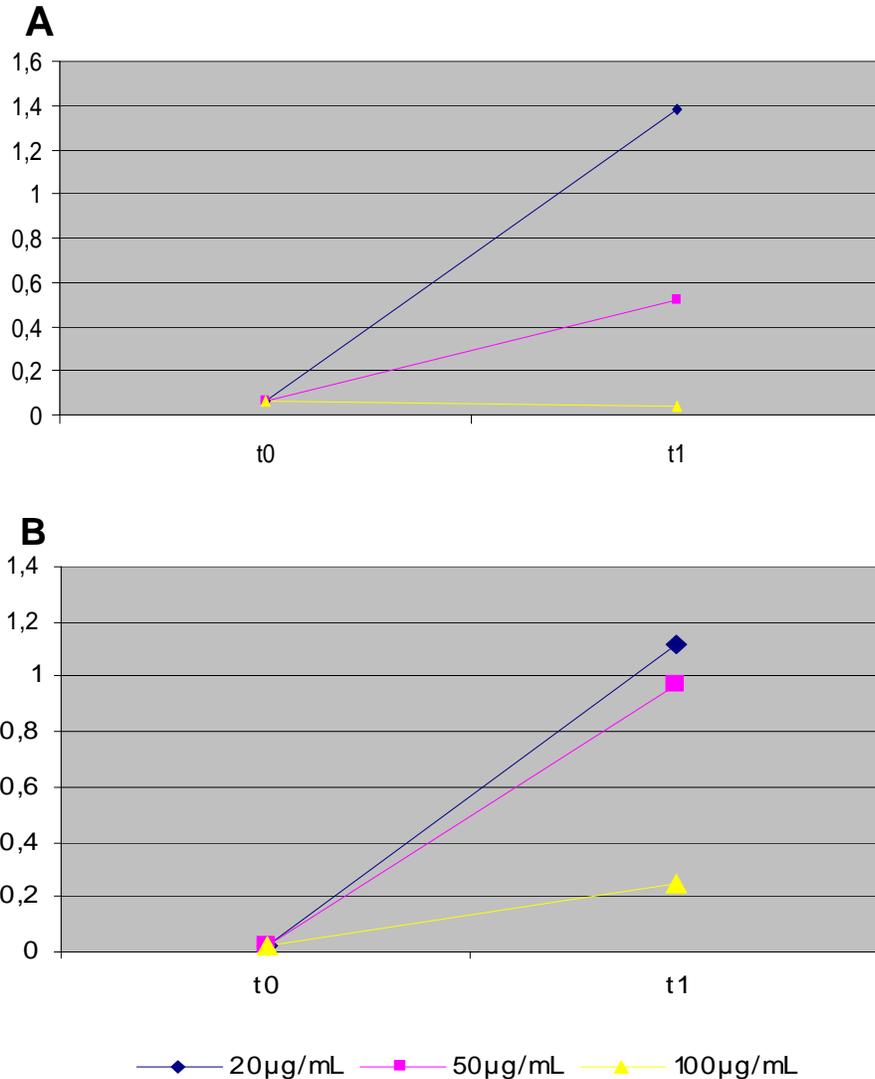


Figura 14- Representação gráfica do crescimento em meio líquido LB dos clones 10(A) e 14(B), nas concentrações de 20 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL.

Conforme o apresentado nos gráficos da Figura 15, os resultados do crescimento dos clones 21, 23, 27 e 32 em meio líquido também divergiram do obtido em placa. Em placa, a concentração máxima em que houve viabilidade celular foi a de 50µg/mL. Já em meio líquido, o clone 27, cresceu na concentração de 100µg/mL (Gráfico C da Figura 15), demonstrando que a seqüência clonada tem uma força maior que a esperada. Os demais clones continuam classificados como portadores de promotores fracos, pois foram viáveis na concentração máxima de 50µg/mL (Gráficos A, B e D), embora tenham apresentado maior densidade celular na concentração de 20µg/mL.

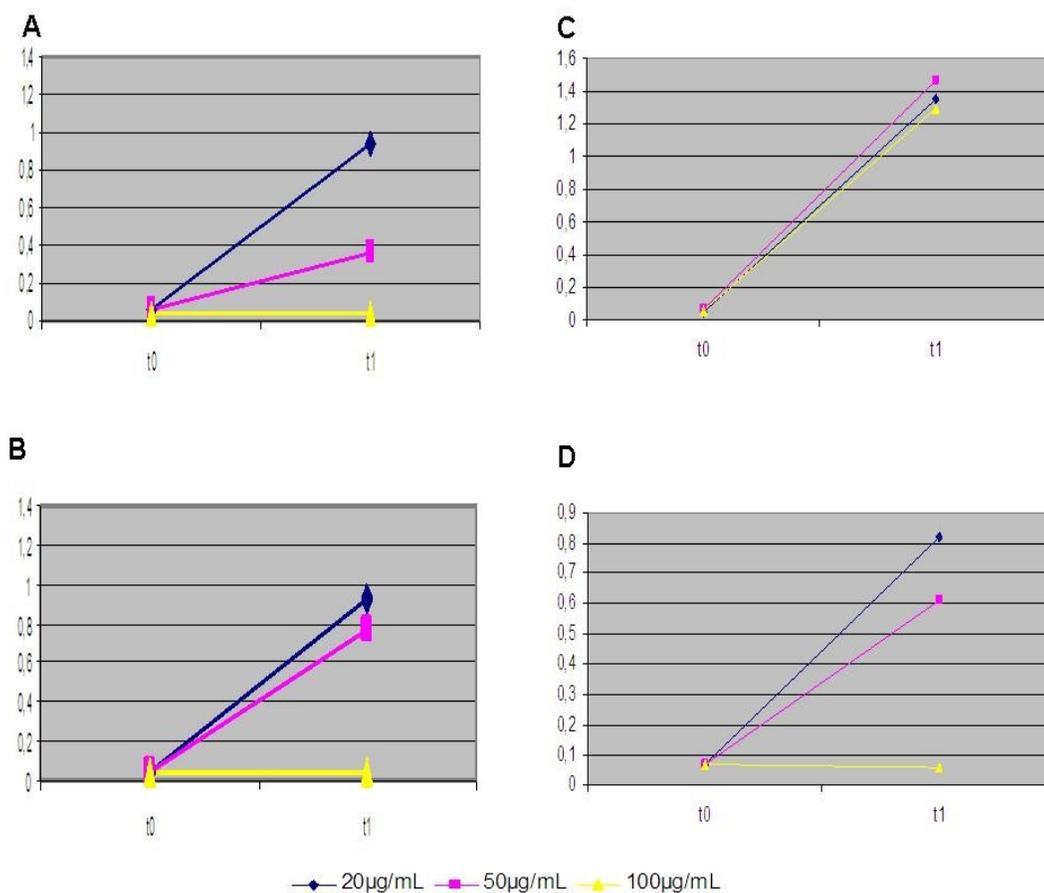


Figura 15- Representação gráfica do crescimento em meio líquido LB dos clones 21 (A), 23(B), 27(C) e 32 (D) nas concentrações de 20 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL.

A Figura 16 refere-se ao crescimento, em meio líquido, dos clones 39 e 43. Diferentemente do observado em placa, o clone 39 (Gráfico A) demonstra possuir uma seqüência promotora de força intermediária, crescendo na concentração de 100µg/mL de cloranfenicol. O clone 43, que já demonstrava possuir uma seqüência promotora mais forte, por ter apresentado crescimento na presença de cloranfenicol na concentração de 200µg/mL (Dillard& Yother, 1991), teve o resultado ratificado em meio líquido, com a diferença que nesse sistema o clone apresentou crescimento, apesar de lento, na concentração de 500µg/mL (Gráfico B).

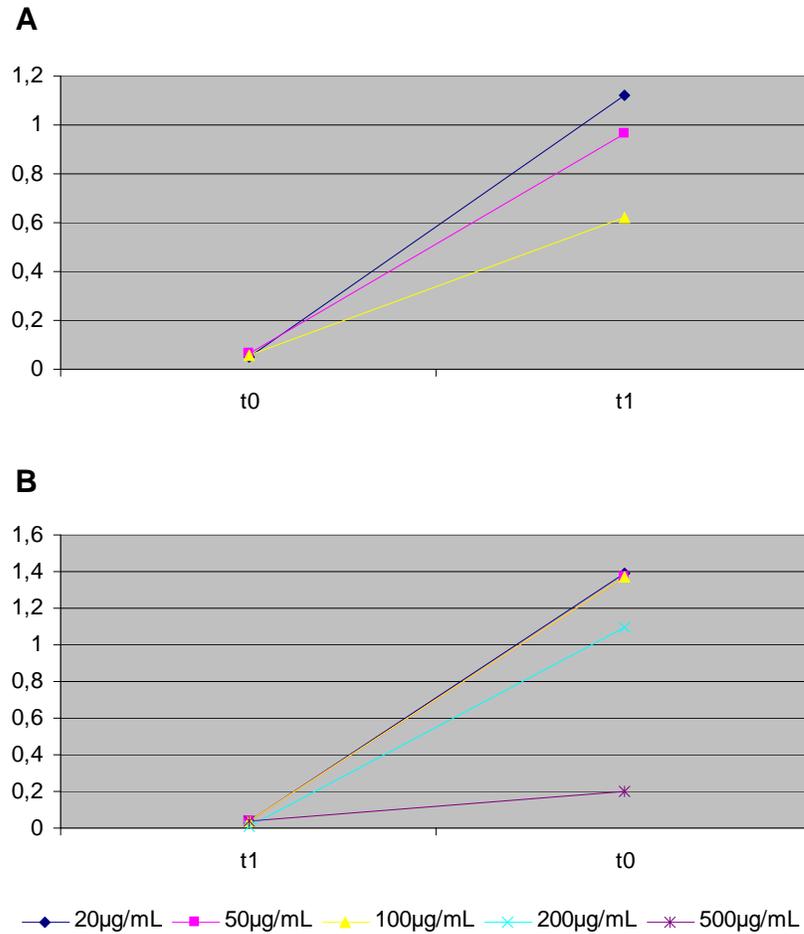


Figura 16- Representação gráfica do crescimento em meio líquido LB dos clones 39 (A) e 43 (B), nas concentrações de 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 500 µg/mL.

As diferenças observadas no crescimento em meio líquido, quando comparado ao crescimento em meio sólido, podem ser explicadas pela aeração e distribuição do próprio antibiótico, que são mais homogêneas no meio líquido, o que confere uma análise mais precisa quanto à resistência à Cloranfenicol.

4.4. Análise das seqüências promotoras

Os plasmídeos escolhidos foram extraídos (Figura 18) e submetidos ao processo de seqüenciamento automático de DNA.

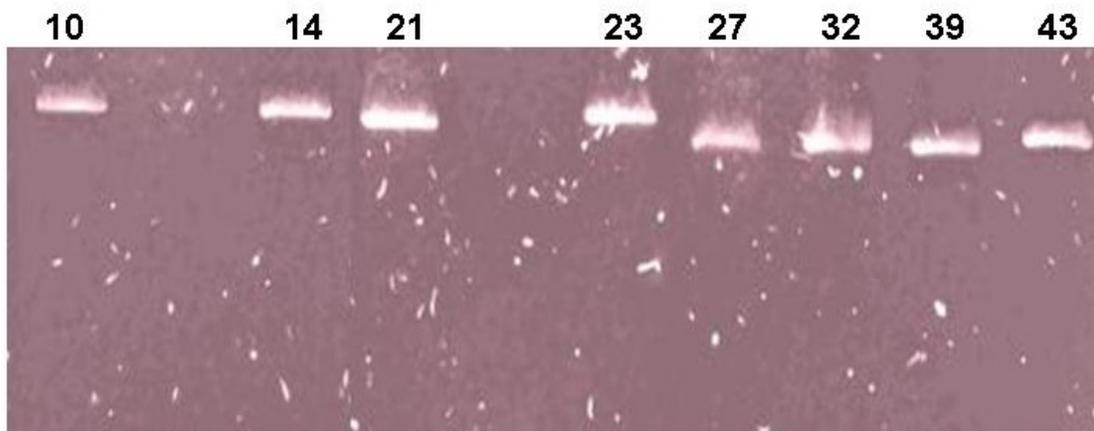


Figura 17 – Análise eletroforética dos plasmídeos recombinantes (10, 14, 21, 23, 27, 32, 39 e 43) utilizados para seqüenciamento automático de DNA.

Por segurança e garantia da qualidade do seqüenciamento, foram realizadas 96 reações a partir dos oito plasmídeos, variando-se as condições do seqüenciamento, como por exemplo as concentrações dos plasmídeo e dos *primers*.

Os oito plasmídeos extraídos dos clones escolhidos foram seqüenciados pelo método de Sanger *et al.* (1977) e a análise das seqüências pelo software *ScoreCard* está mostrada na figura 19. Das amostras submetidas, obteve-se 51 seqüências de boa qualidade com mais de 300 pb (em verde). No seqüenciamento foram gerados eletroferogramas onde foi avaliada a qualidade e o tamanho das seqüências de cada fragmento pelo software *BaseCaller cimaron 1.53 Slim Phred*.

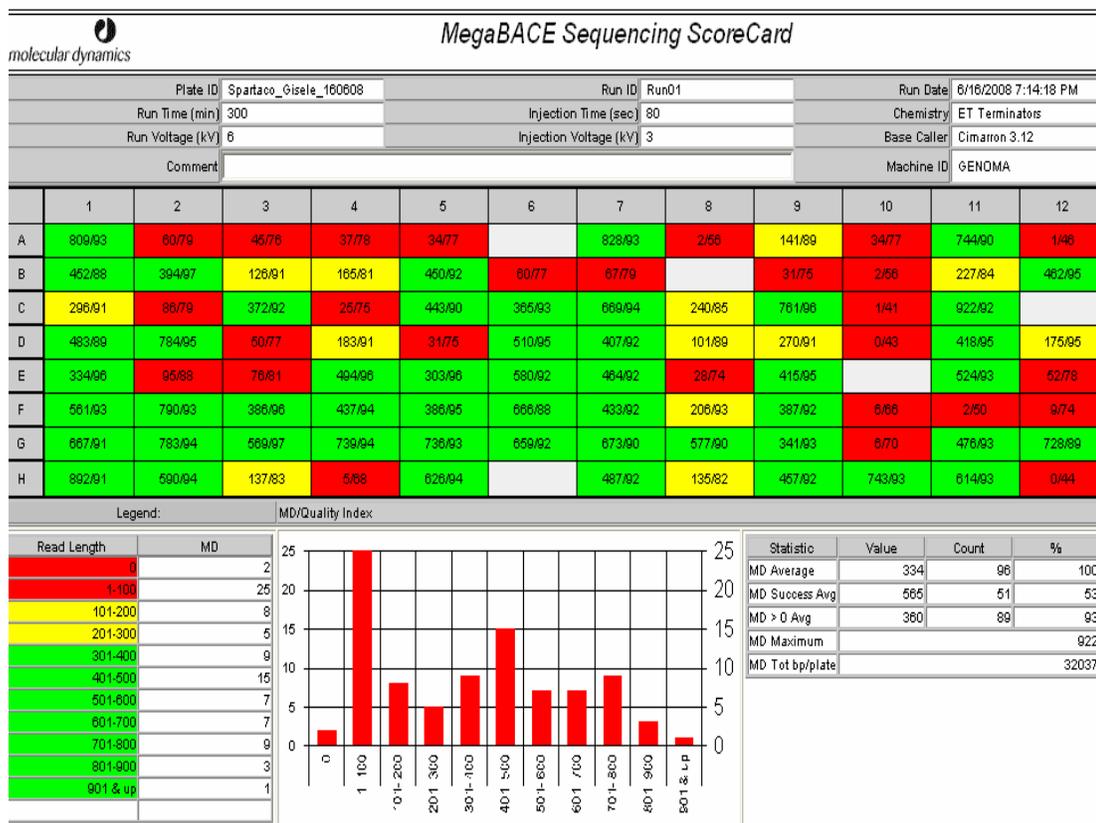


Figura 18 – Representação da qualidade do seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes (10, 14, 21, 23, 27, 32, 39 e 43) pelo software *ScoreCard*.

As seqüências obtidas foram submetidas ao conjunto *Phred/Phrap/Consed*, para a retirada de trechos com baixa qualidade e alinhadas por similaridade com o uso do programa *Clustal.W*. As bases divergentes da mesma seqüência foram analisadas conferindo-se diretamente nos cromatogramas gerados pelo MEGAbace. Das oito seqüências analisadas (Tabela 7), cinco estão completas (clones 10, 14, 27, 32 e 39). Como pode ser verificado na Tabela 7, nestas seqüências estão marcadas os sítios das enzimas de restrição *SmaI* (amarelo) e *Sal.I* (azul). Estes sítios se encontram imediatamente a jusante e a montante, respectivamente, do sítio de *BamHI* (onde foram clonadas as seqüências), o que confirma que as mesmas estão completas. As demais seqüências (clones 21, 23 e 43) encontram-se incompletas, tendo sido seqüenciado apenas parte delas, o que está de acordo com o padrão visualizado na amplificação dos insertos clonados (Figura 14), onde os maiores são os 23 e 43. No caso dos clones 21, 23 e 43, os grandes insertos clonados devem ser decorrentes de segmentos diferentes ligados entre si, o que é demonstrado pela presença de mais de um sítio de *Sau3AI* (destacados em vermelho na tabela 7).

Tabela 7- Sequências nucleotídicas dos promotores derivados de plasmídio de *C. violaceum*, com seus respectivos tamanhos em pares de base (pb). As seqüências destacadas de vermelho referem-se ao sítio de corte da enzima de restrição *Sau3AI*, enquanto as de amarelo referem-se ao sítio de corte da enzima de restrição *SmaI* e as de cinza ao de *Sal.I*

Clone	Seqüência	pb
10	<p> CCCCGGGGATCGAATCGACGTTTGCCACCGTACGGCACCGAACGA CGCGGACGCGCAACTGTGTGTCGCGCGCAACGTTCTGGGGCTG GCGTTCAAGCTGATTGAAGAGGCCGAAAAGTCCTGGCGGCGGAT CCGTCGAC </p>	128
14	<p> GTCGACGGATCGATGGACAGCTTGCCCTGCAGCAGCGGCACCGC GGTTTCCAGCTGCATCGGCCGGACAAAGGTCTGGTTCGCGCCAGG AGGCATGCCAGTCGTTGAAACGCAGGTTGTCGATCCCCCGGG </p>	117
21	<p> GTCGAGGATCCAGTTGAGTTCGAACGCCGTCGTTTCAGAGCTTA GTGCTTAACCCGCTGTCCACGGGGGCCGGACAGACCAAACCTGC CCTTGGCAAACGGGAGGCGCCATATAAGCCGCTCTTAGACCCG CTAACAAAATCTGTGATAAATCGCAGACAGATCCCTTGGCTTGC TACTTGTGCCT </p>	182
23	<p> GTCGACGGATCGGGCAAGGCGTTCCTCACCAGCGTCAGCGCCGC TTCCGCGGTGCCGGCGCGCAGCACATGGTGGCCGGCCTGGGCCA GGTTGAAGGCGATCGGGTTGGTCGTGCGCAAATGCACCCAGTGC TCCGCCGGGAAGTCGTAGAACGCCAACAGCGCGTCTTTA </p>	165
27	<p> CCCCGGGGATCGCTTCTGGGCTCGCTGTTCAATCAGGCCAAGCG CCGCCATGCGGAACGCTTTCAAGAGTCCGGCAAGGCCATCAACG ACAAGGTGCGGCTGTACTTGCAGATCCGTCGAC </p>	109
32	<p> GTCGACGGATCACGCCGGCGGCGATGGCGTTGCGCATCTTGCC AGCAGCGCCGCGTTGTCTCGCGAAATACTGGCGGCGCTCGGA GTGGCCGACCAGCGGTAGCGGCAGCCGACGTCGGCCAGCATC GCGGCGCTCACCTCGCCGGTGAACGCGCCGTCGGCGGAGAAAC GGCTGACGTCCTGGGAGGACAAGGCGATCCCCCGGG </p>	197
39	<p> CCCCGGGGATCACGTCCGCGTCGATACGCAGTGTGATTTGCTTCTT CGTGTCAGGCAGTCGATCCGTCGAC </p>	58
43 Forward	<p> CCCCGGGGATCATGTTGCTGGCTACGGTGCTGAACGCGGTCCGGCT TTGTCGTCAACGCGCTGGTGATCGGGTTGGTCGTGCGCAAATGC ACCCAGTGCTCCGGCGGGAAATCGTAGAAACGCCAACAGCGCG TCTTTATCCTTGACCAGCTTTTCCACAGCTTTCGGATATTTGGCCT CAAGCTGTGCAACCAACCGATCAGCACAGCTCTGAAAATTTTC CTGTTAGTGCTAAAAAC </p>	232
43 Reverse	<p> GTCGACGGATCGGGCGTCAGCCGCAGCTGGTAATGGCCAGCCGCC CCGGCCACCGGCAGCAGGCTGGCGGCGTTGAGCAAGGGATGGT CGGCCAGCGTTTTTTGCAAATCGTCCAGGCTCACCGGCTGAGTG GGCAGCGCCTGGTGCGATCAGGCCTCTTCGTTTTTAGCACTAACA GAAAAATTTCAAGAGCTGTGCTGATCGGTGGTGGCAGAG </p>	210

A figura 19 mostra o resultado encontrado ao submeter as seqüências ao programa *BLASTN*. Quatro seqüências apresentaram similaridade com genes cromossomais de *C. violaceum*. Isso pode ser explicado possivelmente pelo fato do procedimento de lise alcalina utilizado para extrair os plasmídeos não ser totalmente eficiente na eliminação do DNA cromossomal. No caso do clone 43, este apresentou duas seqüências, uma *reverse* (resultante do seqüenciamento com primer *reverse*) sem similaridade, indicando ser de origem plasmidial, e outra *forward* com similaridade ao gene de uma proteína de efluxo de aminoácidos de *C. violaceum*, confirmando que foram clonados simultaneamente dois fragmentos de DNA de origens diferentes.

Tabela 8- Resultado da análise de similaridade das seqüências obtidas pelo programa *Blastn*.

CLONE	SEQÜÊNCIA	BLASTN	Microorganismo
10	Total	X	
14	Total	Proteína hipotética conservada	<i>Cromobacterium violaceum</i>
21	Reverse	X	
23	Reverse	Fator de transcrição	<i>Cromobacterium violaceum</i>
27	Total	X	
32	Total	isomerase	<i>Cromobacterium violaceum</i>
39	Total	X	
43	Reverse	X	
43	Forward	Proteína de efluxo de aminoácido	<i>Cromobacterium violaceum</i>

A grande maioria dos clones resistentes a cloranfenicol obtidos nesse trabalho apresentou resistência a apenas 20µg/mL de cloranfenicol. Por causa da estrutura do caça-

promotor, o crescimento celular depende principalmente da força do promotor, o que indicaria que a maioria dos promotores por nós clonados são fracos, com exceção dos promotores dos clones 14, 27, 39 e 43. Entretanto, nenhum dos promotores classificados como fracos foram analisados quanto suas capacidades de serem regulados, por exemplo submetidos a algum tipo de indução. Além dos sistemas de indução clássicos (lactose, IPTG, arabinose ou tiptofano), os fragmentos clonados poderiam responder a outros fatores. Isso porque se sabe que em *C.violaceum* há genes que conferem resistência ao arsênio, cianeto, compostos halogenados (Carepo *et al.*,2004) e ao ferro (Hungria *et al.*, 2004).

Quando levamos em consideração a seqüência promotora em si inserida, acreditamos que seqüências com força baixa resultam em crescimento somente em concentrações mais baixas do antibiótico repórter. Entretanto, quando o promotor é muito forte, pode resultar em uma excessiva transcrição/tradução o que interferiria na replicação do plasmídeo e até mesmo na viabilidade celular. A força do promotor depende das características da própria seqüência promotora, que interfere na estabilidade da seqüência de DNA (Dillard & Yother, 1991), modificando a energia livre e as curvaturas *upstream* à região promotora (Kanhere & Bansal, 2005). As regiões promotoras são regiões menos estáveis e dobráveis do DNA, com acentuada curvatura em relação à região codificante (Kanhere & Bansal, 2005). Essas características permitem a ligação da RNA polimerase ao DNA (Nakata *et al.*,1988).

Similarmente aos nossos resultados, Gupta *et al.* (1993) verificaram baixa incidência de seqüências promotoras fortes para *E.coli* no DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. Entretanto, Dillard & Yother (1991), usando o vetor pKK232-8, verificaram que diversos fragmentos de DNA cromossomal e plasmidial de *Streptococcus pneumoniae* gerados aleatoriamente por enzima de restrição apresentaram atividades promotoras fortes (capazes de conferir resistência de 200µg/mL a 1600 µg/mL de cloranfenicol). Essas diferenças podem ser explicadas pela distância genética das espécies e a diferença de conteúdo GC nos respectivos materiais genéticos (Pátek *et al.*, 2002). Sabe-se que seqüências ricas em GC (*Mycobacterium e Streptomyces*) geralmente não são reconhecidas pelo fator σ^{70} *E.coli* (Pátek *et al.*, 2002). O maior número de AT na região promotora diminui a energia de interação entre os pares de bases, o que facilita a fusão da RNA polimerase à fita de DNA (Berezhnoy & Shckorbatov, 2005). Isso explicaria o porquê do fator σ^{70} , na maioria das vezes, requerer maior similaridade com as regiões -10 e -35. Entretanto, quando os fragmentos gerados são ricos em AT podem gerar uma instabilidade

no processo transcricional devido à presença de diversos sítios que mimetizam a região -10 de uma seqüência promotora reconhecida pelo fator σ^{70} (Pátek *et al.*, 2002). Dessa forma, a pequena quantidade de células recombinantes encontradas nesse trabalho, assim como a grande maioria das seqüências clonadas terem apresentado força promotora baixa, pode também ser explicada pelo fato das seqüências terem apresentado um alto conteúdo de GC (tabela 9). Esse alto conteúdo GC dificultaria o reconhecimento destas pelo fator σ^{70} de *E. coli* (Pátek *et al.*, 2002).

O alto conteúdo GC nos insertos obtidos é também uma explicação para a não identificação de regiões -35 e -10 pelo programa *BPROM* (Tabela 8). Isso porque a grande maioria dos promotores em bactérias gram-negativas (*E. coli*) e gram-positivas (*Bacillus subtilis*), reconhecidos pelo fator σ^{70} , caracterizam-se geralmente por possuir dois hexâmeros consensuais TTGACA e TATAAT localizados a 35 e 10 pb, respectivamente, a jusante do ponto de início de transcrição. Em cinco, das oito seqüências (14, 23, 27, 32 e 39) encontradas neste trabalho, não foram identificadas as regiões -35 e -10. Como pode ser verificado na tabela 8, o programa identificou regiões -10 e -35 em apenas três seqüências (10, 21 e 43), apesar das seqüências 21 e 43 não estarem completas. As seqüências 10 e 21 apresentaram região -10 com mais de seis pares de bases. Wönsten *et al.* (1998), ao identificar seqüências de *Compylobacter jejuni* com função promotora, encontrou TTTAAGTnTT como seqüência consenso para região -35, divergindo completamente do usual em *E. coli*. Entretanto, foram encontradas, no trabalho de Wönsten *et al.* (1998), seqüências *upstream* à região -35 e região estendida -10. Em nenhuma das seqüências não foi possível verificar a composição da região estendida -10, assim como a presença do nucleotídeo T na posição -7, já que não foi ainda determinado o ponto de início de transcrição. Este par de nucleotídeos é altamente conservado por ser o primeiro a ser desnaturado na dupla fita no início da transcrição (Schneider, 2001).

Dos três clones com seqüências que possuem regiões -10 e -35, somente o clone 43 cresceu em uma concentração maior que 50µg/mL de cloranfenicol, crescendo em até 500µg/mL. Deste inserto, só foi possível seqüenciar suas extremidades, e nas duas seqüências geradas encontrou-se dois promotores orientados na mesma direção com espaçamento de 17 pb, e regiões -10 e -35 com seis pares de bases. Na seqüência mais próxima ao gene *cat*, verifica-se a jusante da região -35 os trinucleotídeos AAA, TTT, AAT, ATT, TTA, TAA, TTC e TCA (destacado de verde na tabela 8), o que ocorre em seqüências fortes de *E.coli* (Kanhere & Bansal, 2005). A presença de dois promotores numa mesma orientação poderia acarretar uma ação sinérgica, como é o caso em operons

de rRNA. Nesses, há promotores arranjados em *tandem*, consistindo de duas regiões -35 e -10 separadas por cerca de 110 a 120 pb (Denner & Spiegelman, 1986). Já os clones 10 e 21, que cresceram em 20µg/mL e 50µg/mL apresentaram, além das regiões -35 e -10 diferentes das consensuais, um espaçamento de 14 pb entre estas regiões, o que não é tido como padrão para seqüências promotoras fortes.

Tabela 9- Análise das regiões -10 (em vermelho) e -35 (em azul) dos insertos clonados, pelo programa *BPRM*, com as concentrações máximas de cloranfenicol (Cfl) em que apresentou crescimento, tamanho do inserto em pares de base (pb) e se a seqüência está completa. A seqüência destacada de verde corresponde à região localizada a jusante da região -35.

Clone	Seqüência	Cfl(µg/ mL)	pb	Seqüência completa
10	CTAGCTTAGCTGCAAACGGTGGCATGCC GTGGCTTGCTGCGCCTGCGCGTTGACACA CAGCGCGCGTTGCAAGGACCCCGACCGC AAGTTCGACTAACTTCTCCGGCTTTTCAG GACCGCCGCCTAGG	50µg/m L	128	X
14	CTAGCTGTTGGACGCAAAGTTGCTGACCG TACGGAGGACCGCGCTGGTCTGGAAACA GGCCGGCTACGTCGACCTTTGGCGCCACG GCGACGACGTCCCCTTCGACAGGTAGCT AGG	100µg/ mL	117	X
21	TCCGTGTTTCATCGTTCGGTTCCTAGACAG ACGCTAAATAGCTGTCTAAAACAATCGC CCAGATTCTCGCCGAATATACCCGCGGA GGGCAAACGGTCCCCTCAAACCAGACA GGCCCGGGGGCACCTGTCGCCCAATTCG TGATTGAGACTTGCTGCCGCAAGCTTGA GTTGACCCTAGG	50µg/m L	182	
23	ATTCTGCGCGACAACCGCAAGATGCTG AAGGGCCGCTCGTGACCCACGTAAACG CGTGTGGTTGGGCTAGCGGAAGTTGGA CCGGGTCCGGCCGGTGGTACACGACGCG CGGCCGTGGCGCCTTCGCCGCGACTGCG ACCACTCCTTGCGGAACGGGCTAGG	50µg/m L	165	
27	CTAGCGAAGGACCCGAGCGACAAGTTAG TCCGTTTCGCGGCGGTACGCCTTGCGAAA GTTCTCAGGCCGTTCCGGTAGTTGCTGTT CCACGCCGACATGAACGTCTAGG	100µg/ mL	109	X
32	CTAGCGAACAGGAGGGTCTGCAGTCG GCAAAGAGGCGGCTGCCGCGCAAGTGGC CGTCCACTCGCGGCGCTACGACCGGCTG CAGCCGACGGCGATGCGCGACCAAGCCGG TGAGGCTCGCGGCGGTCATAAAGGCGCT CCTGTTGCGCCGCGACACCGGTTCTACG CGTTGCGGTAGCGGCGGCCGCACTAGG	50µg/m L	197	X
39	CTAGTGCAGGCGCAGCTATGCGTCACT AAACGAAGAAGCACAGTCCGTCAGCTAG G	100µg/ mL	58	X
43	F CTAGTACAACGACCGATGCCACGACTTG CGCCAGCCGAAACAGCAGTTGCGCGACC ACTAGCCCAACCAGCACGCGTTACGTTG		232	

43 GGTACGAGGCCGCCCTT**TAGCAT**CTTTG
 CGGTTGTCGCGCAGAAATAGGAACTGGT
 CGAAAAGGTGTCGAAAAGCCTATAAACCG
 GAGTTCGACAGCGTGGTTGGCTAGTCGTG
 TCGAGAACTTTTAAAAGGACAATCACGA
 TTTTG 500µg/
 mL 210
 R
 GACAGCGTGGTTGGCTAGTCGTGTCGAG
 A**ACTTTTAAAAGGACAATCACGATTTTG**
CTTCTCCGGACTAGCTGGTCCGCGACGGG
TGACTCGGCCACTCGGACCTGC**TAAACGT**
 TTTTGGCGACCGGCTGGTAGGGAACGAGT
 TCGGGCGTTCGGACGACGGCCACCGGCC
 CCGCGACCGGTAATGGTTCGACGCCGAC
 TCGGGCTAGGC

Tabela 10- Conteúdo GC/AT das seqüências obtidas. F:seqüência *forward*; R: seqüência *reverse*

Clone	A (%)	T (%)	C (%)	G (%)	AT (%)	CG (%)
10	17,19	20,31	33,59	28,91	37,50	62,50
14	18.80	17.95	29.06	34.19	36.75,	63.25
21	23.08	21.43	29.67	25.82	44.51	55.49
23	16.36	16.36	31.52	35.76	32.73	67.27
27	19.27	21.10	28.44	31.19	40.37	59.63
32	15.74	13.20	32.99	38.07	28.93	71.07
39	29.31	15.52	27.59	27.59	44.83	55.17
43_F	25.86	21.12	25.86	27.16	46.98	53.02
43_R	18.01	20.85	27.49	33.65	38.86	61.14,

Nas seqüências dos clones 14, 27 e 32, que estão completas, não foi possível encontrar as seqüências -35 e -10 pelo programa *BPROM*. A não identificação pelo programa não descarta a possibilidade delas existirem, pois os métodos computacionais perdem desempenho devido às características intrínsecas das seqüências analisadas, como por exemplo, o alto conteúdo de GC. Apesar de diferentes métodos computacionais serem

aplicados para descobrir os sítios de ligação da RNA polimerase a região promotora, o problema continua em aberto para os mais simples promotores (Cotik *et al*, 2004). Isto acontece devido a variabilidade dos *motifs*, que compreendem mais de um *submotif* arranjados de forma direta ou invertida, podendo ou não se apresentar em tandem (Cotik *et al*, 2004). Ainda, a forma como os *motifs* interagem entre si na região promotora e com a RNA polimerase, determinam a ativação ou inativação de um gene (Mouslim *et al*, 2003). A característica mais comum dos programas para identificação é a tendência de análise baseada na frequência de algum dos nucleotídeos, ou baseada na seqüência consenso, sem levar em conta a entropia relativa do sistema, os dois estados termodinâmicos: antes e depois da interação DNA-proteína (Pevzner, 2000). Além desse fato, não deve ser descartada a possibilidade de outros fatores sigma estarem envolvidos no reconhecimento da região promotora dos fragmentos clonados. No trabalho de Silva *et al*. (2004), os autores afirmam a presença de ORFs para os fatores s^E , s^{38} , s^{32} e s^N em *C. violaceum*. Estes fatores seriam responsáveis pela transcrição de genes envolvidos na resposta a diferentes estresses celular (Rechuva *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2000).

Os dados obtidos neste trabalho mostram a necessidade de serem realizados mais experimentos que revelem importantes aspectos do processo transcricional. Em vista disso, será feita a determinação do sítio de início de transcrição dos segmentos aqui obtidos, por *primer extension*. Com o sítio de início de transcrição identificado, será possível realizar uma análise das regiões promotoras de forma mais acurada. Além disso, serão clonados mais segmentos plasmidiais de *C.violaceum* a fim de se obter mais seqüências promotoras que possam ser utilizadas, assim como a seqüência presente no clone 43, na construção de vetores de expressão para *E. coli* e *C.violaceum*.

5. CONCLUSÕES

- ✓ A estratégia utilizada neste trabalho para obtenção de promotores a partir de *C.violaceum* permitiu o isolamento de 47 seqüências promotoras com forças e características estruturais diferentes.
- ✓ Apesar da obtenção de seqüências com as regiões -10 e -35, a grande maioria não apresentou similaridade com seqüências promotoras reconhecidas pelo fator σ^{70} .
- ✓ Das 47 seqüências promotoras, duas demonstraram ser de força intermediária, crescendo em até 100 μ g/mL, enquanto que uma demonstrou ser uma seqüência promotora forte, por ter crescido em até 500 μ g/mL.
- ✓ A seqüência promotora forte encontrada neste trabalho foi a única a apresentar os dois hexâmeros, um espaçamento entre os hexâmeros de 17 pares de bases e uma região a jusante do hexâmero -35 rica em A/T.
- ✓ A seqüência 46, devido a força promotora que possui, mostra-se com potencialidade para aplicações biotecnológicas, como construção de novos vetores de expressão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Astolfi-Filho, S.; Azevedo, J. L.; Azevedo, M. O. 1985. *Genética de microorganismos em Biotecnologia e Engenharia genética*. Piracicaba: Fealq.
- Barne, K. A.; Bown, J. A.; Busby, S. J. W.; Minchin, S. D. 1997. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the 'extended -10' motif at promoters. *EMBO Journal*. 16: 4034-4040.
- Balbás, P.; Soberon, X; Merino, E; Zurita, M; Lomeli, H; Valee, F; Barne, K.A.; Brown, J. A.; Busby, S. J. W.; Minchin, S. D. Region 2,5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase γ^{70} subunit is responsible for the recognition of the extended -10` motif at promoters. *EMBO J*, 16, 4034-4040, 1997.
- Bataus, L. A. M. 1991. *Construção de um vetor de seleção de promotores (VSP) para Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 87pp.
- Berezhnoy A. Y., Shckorbatov Y. G. 2005. Dependence of the *E. coli* promoter strength and physical parameters upon the nucleotide sequence. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B(11): 1063-1068
- Brosius, J.; Storela, J. 1984. Spacing of the -10 and -35 Regions in the tac Promoter. *The journal of Biological Chemistry*, 260(6): 3539-3541.
- Buck, M.; Gallegos, M. T.; Studholme, D. J.; Guo, Y.; Gralla, J. D. 2000. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *Journal of Bacteriology*, 182:4129-36.
- Candeias, J. A. N. 1991. A Engenharia Genética. *Revista saúde Pública*. São Paulo, 25(1): 3-10.
- Carbonelli, D. L.; Corley, E.; Seigelchifer, M.; Zorzópulos, J. 1999. A plasmid vector for isolation of strong promoters in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology*. 177: 75-82.

- Callaci, S.; Heyduk, E.; Heyduk, T. 1999. Core RNA polymerase from *E. coli* induces a major change in the Domain Arrangement of the σ 70 Subunit. *Molecular Cell*, 3: 229–238.
- Calos, M. P. 1978. DNA sequence for a low - level promoter of the *lac* repressor gene and an “up” promoter mutation. *Nature*, 274(24): 762-765.
- Camarero, J. A.; Shekhtman, A.; Campbell, E. A.; Chlenov, M.; Gruber, T. M.; Bryant, D. A.; Darst, S. A.; Cowburn, D.; Muir, T. W. 2002. Autoregulation of a bacterial sigma factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:8536-41.
- Chan, C. L.; Landick, R. 1994. New perspectives on RNA chain elongation and termination by *E. coli* RNA polymerase. In *Transcription: Mechanisms and regulation* pp 297 -321. *Raven Press*, New York.
- Chattopadhyay, A.; Kumar, V.; Bhat, N.; Rao, P. L. N. G. 2002. *Chromobacterium violaceum* Infection: A Rare But Frequently Fatal Disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(1):108-110.
- Dillard, J. P. & Yother, J. 1991. Analysis of *Streptococcus pneumoniae* Sequences Cloned into *Escherichia coli*: Effect of Promoter Strength and Transcription Terminators. *Journal of Bacteriology*, 173 (16): 5105-5109.
- Dhandayuthapani, S.; Rasmussen, W. G.; Baseman, J. B. 1998. Identification of mycoplasmal promoters in *Escherichia coli* using a promoter probe vector with Green Fluorescent Protein as reporter system. *International Journal on Genes and Genomes*, 215: 213–222.
- deHaseth, P. L.; Zupanic, M. L.; Record, M. J. 1998. RNA polymerase- promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *Journal of Bacteriology*, 180: 3019-3025.

- Dombroski, A. J.; Johnson, B. D.; Lonetto, M.; Gross, C. A. 1996. The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 8858-62.
- DrLica K. *et al.* 1999. Prokariotic DNA topology and gene expression. In: Baumberg, S. (Ed.). *Prokaryotic Gene Expression*. Oxford. p.141-168.
- Edelman, G. M.; Meech, R.; Owens, C. G.; Jones, F. S. 2000. Synthetic promoter elements obtained by nucleotide sequence variation and selection for activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28: 3038 – 3043.
- Farinha, M. A.; Kropinski, A. M. Construction of Broad host- range vectors for general cloning and promoter selection in *Pseudomonas* and *Escherichia coli*. *Gene*. 77, 205-210, 1989.
- Fenton, M. S. & Gralla, J. D. 2005. Function of the bacterial TATAAT -10 element as single-stranded DNA during RNA polymerase isomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16): 9020 – 9025.
- Gezvain, K. & Landick, R. The structure of bacterial RNA polymerase. Disponível em: <<http://www.bact.wisc.edu/landick>>. Acesso em: 15 de set. 2006.
- Gourse, R. L.; DE Boer, H. A.; Nomura, M. 1986. DNA determinations of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell*, 44:197–205.
- Gourse, R. L., Ross, W., Gaal, T. 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: role of the *α* subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Molecular Microbiology*, 37:687-695.

- Gralla, J. D. 1996. Activation and repression of *E. coli* promoters. *Current Opinion in Genetic*, 6(5): 526-530.
- Gupta, S. K.; Bashyam, M. D.; Tyagi, A. K. 1993. Cloning and Assessment of Mycobacterial Promoters by Using a Plasmid Shuttle Vector. *Journal of Bacteriology*, 175(16):5186-5192.
- Hartley, J. L. 2006. *Cloning technologies for protein expression and purification*
Current Opinion in Biotechnology 17:359–366
- Helmann, J. D. & Chamberlin, M. J. 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 839–872
- Helmann, J. D. & deHaseth, P.L. 1999. Protein-nucleic acid interactions during open complex formation investigated by systematic alteration of the protein and DNA binding partners. *Biochemistry*, 37: 5959-5967
- Hautefort, I. & Hinton, J. C. D. 2000. Measurement of bacterial gene expression in vivo. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 29: 601 – 611.
- Harley, D. K. & McClure, W. R. 1983. Completion and analysis of Escherichia coli promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 11: 2237-2255.
- Ishihama, A. 1981. Subunit assembly of Escherichia coli RNA polymerase. *Adv. Biophys*, 14: 1-35.
- Ishihama, A., N. Fujita, and R. E. Glass. 1987. Subunit assembly and metabolic stability of *E. coli* RNA polymerase. *Proteins* 2:42-53.

- Jacques, P. E.; Rodrigue, S. ; Gaudreau, L. ; Goulet, J.; Brzezinski, R. 2006. Detection of prokaryotic promoters from the genomic distribution of hexanucleotide pairs. *BMC Bioinformatics*.
- Jana, S. & Deb, J. K. 2004. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied and Microbiological Biotechnology*, 67: 289–298.
- Janga, S. C.; Lamboy, W. F.; Huerta A. M.; Moreno-Hagelsieb, G. 2006. The distinctive signatures of promoter regions and operon junctions across prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 34 (14): 3980–3987.
- Jensen, P. R. & Hammer, K. 1998. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol Bioeng*, 58:191-195.
- Jishage, M.; Iwata, A., Ueda, S.; Ishiama, A. 1996. Regulation of RNA Polymerase Sigma Subunit Synthesis in *Escherichia coli*: Intracellular Levels of Four Species of Sigma Subunit under Various Growth Conditions. *Journal of Bacteriology*, 178 (18): 5447-5451.
- Kanhere, A. & Bansal, M. 2005. Structural properties of promoters: similarities and differences between prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 33(10): 3165–3175.
- Kobayashi, M.; Nagata, K.; Ishihama, A. 1990. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: effect of base substitutions in the promoter 235 region on promoter strength. *Nucleic Acids Research*, 18: 7367–7372.
- Kiryu, H.; Oshima, T; Asai, K. 2004. Extracting relations between promoter sequences and their strengths from microarray data. *Bioinformatics*, 21(7), 1062 – 1068.

- Krummel, B.; Chamberlin, M.J. 1992. Structural analysis of ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase: Deoxyribonuclease I footprinting of defined complexes. *J. Mol. Biol.*, 225: 239-250.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M. M. 1995. Traduzido por Arnaldo A. Simões, Wilson R. Navega Lodi. 2 ed. São Paulo: Sarvier.
- Lonetto, M., M. Gribskov, and C. A. Gross. 1992. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of Bacteriology*, 174:3843-9.
- Lozinski, T.; Markiewicz, W. T.; Wyrzykiewicz, T. K.; Wierzchowski, K. L. 1989 Effect of the sequence-dependent structure of the 17 bp AT spacer on the strength of consensus like *E. coli* promoters *in vivo*. *Nucleic Acids Research*, 17: 3855–3863.
- Luo, J.; Sharif, K. A.; Jin, R.; Fujita, N.; Ishihama, A.; Krakow, J. S. 1996. Molecular anatomy of the β' subunit of the *E. coli* RNA polymerase: identification of regions involved in polymerase assembly. *Gene to Cells*, 1: 819-827.
- Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 60: 512–538.
- Matlock, D. L. & Heyduk, T. 2000. Sequence determinants for the recognition of the fork junction DNA containing the -10 region of promoter DNA by *E. coli* RNA polymerase. *Biochemistry*, 39, 12274-12283.
- McClure, W. R. 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 171-204.
- Miksch, G.; Bettenworth, F.; Friehs, K.; Flaschel, E. 2005. The sequence upstream of the -10 consensus sequence modulates the strength and induction time of stationary-phase promoters in *Escherichia coli*. *Applied and Microbiological Biotechnology*, 69: 312-320.

- Mitchell, J. E.; Zheng, D.; Busby S. J.; Minchin, S. D. 2003. Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 31: 4689-95.
- Murakami, K. S.; Masuda, S.; Campbell, E. A.; Muzzin, O.; Darst, S. A. 2002. Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, 296: 1285-1290.
- Nakata, K.; Kanehisa, M.; Maizel, J.V. 1988. Discriminant analysis of promoter regions in *Escherichia coli* sequences. *Comput. Appl. Biosci.*, 4, 367-371.
- Ozoline, O. N.; Deev, A. A.; Arkhipova, M. V. 1997. Non-canonical sequence elements in the promoter structure. Cluster analysis of promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*. 25: 4703-4709.
- Pa'tek, M.; Muth, G.; Wohlleben, W. 2003. Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, and *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 104: 325-334.
- Pevzner, A. P. 2000. *Computational Molecular Biology: an algorithmic approach*. MIT Press.
- Piao, Y.; Kawarachi, N.; Asegawa, R.; Kiatpapan, P.; Ono, H.; Yamashita, M.; Murooka, Y. 2004. Molecular Analysis of Promoter Elements from *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(5): 310-316
- Reddy, A.; Prasad B. V. L. S.; Mitra, C. K. 2005. Comparative analysis of core promoter region: Information content from mono and dinucleotide substitution matrices. *Computational Biology and Chemistry*, 30: 58-62.
- Roberts, C. W.; Roberts, J. W. 1996. Base-specific recognition of the nontemplate strand of promoter DNA by *E. coli* RNA polymerase. *Cell*, 86(3): 495-501.

- Ross, W.; Aiyar, S. E.; Salomon, J.; Gourse, R. L. 1998. *Escherichia coli* Promoters with UP Elements of Different Strengths: Modular Structure of Bacterial Promoters. *Journal of Bacteriology*, 180 (20): 5375-5383.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, USA 74:5463-5467.
- Schlünzen, F.; Zarivach, R.; Harms, J.; Bashan, A.; Tocilje, A.; Ryonath, A.; Franceschi, F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413: 814–821.
- Schneider, T. D. 2001. Strong minor groove base conservation in sequence logos implies DNA distortion or base flipping during replication and transcription initiation. *Nucleic Acids Research*, 29(23): 48881-4891
- Severinova, E.; Severinov, K.; Fenyo, D.; Marr, M.; Brody, E. N.; Roberts, J. W.; Chait, B. T.; Darst, S. A. 1996. Domain organization of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma 70 subunit. *Journal Molecular Biology*, 263:637-47.
- Shawms, T.; Estrem, T.G.; Ross, W.; Gourse, R.L. 1998. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:9671-9766.
- Solem, C. & Jensen, P. R. 2002. Modulation of Gene Expression Made Easy. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (5): 2397–2403.
- Stefano, J. E.; Gralla, J.D. 1982. Mutation-induced Changes in RNA Polymerase-lac ps Promoter Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*. 257, n. 23, pp. 13944-13918.

- Travers, A. A.; Burgess, R.R. Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature*, 222, 537-540. 1969
- Typas, A. & Hengge, R. 2006. Role of the spacer between the -35 and -10 regions in σ^s promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 59(3): 1037–1051.
- Uptain, S. M.; Kane, C. M.; Chamberlin, M.J. 1997. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 66, 117-172.
- Von Hippel, P. H.; Yager, T.D. 1992. The elongation-termination decision in transcription. *Science*, 255, 809-812.
- Waugh, D.S. 2005. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol*, 23, 316-320.
- Wösten, M. M. S. M.; Boeve, M.; Koot, M. G. A.; Nuenen, A. D. C; Zeijst, B. A. M. 1998. Identification of *Campylobacter jejuni* Promoter Sequences. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 180(3): 594–599
- Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 4576–4579.
- Yansura, G. D. & Henner, J. D. 1984. Use of the *Escherichia coli lac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 81: 439-443.
- Youderian, P. 1988. Promoter strength: more is less. *Taking It Global*, 4(12): 327-328.
- Zang, G.; Darst, Seth, A. 1998. Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit Amino-Terminal Domain. *Science*, 281.

7. APÊNDICE

Cromatogramas das seqüências obtidas

Legenda:

Caixa alta : boa qualidade

Caixa baixa : baixa qualidade

CLONE 10

E09

```
ttacgaacacaacacaatgacgacgaccagatacagctacgtttccttgngatg
tagaatccgGATGAgcttcatCAGGCGGGCAAGAATGTGAATA
AAGGCCGGATAaaattGTGCTTATTTTTTcttTAcgGTCTTT
AAAAAGgcCGTAATATCcaGCTGAACGGTCTGGTTatagg
taCATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCT
TTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCC
AGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTG
AAAATCTCGTCGAAGCTCGGCGGATTTGTCTACTCAA
GCTTGGCTGCGAGGTGACGGATccgccgcCAGGACTTTT
CGGCCTCTTCAATCAGCTTGAAACGCCAGCCCAgGAAC
GTTGCGCGCGACACACAGTTGCGCGTCCGCGTcGttcGg
TGCCgTACGGtggaacACGTCgattcgatccccggggatttcgtn
```

C09

```
cgcannnnnnnnnnnnnagccatattgatgtagaactaagagtagGggtcg
cgcaattcccGAAAAgtgccaCcTGACGTCTAAGAAA CCATT
ATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCAC
GAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGAATTCCCCAGGCATCAAAA
TAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGA CTGGGCCTTTTCG
TTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTA
GGACAAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAA
GCAAacggCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCAT
AAA CTGCCAGGAATTCCCGGGGATCGAATCGACGTTT
GCCACCGTACGGCACCGAAACGACGCGGACGCGCAACT
GTGTGTCGCGCGCAACGTTCTCTGGGGCTGGCGTTCAA
GCTGATTGAAGAGGCCGAAAGATCCTGGCGGCGGATC
CGTCGAcctGcAGCCAAGCTTGAGTAGGACAAATCCGC
CGAGCTTCGACGAgatTTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAA
AA tGgagAaaaAAATCACTGGATATACCACcGTTGATATA
TCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTCA
GTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACC GTTCAGC
TGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAaagaaaaATA
AGCAcaagttttatcCGGCCTTTATTCACATTTcttgcccgccTG
ATGAATGCTCATCCGGAAATTC CGtatggcaaatgaaagacggtg
a c g a
```

CLONE 14

G08

ncttcaggtggcccaatacacagtcacgcttcattgcgatgaagngaattCCGGATGagcancatcagtgc**GgcaaGA**
ATgtgaataAaggccGGATAAACTTGTGCTtatgtttCtttacGTCTttaaaggccGTAATA
TCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAggtACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCT
CAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAG
TGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGTCGAAGC
TCGGCGGATTTGTCCTACTCAAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCGATGG
ACAGCTTGCCCTGCAGCAGcggcacCgcgGTTTCCAGCTGCATCGGCCGGACaa
aggtctgGtcgcgccagggccatgcCaGtcgtgaAACGCAGGTtgcGatcCCCGGGAATTCCt
ggcagtttcattgcgggcGtctggccggcatccttcgggcccttgcttcgcaacgtTcaaatccggccCggggggatttgcc
ctactcaggaaaacgtcaacgaaaaaaaaatcgattacaacgaaaggccaattcttccaattgaacctttccgtttaattgaattg
cctgggcaaattctcaagaacgaaaaggccttcgtgga

CLONE 21

E04.abd.phd.1

cgactccnnaaacacatagggcgacggctcataacAgctcacgtcttcttgcgattagGAatccggATGagcancatCA
GGCGGgCAAGAATGTGAATAAaggCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTT
TAcgGTCTTTAAAAAGgcCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTA
CATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGG
GATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCT
TAGCTCCTGAAAATCTCGTCGAAGCTCGGCGGATTTGTCCTACTCAAGCTT
GgCTGCAGGTCGACGGATCCCAGTTGAGtteGAACGCCGTCGTTCAAGAGCTT
AGTGCTTAACCCGCTGTCCACGGGGGCCGGGACAGACCAAACtgcctTGGC
AAACGGGAGGCGCCCATATAAGCgcTCtTagaCCCGCTAACaaaatctgTCGATa
aaTcgcagaCAGATCcttgcttgCTACTTGTGCCtggcgatggcgnnn

F04.abd.phd.1

tggggtcgggccccctaacagctcacgtctccatggctgtaggaaTCCGGAtg
agcancctcaggcgtgcaAGAAATGTGAATAAAGgCCGGATAAA
ACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCC
GTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTG
AGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGAT
GCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATT
TTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCT
CGTCGAAGCTCGGCGGATTTGTCCTACTCAAGCTTGG
CTGCAGGTCGACGGATccCagttGaGTTTCGAAACGCCGTC
GttcagagcttaGTGCttaaaccgctgtccacggggggccgggacagaa
aactggcctttgaaacgggaagcgcccatataagcgttcttagaccGtta
caaaacntattaann

G04.abd.phd.1

naagaagaagnagaggaggcgccatatacacagtcacgtctccattgcgata
aggaatccggatgagctncatcaggCGGgcaaGAATGTGAATAAAG
GCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTT
TAAAAAGGCCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTAT
AGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGT
TCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATA
TCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTC
CTGAAAATCTCGTCGAAGCTCGGCGGATTTGTCCTACT
CAAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCCcagttgAGttCGa
ACGCCGTCGttcagAGCTTAGTGCTttaaaccgctgfCCACGgg
ggccgggacagacaaaatgcccttgggcaacgggaggcgccCCAtATAag
ccgcttcttaaaaccgttaaacaacactggctgatcaaatcgccagacAgat
cctttgggcttgetaattggtggcctgggcgatgggtgtggccggaaaactcc
gttgggcgggTAtcccgggccaaatcgaTCAtcccgccacctggcgcgct
TaagctcttgaccttgcccctagaatggattccacattcggaattcAAGcgC
CtGacctgcttCgtcAagtcctCCACAagecccgCGtcaaacgctgatccg
cttCGCGGActcgttggAcagcTCCTTGAACGACTCCagcaacagt
ttctcgattn

S_A08

ttccactgatggaaacaccgncttttttngcgctacaccattnccggatgagnca

tttcatnaggtccttggcAaGaatGTGAATAAAGGCcggagaaaacttGt
gactatTtttctttACGgtgcttAAAAAGGCcgtatctcccagctgAaCgg
gctgGTTataggtaCATtgagcAACTGACTGAAATGCCctcaaaa
tgtctttAcgaTGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTatanC
CaGtgatTTTttctgccATTtTagcTtCCTtagctccagAaAATCT
cgtegaagetecggcGGATTTGTCTACTCAAGcttGGCTGCag
gtcgacggaccCCagtTGAGttccaACGCCgtcgttcatagcttattG
cTTAAACCCGCTgtcCAcggGGGCCGGGACataCCAAACTG
CCCTTGGCAAACggggaggCGCccatataAGCcgctCttagacCg
ctaaCAAAAACCTgtcgataaatcgacatacagatccttggcTTGCTActtg
TgcctggcGATGGCGTGCcgcaaacctccgctggcggtatccggccaatcg
atcattegcgcacctgcgcgcttaagctctgaacctgccCTgcaagactccac
atcgaattcaagecgttgacctgcttctcaaattctcacaagecgtgtaaacctg
ctccgcttegcgactgttggacagttcctgaccttcatcaagtttttccatccC
cggatctctgcagttttggcggttactcccttaccctcggccttcttttcactttata
acctccatttatttactttctttatatactctcttacaacaacatataaaccttctc
ttccctctctcattataaccataactcctctactatactctcaaccacacaactctc
a a t t c t a c t c t c c c a t a c a c t t c c c c c t a t

S_A02

cactcatatacgcgaaacaccttttactnGCCatacgcattncgagagaggttcatnaggtcgggcAAGaATGTGA
ATAaaggcccgagaaaacttgtgactatTtttctttACGgtgcttAAAAAGGCcgtatctcccagctgAACgggctg
gTtataggTACATtGagcAACTGACTGAAAtgcccAAATGTTCTTTAcgatGCCATTG
GGATATATCAACGGTGGTATatcCaGtgatTTTTctctctTtTagcTTCCTtagctCCTGAA
AATCTCgtcgaatctcggCGGATTTGTCTACTCAAGCtTGGCTGCaggtcgacggaccC
CAGtTGAgTcgaACGCcgtcgttccagcttattGcTTAAACCCGCTgTCCaCggGGGCCGG
GACagaCCAAACTGCCCTTGGCAAACGggaggeGCCATATAAGCcgctttagaCC
cgctaaCAAAaCCgtcgataaatcgacataCagatcctTGGCTTGCTACTTGTGCCtgGCgatgg
CGTGCCGCAAACtccgctggCGgtatccGgCcaatcgatccttcgcGCacctgcGCgcttaagctctgacct
GCCCCTGCaaggactccacatcggaaatcaagcgcctgacctgcttctcaagttctccacaagecgcgtcaaAcgctgctc
ccgcttcgcggactcctGgacagctcctgaacgactccagcancagttctctatcccCGgaattcctggcatttataggcgg
ctttctgcncacactccggccgctctctccagcttcaataacctCcccggtattctcttaggaaaacttccctacaacaaa
taaatccaagcgccttctccacagacctcccttatttctcgggattcctcacactagggctcccttaacctattcttttcg

CLONE 27

A07

tctttctcgccgtatattctcaagttnaaagaatttaggtgttaaaactaacattaggggtcgcgcACattccccGAAaAgtgcc
actg**ACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCG**
TATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCCCCAGGCATCAAATAAAACG
AAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTCGGT
GAACGCTCTCCTGAGTAgGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTGAAACGTTG
CGAAGCAACGGCCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCC
AGGAATCCCCGGGGATCGCTTCCCTGGGCTCGCTGtTCAATCaGgCCAAGCG
CCGCCATGCGGAACGCTTTCAGAGTCCGGCAAGGCCATCAACGAcattgtgC
GgctgtACTTGACAGATCCGTTCGACCTgcagccaagCTTGAGTAggACAAATCCGCC
GAGCTTCGACGagattTTCAGGAGCtaatgaaGCTAAAAAtGgcgaAAAAAATCACTG
GAtatACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACAAttttgAGGCAT
TTCAGTCAGTTGCTCAatgtacCtAtaaCCAGACCGtTcagctggATATTACggaCTTT
TTAAagaccgtAAAGAAAAATAagcacaagttttatccgtgccTTTATTAcattcTgccccgtctgATG
AATgctcatcCggaatcccgtatggcaatgaaagaggagcgtgaaggaggctccctgtaacggtcagacaatgaagtcacgcc
gaacaacgggactcaggggacgacaggagccccgg c a g a g c g a c c g c c g a n g

C07

ccgcctngnnaaatagtgactaatagggcggcacattcccgaagtgcacTGACGTctaaacataatcAtgatacta**TA**
AAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTtctgCTTCAAGaatCCCCAGGCATCAAAT
AAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAActgGGCCTTTCGTTTTATCTtgtttgtttgtcG
GTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATtctgcccgtgagctggATTTgaaacgTTGCG
AAgcaacgGCCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTgcCAGGA
ATTCCCGGGGATCGCTTCCCTGGGCTCGctgtcaATCAGGCCAAGCGccgcATGC
GGAACGctTTCAAGAGTCCGGCAAGgcCATCaacgaCAaggtgcccgtgtACTTGcaga
TCCGtcgacctgCAGCcaagetTGagtaggACAAATCCgcccAGCTTCgacGagattttcagGA
GctaatgaagcTaAAAAtggagaaaaaatcactggatatacCACCGtTgatatacccgaatggcATcgtaaagaacat
tttgAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGtAcCtAtAancagAccgttcAGCTGGATATtaccg
gcctnnnt

H07

cacaacatctccgtcgtcgantaacceactccatctcattgcccgtgggaccatacacagctcaagctcttcattggcataag**GAAT**
CCGGATGAGCATCatCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAaaat
tgTGCTTATTttcTttacgGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTC
TGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGtTCTTTA
CGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCC
ATTTTAGCTTCTTAGCTCCTGAAAATCTCGTCGAAGCTCGgcccAAttgtCCT
ACTCAAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCTGCAAGTACagcccACCTTGtctg
tgAtggccttcccggacTcttgaagCGTTCCGCATggcggcgCTTggcctgaTTtgAacAGegatcccc
aagcacacgatccccgggaattcctggccagtttattggcgggctcctgccccgcatcctcccggggccggttgctttcgcaa
cgtttcaaatccgattcccggcggaatatgtcttaattccaggagagcgttccaacggacaatcaatagaattaacactgaaa
aggcccaaatcttttcggan

CLONE 32

G03.abd.phd.1

ccaaacacgccagaaaaanancggggctgccaagtacagtcacgtctccttgcgtgtagatcc**GATGAGcatcatCA**

GGCGGgcaagaatgtgaaTAAaggccgGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGG
TCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATT
GAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATA
TATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGC
TCCTGAAAATCTCGTCGAAGCTCGGCGGATTTGTCCTACTCAAGCTTGGCT
GCAGGTTCGACGGATCACGCCGGCGGCATGGCGTTGCGCATCTTGGCCA
GCAGCGCCGCGTTGTCCTCGCGGAAATACTGGCGGCGCTCGGAGTGGCC
GACCAGCGCGTAgCGGCAGCCGACGTCGGCCAGCATCGCGgCGtCACCTC
GCCGGTgaacgCGCGTTCGGgagaaACGGCTGACGTCCTGGGAGGACAAGGC
GATCCCCGGGAAttctGGCAGTTtATGGCGGGCGTCCTGCCCGCCACCCTCC
GGGCCGTTGCTTcGCAACGTTCAAATCgctnna

F03

tacaagaggccttaacactacgttccattggtgtaggaatcgGATGAGcatcatcagGcgggcAAGAATGTG
AATAAAGGCcGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTAagGTCTTTAAAAAG
GCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATaggTACATTGAGCAACTGACT
GAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGG
TATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCT
CGTCGAAGCTCGGCGGATTTGTCCTACTCAAGCTTGGCTGCAGGTTCGACG
GATCACGCCGGCGGCATGGCGTTGCGCATCTTGGCCAGCAGCGCCGCGtt
gtCCTCGCGGAAATACTGGCGGCGCTCGgagttgccccaccacatgtaacgaaaagcccacgtac
ggcaacgaacggccgagaacaaacaaaaggtgaaaccgcccggagccggcgcaaaaaagatccaaccnaagcaaca
cacaaccacacacaccaacttagggcgcaaacagctgcctctatactgggacgcccggactcgtgggagatctctnttggag
gataatcgatgaaatacatcacagntgtctttgtctatcggtattctnt

C03

tctatggcattgctcgcaataatgatggcggtgttttgaaccacgtggtgtCGgcatattccgaagtgccactgaggtctaga
acgctatatcatgacattaacctataaaaattagggcgctaaactggaGGCCCTTTCGTCTTCaaGAatTCCC
CAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTT
TTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGG
GAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCAGGGTGGCGGGCAGG
AcGCCcgccaTAAACTGccaggaATTCCCAGGGATcgCCTTGTCTCCAGGACGT
CAGcCGTTTctccgGACGGcgcttAccgGcGaggTgagcgctgtatgCtgccgacgTcggtcgcc
ctAcgcGCTGGtcggccactccgagcgccctcagAtTtcccgatgacaatgctgtgctgctggccaagatcgcaatgc
catcgccggcggtgatccgctgaactgtatcccatgctgactagacaaAtccgcccagcTTcgacgagattTcagcga
GCTaatgaagtaaacatgcagaatcaaatcactggatataaccggtgaTATATCCaatggcatcgtaaataacattttg
aggcctttcactcatttgcctaatgtacctataaccagaccgttcactggatatacggacttttaagaccgttacagaaaccttatc
ccaagtttctccggcccttattcccttctggccgcccgatgaatgggcaatccgaattccatgaccttagcaccaccgtgacttg
ggaaaatgggacaatgtaaccctgttacaccgctattccatgaacaaactgaaacggttcccactaacccgaacctataac

Clone 43

A01

nnnnnnnttgctcggaagaccaaaaattatttgaatgtatttagaaactaacaag
taggggtcgcGCACAttccccgaAaAGTGccactgACGTCTAAGA
AACCAATTATTAATCATGACATTAACCTATAaanaatagggcggt
ATCACgagtgccctTTTCGTCTTCAAGAATTCCCCAGGCAT
CAAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCT

tggGaagtcagtagaactgccaaacaagctgccggttttaatcctttggatcaagc
ttattcataatgcctttacgcattaacttttggccatctaagccttgttgcacacatt
ccgcagttctagtataaagctcctttgtaaaactttttaccctagtc aagttgcta
aaagaactcgaattacaggcctttaatccagaaccctataacctgtcatggacce
cmetaagattctaaagagtccctgtggtagaaagagccctattgatgaactcgc
aaatattttgggcaaccaatataaaaaccggaccatattgacgccacaggaaca
caaagtttaccgccacattttggggctttctcaaaattcggaccacatggatgtca
catacgtcatccatttagccctattgagaccaccgaggcggtttagatcacc
ccgaaaatcaagggaacaaggagatccacattgagtggtgtccacaacaagtt
agataacacagcccagaagaggaccacatttgggcatgagaaagtcaccattgt
ggtaaacacagttgccccacggtaaaacataacctcccaggagtagtcattgata
aaacgcccccaatttgggtgacaacaaaacgggaccaccaacaaaactcggcgc
ctgttcatcannngcn

D01

tatagggttgatgtacaaaattagggtccggcaatttccGAAAAGtgcCa
cctGACGCTCTAAGAAAACCATTATTATCATGACATTAacctt
aTAAAaatatggcgTATCACTgaggccnctttctgtCTTcaatgaattc
CccagtgcattcaaatttaaactgaaatgtgctCAGtctgaaatgactgtgg
cTttctgtttatatacTtgtgtgtttgtccgtgtgAActgtccctccttgagata
gtgaacaaaaTcctgcccgggtgaagccggactttTgaactgtatgcagaaagc
caacgtgccccggaagggttggtgtggccaggactgcccctgcccattaacct
gcatggaaTTccccgggagatcattgtgtgcttgtgctacgtgtttgcttgaac
tgctgagtcaggctatatgtccgtcaaacgcggctgtgttgaatctggagttag
agtcagtagctgccaacattgcnaccacaagttgcatcccgcactggtgaaca
gtctcgttaggataacctgccccaaaaccatgtctgctgacctttctatccccctt
gtacaccatgactatctatcgcaacaatgctttattccgtgcatcaatatttgag
ccccctcataatgcctagtnenagacaaccttaaacccggaattccaatgcaacc
agtgttccctttgcaacacacattttctttcccccttggatcataaagtttggcctt
gacatacactcccgcgaccactnaatgttggcctcttaggaaatcccagggaacc
cccaaagtagcctcgccattggaccccccaactattccaatgaccccagtggtt
cgaaacggcccccttgtgggaaaccgcaacaattcccggcacaatacactaac
aacctgctctgggggccacaaggaaacacccaaaattaccacacataatttgg
ggccttcacaaaaaaatcggggccacttaggagcacaataaagaaccactttgg
ggtgagttcggttgaagnnannatacagagggacaccaaggaccacagcaag
agaaatatcacatggagcataaacacaaggataaggagctcatagagttgaann
nn

F01

tcctcgtccaannaacaaaaanattggtagcaaatcagctcacgtncctgcgtttta
gaaatcggATGAGCATCATCAGGCGGGCAagaTGTGAATAA
AGGCCGGATAAAAACCTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCT
TTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTT
ATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAAT
GTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTA
TATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGC
TCCTGAAAATCTCGTCGAAGCTCGGCGGATTTGTCTTA
CTCAAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCGGCGTCAAGcc
gcagcTGGTAAtggccaggcgaccGgccAccGgCAGCAGgctGG
CGGCCTTGAGCAAGGGATGGTCCAGcGtcttttgcaaat

cgtcCaggctcaacggcTGAgtgggcagcggcccttgggtccgatcaaggc
ctcttccttttaaccacttaaacaggaaacattttccacgaagtgtgctgatcgg
gtgggtggcgaccagcttgaatggcCaaatatecgaaacctggggcaaaagctt
ggtcagggataagaacgcgcgggtgggcgtctaacacttcccgggggagcact
gggtggatttgcgcacaaccaaccgatcaacagcgcgttgacaacaaaacga
acgcgttcaagacgtagcatgaacatgatcccgggattcctggcatttatggggg
cgtctgcccgcacntn

G01

tattgaggacaatacagtcacgctactgcgcttagatccggATGAGcatcacc**a**
GGCgGgcaAGAAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAACTTGG
TGCTTATtttcttTACGGTCTTTAAAAaggcGTAATATCCA
GCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGGA
CTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG
ATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCC
ATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAAATCTCGTCGAAGC
TCGGCGGATTTGTCTACTCAAGCTTGGCtgcaggTCGA
CGGATCGGCGTCAGccgCAGctGGtaattggcCAGccgccccgg
ccAccggcagcaggctgtcggcgttagcaagggatggTcGccagcgtttt
ttgaaatcgTCcAgGCTCAccggctgagtggggcagcgcctgttcGATc
atggccttcttcgGtttttaaccacttaaacagggaaaattttcaagagcttgtct
gaatcgggtgggtgcgaaagctttgagggccaaattcccacacttggtgaaaa
agcctgggtccagggattaaagaaccgccgttgacgttctaacgaactTtcccgg
gcGggagcacttgggggtgcattggcgcacgagcaaccCgaTtcaacaacgcg
ttgacgacaaaGCcgaccgcggttcaagcacctgtatccagaaacatgattccc
GGGAAttcctggcagtttatggcgggcagctctgcccgcaaaCCTTccgagc
cgttggtttccaaacgtccaaatccgttcccggaggatttgggtctaatacagaga
gcgttcaccggcaaacactacggataaaaacgaAggccccagatttgaatgagccttc
gttaattggagccggggaattgggaaaaaaaggggccgggaagaccaattaaa
agttaagtcgtataataattgaagatggatgagatgaatgtgagatgggtatttat
tttttttttttgtgttgttgcgagtgattgagaaaaaaaacaaaagaacgagctga
annnn

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)