

**MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS**  
**NATURAIS – PPG-BTRN**

**Clonagem da superóxido dismutase de *Chromobacterium*  
*violaceum* e Expressão Heteróloga**

**DANIEL LÚCIO RODRIGUES DUTRA**

**Manaus, Amazonas**

**Julho, 2006**

**MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS**  
**NATURAIS – PPG-BTRN**

**Clonagem da superóxido dismutase de *Chromobacterium*  
*violaceum* e Expressão Heteróloga**

**DANIEL LÚCIO RODRIGUES DUTRA**

Biólogo

Orientador: Spartaco Astolfi Filho - UFAM

Co-orientador: Edmar Vaz de Andrade - UFAM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, com área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**Manaus, Amazonas**

**Julho, 2006**

Spartaco Astolfi Filho  
Orientador

Edmar Vaz de Andrade  
Co-orientador

## FICHA CATALOGRÁFICA

D978 Dutra, Daniel Lúcio Rodrigues

Clonagem da superóxido dismutase de *Chromobacterium violaceum* e expressão heteróloga / Daniel Lúcio Rodrigues Dutra. --- Manaus: [s. n.], 2006.

xv, 48 p.: il.

Dissertação (mestrado) -- INPA/UFAM, Manaus, 2006

Orientador: Astolfi Filho, Spartaco

Co-orientador: Andrade, Edmar Vaz de

Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Engenharia Genética. 2. Vetor de Expressão. 3. Proteína Recombinante.  
4. Fe-SOD. 5. *Escherichia coli*

CDD 620.8

### Sinopse

Foi realizado um estudo para a obtenção de um sistema para expressão heteróloga de uma superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) da bactéria *Chromobacterium violaceum*. Diversas estratégias para a construção de vetores de expressão apropriados foram testadas, porém nenhuma delas foi eficaz para a obtenção da proteína recombinante. A clonagem do gene *sodB1* nos principais plasmídeos obtidos, pCR4-SRP e pUC-SRP, levou à morte as células hospedeiras de *Escherichia coli*, provavelmente devido aos efeitos deletérios decorrentes da superexpressão de SOD.

Palavras-chave: Engenharia Genética; Vetor de Expressão; Proteína Recombinante; Fe-SOD; *Escherichia coli*.

**Aos meus tios Ocimar e Ociney**

***(in memoriam)***

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por me dar forças para não desistir.

Ao Profº Spartaco Astolfi Filho, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho. Por sempre ter acreditado que tudo iria dar certo.

Ao Profº Edmar Vaz de Andrade, pela orientação, dedicação, paciência e amizade. Pelo seu olhar crítico e ótimas sugestões.

Às amigas Lílian, Mina, Eleny, Thieme, Mary e Flaviane, pelo incentivo desde os tempos da graduação... por compartilharem comigo sonhos e anseios, pela amizade e confiança. Em especial à Aldaléia, por ser minha grande amiga... pelos conselhos, palavras de carinho e “ouvidos” pra escutar tanto desabafo!

Ao pessoal do Lab. de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas (LabGen)/CPBO-INPA: Vanessa, Alessandrinha, Laurinha, Paulinho, Thana e Évelyn, por terem passado meses escutando “será que eu vou passar na prova do mestrado?”... “será que tudo vai dar certo?”... por todo o apoio e também pela bagunça que a gente aprontou no tempo em que trabalhamos juntos.

Aos casais do Lab. de Genética de Peixes/CPBA-INPA: Carlos e Cláudia, Leandra e Igor, pelo incentivo, amizade, papo furado... mas, principalmente, por terem cuidado da Wal pra mim quando precisei!

Aos colegas/professores/agregados do Lab. de Tecnologias de DNA: Alessandra Kariza, Larissa, Jonso, Jean, Diana, Isabelle, Oto, Rebeca, Francisco, Dina, Elza, Andréa Listik, Luciana, Cristina Borborema, Gustavo, Cíntia, Tiago, Ângela, Andrezza, Gisele e Gabriela... pelos ótimos momentos juntos, por todo o apoio e carinho. Em especial, ao Daniel Raid e à

Márcinha, por terem sido meus fiéis escudeiros durante todo esse tempo, por me entenderem muito bem e por serem meus grandes amigos e colegas de bancada.

Aos meus ex-orientadores Eduardo Nagao e Eva Atroch (Lab. de Cultura de Tecidos de Plantas – UFAM), Maristerra Lemes e Rogério Gribel (LabGen – INPA), por terem marcado minha vida com seus ensinamentos, e até hoje me darem seu apoio em tudo que preciso.

Às coordenadoras do GCBEV-INPA Eliana Feldberg e Miriam Rafael, e à querida secretária Hercília, por facilitarem minha vida (e as vezes complicarem um pouco!), pelo empenho e dedicação.

Aos amigos do mestrado GCBEV, principalmente Taciana e Daniel Barros (fora os que já foram citados). Obrigado pela amizade, espero que vocês estejam presentes sempre na minha vida.

À Waleska, por ser minha melhor amiga e namorada, por estar presente em todos os momentos, bons e ruins, por me conhecer como ninguém mais... por me dar todo seu amor! Te amo!

À família Dutra, por todo o apoio durante os tempos difíceis do mestrado. Por acreditarem em mim e me incentivarem a ir sempre mais longe. Obrigado Vózinha, Vôzinho, Ocinete, Carlinhos, Karla, Gisa, Víctor, Rafa, Ocy, Sol, Ocilon, Luana e Vinícius!!!

À minha mãe, Ocilene, por todo o seu amor e incentivo. Por ter dedicado sua vida a este filho único... pelos seus momentos desacrifícios e renúncias. Te amo!

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e à Universidade Federal do Amazonas – UFAM, por terem me acolhido e me dado suporte nos estudos e experimentos não só para este trabalho, mas por toda minha vida científica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela concessão da bolsa de estudos e do auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram com seu ombro amigo, seu sorriso e palavras de apoio... ou que, pelo menos, não atrapalharam em nada. Obrigado!!!



## RESUMO

O principal objetivo do trabalho foi isolar as regiões estruturais dos genes *sod* correspondentes às ORFs CV0867 (*sodB2*) e CV2504 (*sodB1*) de *C. violaceum* e expressá-las em células de *Escherichia coli* portando os genes *sod*, para avaliar o incremento da atividade de SOD nas células recombinantes submetidas a condições de estresse oxidativo. O gene *sodB1* foi isolado via PCR, utilizando iniciadores específicos, e clonado em vetor pGEM<sup>®</sup>-T *Easy*. Para *sodB2*, não conseguiu-se otimizar a reação de amplificação. Com o intuito de obter um vetor para expressão heteróloga regulada de SOD foram traçadas estratégias para a construção de vetores com expressão controlada por um promotor estericamente regulado - *srp*. O gene *sodB1* foi então subclonado nos vetores pCR4-SRP e pUC-SRP, derivados de pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> e pUC72, respectivamente, ambos desenvolvidos a partir deste trabalho. No entanto, não foi possível a obtenção de clones recombinantes. Apesar de SOD não ser uma proteína tóxica para a célula, testou-se a hipótese de que a superexpressão desta proteína seria a causa da letalidade dos clones recombinantes. Assim, foram clonados os genes *amy* e *pfu* em pUC-SRP. Porém, mais uma vez não foram obtidos clones portando os genes de interesse. Conclui-se então que os mecanismos de expressão do vetor pUC-SRP, bem como de pCR4-SRP, devem ter ocasionado efeitos deletérios às células hospedeiras, e que alterações na sua estrutura devem ser feitas no sentido de minimizar os níveis de expressão heteróloga, reduzindo assim o risco de produção de toxicidade para os clones.

## ABSTRACT

The main objective of this work was to isolate the ORFs CV0867 (*sodB2*) e CV2504 (*sodB1*) of *C. violaceum* and induce their expression in *Escherichia coli* cells harboring *sod* genes, to evaluate the increase in SOD activity in the recombinant cells exposed to oxidative stress conditions. The *sodB1* gene was isolated by PCR, using specific *primers*, and cloned into pGEM<sup>®</sup>-T *Easy* vector. The amplification reaction could not be optimized for the second set of primers, specific for *sodB2* gene. In an attempt to obtain a vector suitable for the regulated heterologous expression of SOD, some strategies were proposed for the construction of vectors with expression under the control of a sterically repressed promoter – *srp*. The *sodB1* gene was then subcloned into vectors pCR4-SRP and pUC-SRP, derived from pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> e pUC72, respectively, both developed during this project. However, the obtaining of recombinant clones was not possible. Despite the fact that SOD is not a toxic protein for the cell, we tested the hypothesis of the lethality of recombinant clones caused by the overexpression of SOD. Thus, *amy* and *pfu* genes were cloned into pUC-SRP, although the clones harboring the gene of interest could not be obtained. We concluded that the expression mechanisms of pUC-SRP and pCR4-SRP vectors may have caused deleterious effects to the host cells, and that modifications in their structure should be made for the minimizing of heterologous expression levels, reducing the risk of toxicity for the clones.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1- INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 1.1- <i>Chromobacterium violaceum</i> .....   | 1  |
| 1.2- Espécies Reativas de Oxigênio .....  | 3  |
| 1.2.1- Ânion Superóxido .....   | 4  |
| 1.3- Superóxido Dismutases .....  | 5  |
| 1.4- Expressão Heteróloga Bacteriana .....  | 7  |
| 1.4.1- Vetores de Expressão .....   | 8  |
| 1.4.2- Expressão Heteróloga Bacteriana de SOD .....                                       | 9  |
| 1.5- Objetivos .....  | 10 |
| 1.5.1- Geral .....  | 10 |
| 1.5.2- Específicos .....  | 10 |
| 2- MATERIAL E MÉTODOS .....   | 11 |
| 2.1- Linhagens Bacterianas e Meios de Cultura .....                                       | 11 |
| 2.2- Isolamento dos Genes Codificadores para SODs de <i>C. violaceum</i> .....            | 12 |
| 2.2.1- Identificação das ORFs .....   | 12 |
| 2.2.2- Desenho dos oligonucleotídeos .....  | 12 |
| 2.2.3- Extração de DNA Cromossomal .....  | 13 |
| 2.2.4- Amplificação das ORFs .....  | 13 |
| 2.2.5- Transformação e Clonagem Bacteriana .....  | 14 |
| 2.2.6- Extração, Análise de Restrição e Seqüenciamento dos Plasmídeos Recombinantes ..... | 15 |
| 2.3- Construção de Vetores de Expressão .....   | 16 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.3.1- | Eliminação de um Sítio para <i>NdeI</i> no Vetor pKEN1 .....   | 16 |
| 2.3.2- | Construção de um Vetor Derivado de pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> com Promotor <i>srp</i><br>..... | 20 |
| 2.3.3- | Construção de um Vetor Derivado de pUC72 com Promotor <i>srp</i> .....                                   | 23 |
| 2.4-   | Subclonagem em Vetores de Expressão .....  | 23 |
| 2.4.1- | Subclonagem de <i>sodB1</i> em pCR4-SRP para expressão heteróloga .....                                  | 24 |
| 2.4.2- | Subclonagem de <i>sodB1</i> em pUC-SRP para expressão heteróloga .....                                   | 24 |
| 2.4.3- | Subclonagem de <i>sodB1</i> em pET-21a para expressão heteróloga .....                                   | 25 |
| 3-     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 26 |
| 3.1-   | Amplificação das Sequências Correspondentes aos Genes <i>sodB</i> .....                                  | 26 |
| 3.2-   | Análise de Restrição e Sequenciamento dos Plasmídeos Recombinantes .....                                 | 27 |
| 3.3-   | Construção de Vetores de Expressão .....   | 29 |
| 3.3.1- | Eliminação de um Sítio para <i>NdeI</i> no Vetor pKEN1 .....   | 29 |
| 3.3.2- | Construção de um Vetor Derivado de pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> com Promotor <i>srp</i><br>..... | 31 |
| 3.3.3- | Construção de um Vetor Derivado de pUC72 com Promotor <i>srp</i> .....                                   | 33 |
| 3.4-   | Subclonagem em Vetores de Expressão .....  | 34 |
| 3.4.1- | Subclonagem de <i>sodB1</i> em pCR4-SRP para expressão heteróloga .....                                  | 34 |
| 3.4.2- | Subclonagem de <i>sodB1</i> em pUC-SRP para expressão heteróloga .....                                   | 36 |
| 3.4.3- | Subclonagem de <i>sodB1</i> em pET-21a para expressão heteróloga .....                                   | 37 |
| 4-     | CONCLUSÕES .....   | 39 |
| 5-     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 40 |

## Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <i>amy</i>                    | gene codificador para a $\alpha$ -amilase                     |
| ATP                           | adenosina trifosfato  |
| Cu/Zn-SOD                     | SOD dependente de cobre e zinco                               |
| Da                            | dalton  |
| DNA                           | ácido desoxirribonucléico                                     |
| dNTPs                         | desoxirribonucleosídeos trifosfato                            |
| Fe-SOD                        | SOD dependente de ferro                                       |
| <i>gfp</i>                    | gene repórter que codifica para a proteína verde fluorescente |
| GFP                           | proteína verde fluorescente                                   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | peróxido de hidrogênio  |
| IPTG                          | isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo                   |
| kb                            | quilobase   |
| KCN                           | cianeto de potássio   |
| LB                            | meio Luria-Bertani  |
| mg                            | miligrama   |
| mL                            | mililitro   |
| mM                            | milimolar   |
| Mn-SOD                        | SOD dependente de manganês                                    |
| ng                            | nanograma   |
| O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>  | radical ânion superóxido                                      |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>   | oxigênio <i>singlet</i>                                       |
| OH <sup>·</sup>               | radical hidroxil  |

|              |  |
|--------------|--|
| ORF          | do inglês <i>open reading frame</i> ou quadro de leitura aberta                    |
| pb           | pares de base  |
| PCR          | do inglês <i>polimerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase       |
| <i>pfu</i>   | gene codificador para a <i>Pfu</i> DNA polimerase                                  |
| pI           | ponto isoelétrico  |
| RBS          | do inglês <i>ribosome binding site</i> ou sítio de ligação ao ribossomo            |
| ROS          | do inglês <i>reactive oxygen species</i> ou espécies reativas de oxigênio          |
| SDS          | dodecil sulfato de sódio   |
| SOD          | superóxido dismutase   |
| <i>sodA</i>  | gene que codifica para uma Mn-SOD  |
| <i>sodB</i>  | gene que codifica para uma Fe-SOD  |
| <i>sodB1</i> | gene correspondente à ORF CV2504 de <i>C. violaceum</i>                            |
| <i>sodB2</i> | gene correspondente à ORF CV0867 de <i>C. violaceum</i>                            |
| <i>sodC</i>  | gene que codifica para uma Cu/Zn-SOD   |
| <i>srp</i>   | do inglês <i>sterically repressed promoter</i> ou promotor reprimido estericamente |
| μL           | microlitro   |
| μM           | micromolar   |

## Lista de Figuras e Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 cultivada <i>in vitro</i> .....       | 2  |
| <b>Figura 2</b> – Principais elementos presentes em um vetor de expressão procariótica .....        | 8  |
| <b>Figura 3</b> – Mapa do vetor pGEM <sup>®</sup> -T <i>Easy</i> .....                              | 15 |
| <b>Figura 4</b> – Mapa do vetor de expressão pKEN1 .....  | 17 |
| <b>Figura 5</b> – Estratégia para a eliminação de um sítio para <i>NdeI</i> do vetor pKEN1-GFP..... | 19 |
| <b>Figura 6</b> – Oligonucleotídeo SRP .....  | 20 |
| <b>Figura 7</b> – Mapa do vetor pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> .....                          | 22 |
| <b>Figura 8</b> – Mapa do vetor pET-21a .....   | 25 |
| <b>Figura 9</b> – Amplificação de <i>sodB1</i> .....  | 26 |
| <b>Figura 10</b> – Amplificação de <i>sodB1</i> .....   | 27 |
| <b>Figura 11</b> - Análise de restrição de pG-SOD com <i>NdeI</i> e <i>HindIII</i> .....            | 28 |
| <b>Figura 12</b> - Análise de restrição de pKEN1-GFP com <i>NdeI</i> .....                          | 29 |
| <b>Figura 13</b> - Sistema de ligação para pKEN-nde .....   | 30 |
| <b>Figura 14</b> - Análise de restrição de pKEN1-GFP com <i>NdeI</i> .....                          | 31 |
| <b>Figura 15</b> - Oligonucleotídeo SRP sintético .....   | 32 |
| <b>Figura 16</b> - Análise de restrição de pCR4-SRP com <i>NdeI</i> .....                           | 33 |
| <b>Figura 17</b> - Análise de restrição de pUC-SRP com <i>XbaI</i> .....                            | 34 |
| <b>Figura 18</b> – Clones pCR4-SRP+SOD crescidos na presença e ausência de IPTG .....               | 35 |
| <b>Figura 19</b> – Análise de restrição de pCR4-SRP+SOD com <i>NdeI</i> e <i>HindIII</i> .....      | 35 |
| <b>Tabela 1</b> – Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas no trabalho .....                          | 11 |
| <b>Tabela 2</b> – Oligonucleotídeos sintetizados para amplificar as ORFs <i>sodB</i> .....          | 13 |





# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- *Chromobacterium violaceum*

*Chromobacterium violaceum* (Neisseriaceae) é uma  $\beta$ -proteobactéria saprófita Gram-negativa e aeróbica facultativa. Ocasionalmente, pode atuar como um patógeno oportunista em animais, incluindo o homem, causando septicemia fatal e lesões na pele com abscessos no fígado e pulmão (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Domina uma variedade de ecossistemas em regiões tropicais e subtropicais e, no Brasil, é encontrada amplamente distribuída nos solos dos bancos de areia e nas águas do Rio Negro, na região amazônica (Durán e Menck, 2001).

Foi observada pela primeira vez em 1867 por Boisbaudran em preparações de flor de arroz. No entanto, o autor somente publicou cientificamente suas observações em 1882, um ano após um outro cientista, Bergonzini, tê-la descrito (Bergonzini, 1881; Boisbaudran, 1882; *apud* Durán e Menck, 2001).

A mais notável característica desta bactéria é a produção de um pigmento violeta chamado violaceína (figura 1). A produção de violaceína em *C. violaceum* é induzida por N-homoserinas lactonas acetiladas, que têm sido descritas como reguladores genéticos em várias bactérias Gram-negativas, em um sistema denominado *quorum sensing* (Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2003). O papel biológico deste pigmento na bactéria permanece desconhecido, no entanto, diversos experimentos evidenciaram suas atividades antibiótica (Durán *et al.*, 1983), antichagásica (Durán *et al.*, 1989), antileishmânica (Leon *et al.*, 2001) e antitumoral (Melo *et al.*, 2000).



**Figura 1** – Aspecto de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 cultivada *in vitro*, em placa contendo meio LB sólido (fonte: Márcia Neiva). A cor violeta característica deve-se à produção do pigmento violaceína.

Devido à presença de vários genes de interesse médico, industrial e agrônômico previamente identificados, comprovando seu grande potencial biotecnológico, e da simplicidade relativa de seu genoma, *C. violaceum* foi escolhida como o primeiro organismo a ter seu genoma inteiramente seqüenciado pela Rede Nacional do Projeto Genoma Brasileiro (Vasconcelos *et al.*, 2003).

Foram seqüenciados um total de 4.751.080 pb e encontradas 4.431 ORFs (*open reading frames* ou quadros de leitura aberta), o que representa 89 % do genoma. Uma ORF constitui o trecho entre o códon de iniciação da síntese protéica e um dos três códons para a sua terminação e que determina a seqüência de aminoácidos do peptídeo final, produto do gene (Torres *et al.*, 2000). A atribuição funcional provável de cada ORF foi realizada, fornecendo uma rica fonte de prováveis genes a serem exaustivamente estudados nos próximos anos.

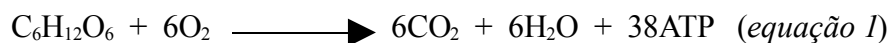
A análise do genoma de *C. violaceum* proporcionou inferências importantes sobre sua adaptação fisiológica a habitats tropicais aquáticos e terrestres, suas propriedades como patógeno oportunista, e suas potenciais aplicações biotecnológicas e farmacológicas

(Stephens, 2004). Duas ORFs que provavelmente codificam para a superóxido dismutase, uma enzima que atua contra o estresse gerado pelo metabolismo aeróbico, podem fornecer subsídios que complementem tais inferências e constituem o objeto de estudo deste trabalho.

## 1.2- Espécies Reativas de Oxigênio

O acúmulo do oxigênio (O<sub>2</sub>) na atmosfera da Terra há cerca de 1,8 bilhões de anos propiciou o surgimento dos primeiros organismos aeróbicos. Desde então, a respiração aeróbica difundiu-se, dominando os sistemas biológicos, e restringindo seres microscópicos sensíveis a nichos anaeróbicos remanescentes (Fridovich, 1998). Apesar de representar um componente chave para a evolução dos seres vivos, o O<sub>2</sub> também pode ser uma toxina letal (Benzie, 2000). Este é um grande paradoxo inerente à vida aeróbica.

Durante a respiração celular, ocorre a redução do oxigênio molecular a água, produzindo energia em forma de ATP (equação 1). A partir desse processo e de outros que contam com a participação do oxigênio, são formadas moléculas intermediárias com propriedades altamente oxidativas denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (Fridovich, 1995; McCord, 2000).



Em concentrações fisiológicas as ROS geradas em organismos aeróbicos são benéficas e estão envolvidas em vias de sinalização celular (Williams e Kwon, 2004) e defesa contra microrganismos patogênicos invasores (Finkel, 2003). Entretanto, um desequilíbrio na sua concentração pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças como câncer (Pelicano *et al.*, 2004), Alzheimer (Zhu *et al.*, 2004), diabetes (Sydow e Münzel, 2003), arteriosclerose (Yokoyama, 2004), hipertensão (Lassègue e Griendingref, 2004), hepatite

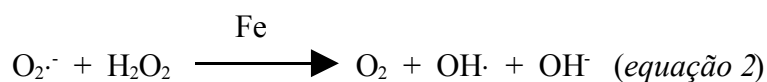
(Loguercio e Federico, 2003), processos inflamatórios (Fubini e Hubbard, 2003), entre outros. Adicionalmente, o círculo vicioso criado pelas ROS ao degradar componentes celulares e aumentar a sensibilidade do organismo ao estresse oxidativo, contribui diretamente para o envelhecimento (Dufour e Larsson, 2004).

As principais formas de ROS são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) e o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ). Todas, em diferentes magnitudes, provocam oxidação de lipídeos, DNA e proteínas, resultando em mutação, dano e morte celular (Imlay, 2003).

### 1.2.1- Ânion Superóxido

A redução univalente do  $O_2$  gera a primeira ROS a ser formada durante o metabolismo aeróbico, o  $O_2^{\cdot-}$ , num processo que pode ocorrer tanto espontaneamente quanto por ação enzimática (Fridovich, 1997).

Apesar de o  $O_2^{\cdot-}$  ser suficientemente reativo para causar danos às células, seu poder oxidativo é reduzido em virtude da sua carga negativa (Fridovich, 1989). Diversos mecanismos pelos quais esta espécie reativa contribui para a formação de agentes oxidativos mais potentes já foram descritos. Um dos mecanismos principais, conhecido como reação de Haber-Weiss (equação 2), leva à formação mediada por ferro do radical altamente tóxico hidroxil (Keyer *et al.*, 1995; Liochev e Fridovich, 2002):



Assim, o  $O_2^{\cdot-}$  contribui de forma indireta, porém de maneira fundamental, para a toxicidade celular aeróbica, gerando espécies de  $O_2$  mais reativas.

### 1.3- Superóxido Dismutases

A evolução de organismos aeróbicos capazes de sobreviver em ambientes ricos em oxigênio requer um sistema de defesa efetivo contra as ROS. As superóxido dismutases (SOD, EC 1.15.1.1) são metaloenzimas que catalisam a dismutação de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (equação 3), representando assim um dos principais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo celular (Hassan, 1988):



Devido a sua propriedade de catalisar a primeira etapa de uma série de reações que previnem o acúmulo de ROS gerados pela redução do oxigênio molecular, as SODs desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade da célula e de seus constituintes durante o metabolismo aeróbico. A remoção do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  bloqueia reações secundárias que podem levar à formação do  $\text{OH}\cdot$  (Fridovich, 1995; Anderson, 1996).

A partir de um estudo sobre a redução do citocromo c pela xantina oxidase, McCord e Fridovich (1968) propuseram a ação de um agente intermediário na dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Um ano depois, os mesmos cientistas descreveram o isolamento da superóxido dismutase, relacionando-a com duas outras proteínas identificadas anteriormente, porém sem atividade enzimática, a hemocupreína e a eritrocupreína (McCord e Fridovich, 1969).

Desde então, SODs diméricas, triméricas e tetraméricas têm sido isoladas dos mais diversos organismos e caracterizadas molecularmente. Diferentes tipos enzimáticos podem ser identificados de acordo com o íon metálico presente no seu sítio ativo (Fridovich, 1998). A superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD, codificada pelo gene *sodC*) foi a primeira destas enzimas a ser caracterizada (McCord e Fridovich, 1969) e é um homodímero que contém um  $\text{Cu}^{2+}$  e um  $\text{Zn}^{2+}$  no sítio ativo de cada subunidade. Pode ser

encontrada nos espaços intracelulares do citoplasma de eucariotos, no periplasma de bactérias Gram-negativas, nos plastídeos de plantas e nos espaços extracelulares de mamíferos (superóxido dismutase extracelular, EC-SOD) (Fridovich, 1998). Foi identificada em *Escherichia coli* somente em 1994, por Benov e Fridovich. Normalmente apresenta sensibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e cianeto de potássio (KCN). São altamente conservadas, exibindo estruturas similares em plantas, fungos, pássaros e mamíferos, não apresentando, no entanto, similaridade com as outras classes de SOD (Michalski, 1996; Zelko *et al.*, 2002).

A superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD, codificada por *sodA*) foi isolada pela primeira vez de *E. coli* (Keele *et al.*, 1970). Pode ser encontrada em bactérias e eucariotos, sendo que nestes últimos é inicialmente sintetizada contendo um peptídeo líder, o qual direciona essa enzima para a mitocôndria (Zelko *et al.*, 2002). Pode ser inibida por dodecil sulfato de sódio (SDS).

Yost e Fridovich (1973) foram os primeiros a isolar uma superóxido dismutase dependente de ferro (Fe-SOD, codificada por *sodB*), a partir de células de *E. coli*. Pode ser encontrada em bactérias, cloroplastos de plantas e em alguns protozoários (Miller, 2001). Normalmente é inibida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estruturalmente análogas, Fe-SODs e Mn-SODs apresentam alta similaridade na seqüência de aminoácidos e compartilham estruturas conformacionais comparáveis (Michalski, 1996). Algumas SODs denominadas cambialísticas podem ser ativadas tanto por Fe quanto por Mn no seu sítio ativo (Fridovich, 1998). Acredita-se que as Mn-SODs protegem a célula do estresse oxidativo endógeno enquanto que as Fe-SODs são expressas constitutivamente, conferindo resistência ao estresse oxidativo ambiental, em virtude da sua localização periplasmática (Miller, 2001).

#### **1.4- Expressão Heteróloga Bacteriana**

A produção em um organismo de proteínas originárias de um organismo distinto é denominada expressão heteróloga. Vários sistemas de expressão têm sido relatados, tais como: bactérias (Roberto *et al.*, 2004), leveduras (Andrade *et al.*, 2000), cultura de células vegetais (Yazawa *et al.*, 2004) e animais (Wu *et al.*, 2004), além de plantas (Kitashiba *et al.*, 2004) e animais transgênicos (Son *et al.*, 2003).

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) permanece como um sistema atrativo para a produção de proteínas heterólogas devido a sua alta taxa de crescimento em meios de cultura de baixo custo. Outras características favoráveis são o extenso conhecimento adquirido sobre a genética e biologia molecular desse organismo e a disponibilidade de uma ampla variedade de vetores de clonagem e linhagens hospedeiras apropriadas para a expressão heteróloga (Baneyx, 1999).

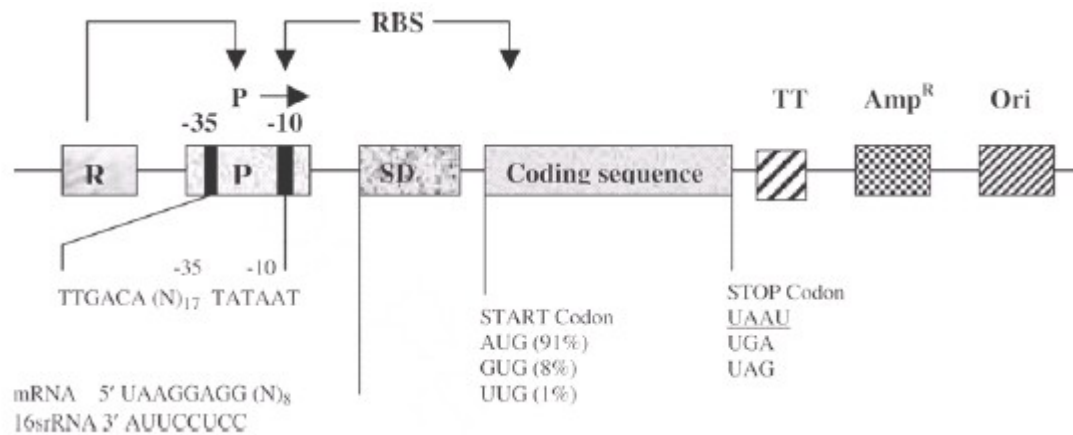
Vários são os fatores que podem afetar a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*: a linhagem bacteriana empregada, o número de cópias plasmidiais, a escolha do antibiótico apropriado para seleção dos clones, a força do promotor, a eficiência dos terminadores de transcrição, a estabilidade do RNA mensageiro, a estrutura do sítio de ligação ao ribossomo, e condições de cultivo, tais como temperatura, pH, características nutricionais e meio de cultura (Jana e Deb, 2005; Sorensen e Mortensen, 2005).

#### **1.4.1- Vetores de Expressão**

Genes de origem exógena podem ser expressos em células de *E. coli* por meio da sua integração ao DNA cromossômico ou pelo uso de vetores de expressão.

A construção de um plasmídeo para expressão requer vários elementos cuja configuração deve ser precisamente considerada para assegurar a obtenção de níveis

satisfatórios da proteína recombinante com atividade biológica desejada. A figura 2 mostra a estrutura geral de um vetor para expressão em *E. coli*.



**Figura 2** – Representação esquemática dos principais elementos presentes em um vetor de expressão procariótica: gene regulador (R), promotor (P), sítio de ligação ao ribossomo (RBS), região de Shine-Dalgarno (SD), terminador de transcrição (TT), gene de resistência a antibiótico (Amp<sup>R</sup>) e origem de replicação (Ori) (fonte: Jana e Derb, 2005).

O promotor deve estar posicionado de 10 a 100 pb acima do sítio de ligação ao ribossomo (*ribosome binding site*, RBS), estando sob o controle de um gene regulatório presente no próprio vetor ou integrado ao cromossomo bacteriano. Além disso, é importante que o promotor seja forte, apresente baixo nível de expressão basal (seja altamente regulável), possa ser transferido com facilidade para outras linhagens de *E. coli*, e que sua indução seja simples e de baixo custo (Jana e Derb, 2005).

O sítio de Shine-Dalgarno (SD), no interior do RBS, deve estar posicionado de 5 a 13 pb do códon de início da transcrição, sendo complementar à extremidade 3' do 16S rRNA. Adicionalmente, um vetor de expressão procariótico requer uma origem de replicação, um gene marcador de seleção, uma região de terminação de transcrição eficiente e um gene que facilite a regulação estridente da atividade promotora (Makrides, 1996).

#### 1.4.2- Expressão Heteróloga Bacteriana de SOD



A análise da expressão heteróloga de genes *sod* em *E. coli* e a caracterização da atividade enzimática de seus produtos recombinantes trouxeram grandes contribuições para a elucidação do mecanismo geral de proteção celular antioxidativa, além da obtenção de enzimas para fins médicos e biotecnológicos.

Uma das abordagens utilizadas nestes estudos consiste na indução da tolerância ao estresse oxidativo em linhagens bacterianas que contenham mutações deletérias para genes *sod* (*sod*<sup>-</sup>). Esta indução é obtida por meio da clonagem de genes *sod* exógenos e a sua expressão heteróloga em uma hospedeira mutante *sod*<sup>-</sup>. Paramchuk *et al.* (1997), Ödberg-Ferragut *et al.* (2000) e Schott e Vasta (2003) verificaram a complementação da atividade SOD em linhagens de *E. coli* sensíveis ao crescimento em condições aeróbicas a partir da expressão de genes para Fe-SODs exógenos isolados dos protozoários patogênicos *Leishmania chagasi*, *Toxoplasma gondii* e *Perkinsus marinus*, respectivamente..

De maneira semelhante, SODs recombinantes de origem bacteriana conferiram proteção a células de *E. coli* sensíveis ao estresse oxidativo: Mn-SOD do agente etiológico do cancro cutâneo *Haemophilus ducreyi* (San Mateo *et al.*, 1998); Fe-SOD atípica de *Sinorhizobium meliloti* (Santos *et al.*, 1999); SOD cambialística (com preferência por Mn) de *Rhodobacter capsulatus* (Tabares *et al.*, 2003); Mn-SOD da produtora de ácido láctico *Streptococcus thermophilus* (Andrus *et al.*, 2003); são alguns exemplos.

Por outro lado, muitos trabalhos descrevem a expressão de SODs recombinantes em linhagens de *E. coli* que preservam seus três tipos de SODs endógenas: SOD cambialística da hipertermófila *Pyrobaculum calidifontis* (Amo *et al.*, 2003); Cu/Zn-SOD da bactéria causadora da cólera *Vibrio cholerae* (Gabbianelli *et al.*, 2004); Fe-SOD da cianobactéria *Synechocystis* sp. (Bhattacharya *et al.*, 2004); dentre outros. Neste tipo de abordagem é avaliado o incremento da tolerância ao estresse oxidativo nas células hospedeiras.

## **1.5- Objetivos**

### **1.5.1- Objetivo Geral**

- Isolar as regiões estruturais dos genes *sod* correspondentes às ORFs CV0867 e CV2504 de *C. violaceum* e expressá-las em *E. coli*.

### **1.5.2- Objetivos Específicos**

- Obter as regiões gênicas correspondentes às ORFs CV0867 e CV2504 via PCR, utilizando iniciadores específicos, e cloná-las em vetor de clonagem;
- Construir um vetor de expressão regulada para a produção de SOD recombinante.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias de DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

### 2.1- Linhagens Bacterianas e Meios de Cultura

A linhagem de *Chromobacterium violaceum* utilizada para o isolamento dos genes *sodB* foi a linhagem ATCC 12472 (*American Type Culture Collection*), a qual teve seu genoma seqüenciado pelo Projeto Genoma Nacional. As células de *Escherichia coli* utilizadas como hospedeiras para a clonagem estão listadas na tabela 1.

**Tabela 1** – Linhagens de *E. coli* utilizadas no trabalho, com seus respectivos genótipos.

| Linhagem  | Genótipo  | Referência (Fonte)           |
|-----------|---|------------------------------|
|           | F' <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> ΔM15 <i>zzf</i> ::Tn5(Kan <sup>r</sup> )/Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15   |                              |
| DH5αF'IQ  | Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> )  | Jessee e Blodgett<br>(1988)  |
| GM48 dam- | F' LAM- <i>dam-3 dcm-6 thr-1 leuB6 ara-14 tonA31</i><br><i>lacY1 tsx-78 glnV44</i> (Am) <i>galK2</i> (Oc) <i>galT22 thi-1</i><br>F' <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 | Marinus (1973)               |
| TOP10     | Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK</i>  | Invitrogen                   |
| XL1 Blue  | <i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>endA1 nupG</i><br><i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i><br>[F' <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]                | Bullock <i>et al.</i> (1987) |

Todas as culturas bacterianas foram mantidas no laboratório em glicerol 25 % a -80 °C. Durante os experimentos foram feitos cultivos em meios Luria-Bertani (LB), contendo ou não antibióticos apropriados, a 37 °C.

### 2.2- Isolamento dos Genes Codificadores para SODs de *C. violaceum*

### 2.2.1- Identificação das ORFs

As ORFs dos possíveis genes tiveram suas seqüências identificadas no Instituto Virtual de Pesquisa Genômica, onde estão depositados os resultados de anotação do Projeto Genoma Nacional (<http://www.brgene.lncc.br/violaceum>). Foram selecionadas duas ORFs correspondentes ao gene *sodB*. A primeira delas, CV0867 (*sodB2*), possui 702 pb e codifica para uma proteína Fe-SOD composta por 234 aminoácidos, com massa molecular de 25.524,58 Da e pI 7,01. A ORF CV2504 (*sodB1*) possui 576 pb e seu suposto produto protéico Fe-SOD é composto por 192 aminoácidos, massa molecular de 21.589,99 Da e pI 5,86.

### 2.2.2- Desenho dos Oligonucleotídeos Iniciadores

Oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, necessários para a amplificação dos segmentos de DNA correspondentes às ORFs, foram desenhados a partir das regiões localizadas nas extremidades das seqüências selecionadas. Um sítio para a enzima de restrição *NdeI* (ca↓tatg) foi incluído na extremidade 5' do iniciador *forward* e um sítio para a enzima *HindIII* (a↓agctt) foi incluído na extremidade 5' do iniciador *reverse*, inserindo-os nas extremidades 5' e 3', respectivamente, das seqüências gênicas amplificadas (tabela 2).

**Tabela 2** - Oligonucleotídeos sintetizados para amplificar as regiões gênicas correspondentes às ORFs CV0867 e CV2504, apresentando sítios para as endonucleases *NdeI* ou *HindIII* nas suas extremidades.

| Oligonucleotídeos    | Seqüência 5'→3'                     | Sítio de restrição* | Tamanho (bases) |
|----------------------|-------------------------------------|---------------------|-----------------|
| <i>sodB1 Forward</i> | ggaattccatattggaacacaactgcctgaactgc | <i>NdeI</i>         | 35              |
| <i>sodB1 Reverse</i> | cccaagcttcaggcgaagtctggccacg        | <i>HindIII</i>      | 30              |
| <i>sodB2 Forward</i> | ggaattccatattgcccgaccgacgcc         | <i>NdeI</i>         | 28              |
| <i>sodB2 Reverse</i> | cccaagcttcaggccttcagggtgcgctg       | <i>HindIII</i>      | 29              |

(\* ) as chaves indicam a localização dos sítios de restrição

### 2.2.3- Extração de DNA Cromossomal

O DNA cromossomal de *C. violaceum* foi extraído pelo método Fenol/Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989), que consiste na remoção de proteínas contaminantes mediada por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitação do DNA por etanol. As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8 % a 80 volts, coradas com brometo de etídeo, visualizadas sob luz ultra-violeta e fotodocumentadas. A concentração do DNA foi estimada a partir da comparação da intensidade das bandas correspondentes ao material extraído com bandas de 10, 50 e 100 ng de DNA de fago  $\lambda$  (*Invitrogen*).

### 2.2.4- Amplificação das ORFs

A amplificação dos segmentos de DNA correspondentes às ORFs ocorreu via Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (Saiki *et al.*, 1988), utilizando os iniciadores previamente sintetizados. As condições para a amplificação foram: 10 ng de DNA, tampão 1X, 0,25 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M de cada iniciador, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e água deionizada esterilizada em quantidade suficiente para um volume total de 25  $\mu$ L.

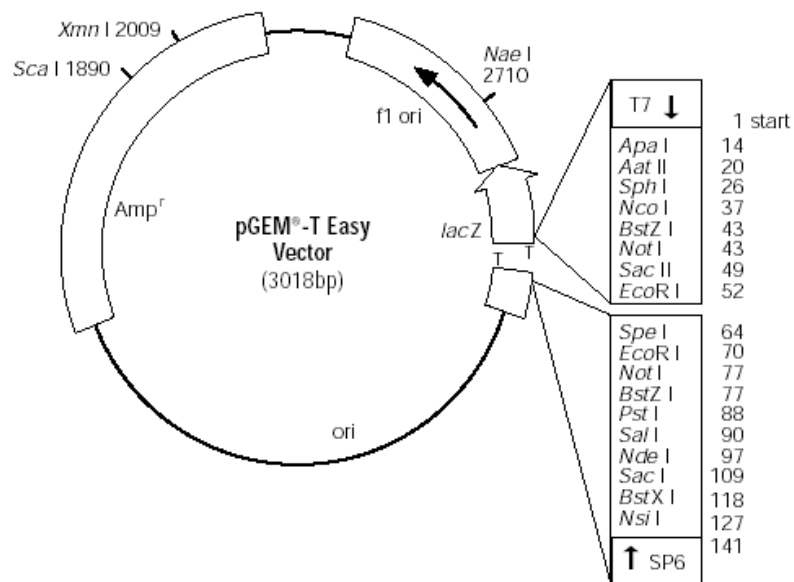
O programa de PCR utilizado em termociclador *Mastercycler Gradient (Eppendorf)* era composto pelos seguintes passos: desnaturação inicial (A) de 95 °C por 2 min; seguida de ciclo de 35 vezes (B) com um passo de desnaturação (B1) de 95 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores (B2) com temperaturas variando entre 50 e 60 °C por 40 s e um passo de extensão das fitas (B3) de 72 °C por 2 min; além de um passo de extensão final (C) de 72 °C por 5 min.

Após a amplificação, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1,0 % quanto à qualidade da reação, especificidade dos iniciadores e integridade do DNA.

#### **2.2.5- Transformação e Clonagem Bacteriana**

Os produtos de PCR foram ligados a um vetor de clonagem pGEM<sup>®</sup>-T *Easy (Promega)*, um plasmídeo linear que possui em cada uma de suas extremidades uma timina livre complementar à adenina inserida pela *Taq* DNA no final de cada produto de amplificação (figura 3). O sistema de ligação continha 5 µL de tampão da DNA Ligase, 25 ng do plasmídeo, 25 ng do inserto, 3 U de T4 DNA ligase (*Fermentas*), e água deionizada esterilizada para um volume final de 10 µL. A reação de ligação foi incubada a 16 °C por 3 horas.

Para a transformação genética, as células competentes de *E. coli* XL1 Blue foram submetidas à eletroporação (Cymbalyuk *et al.*, 1988) em um aparelho do tipo *Electroporator 2510 (Eppendorf)*. A eletroporação consiste na indução de uma corrente elétrica de alta voltagem que atravessa uma suspensão bacteriana por mili segundos, criando poros na parede e membrana celular, possibilitando assim a passagem do DNA exógeno para dentro da célula (Neumann *et al.*, 1982). Clones transformantes foram selecionados em meio LB na presença de ampicilina (200 µg/mL).



**Figura 3** – Mapa do vetor pGEM®-T Easy. Em destaque são mostrados: seqüências de anelamento dos iniciadores M13, sítios de restrição, origens de replicação, genes marcadores de seleção e região promotora (fonte: <http://www.promega.com>).

## 2.2.6- Extração, Análise de Restrição e Seqüenciamento dos Plasmídeos Recombinantes

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos pelo método de lise alcalina (Birnboim e Doly, 1979), utilizando *kit FlexiPrep* (Amersham Biosciences, GE Healthcare). Após a extração foram submetidos à digestão com as endonucleases de restrição *NdeI* e *HindIII* e analisados em gel de agarose 0,8 % para a confirmação do tamanho dos fragmentos obtidos. A reação de digestão continha: tampão R 1X (*Fermentas*), 500 ng de plasmídeo, 5 U de cada enzima, e água deionizada esterilizada para um volume final de 10 µL. O sistema de digestão foi incubado por 1 h a 37 °C.

Para a amplificação do inserto clonado foram utilizados os iniciadores M13 *forward* 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' e M13 *reverse* 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (*Invitrogen*). O seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes foi feito pelo método de terminação de cadeia (Sanger, 1977) com o uso do *kit DYEnamic™ ETdye terminator* em

seqüenciador automático de DNA MegaBACE<sup>TM</sup> 1000 (Amersham Biosciences, GE Healthcare). A qualidade da seqüência obtida foi validada por meio da análise no programa Phred (Ewing *et al.*, 1998). As seqüências foram então submetidas à comparação com o GenBank (NCBI) por meio do programa Blastn (Altschul *et al.*, 1990).

## 2.3- Construção de Vetores de Expressão

Para a construção de um vetor de expressão apropriado para a produção de SOD em células de *E. coli*, foram traçadas três estratégias distintas a saber:

(2.3.1) Eliminação de um sítio para *NdeI* no vetor pKEN1;

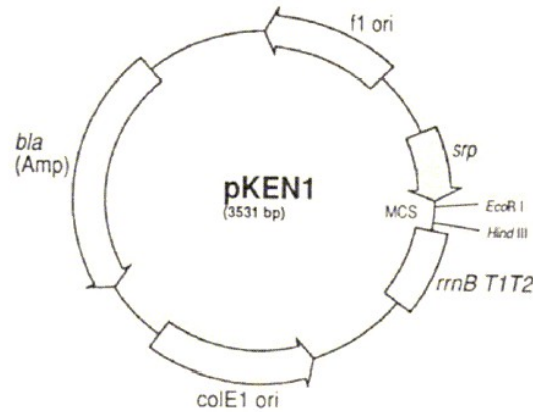
(2.3.2) Construção de um vetor derivado de pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> com promotor *srp*;

(2.3.3) Construção de um vetor derivado de pUC72 com promotor *srp*.

### 2.3.1- Eliminação de um Sítio para *NdeI* no Vetor pKEN1

A primeira estratégia adotada para a construção de um vetor para expressão de SOD foi baseada em um trabalho de Ezaz-Nikpay *et al.* (1994), os quais construíram um vetor de expressão altamente regulada denominado pKEN1 (figura 4). Este é derivado do plasmídeo pBS+ com a inserção de um promotor reprimido estericamente (*srp*), que contém entre as regiões -10 e -35 o sítio operador do *operon lac* (*lac O*). Essa construção permite que a proteína repressora de *lac* interfira estericamente com a RNA polimerase, evitando assim a formação de complexos transcricionais que podem se formar mesmo quando o *operon* encontra-se reprimido em condições normais.



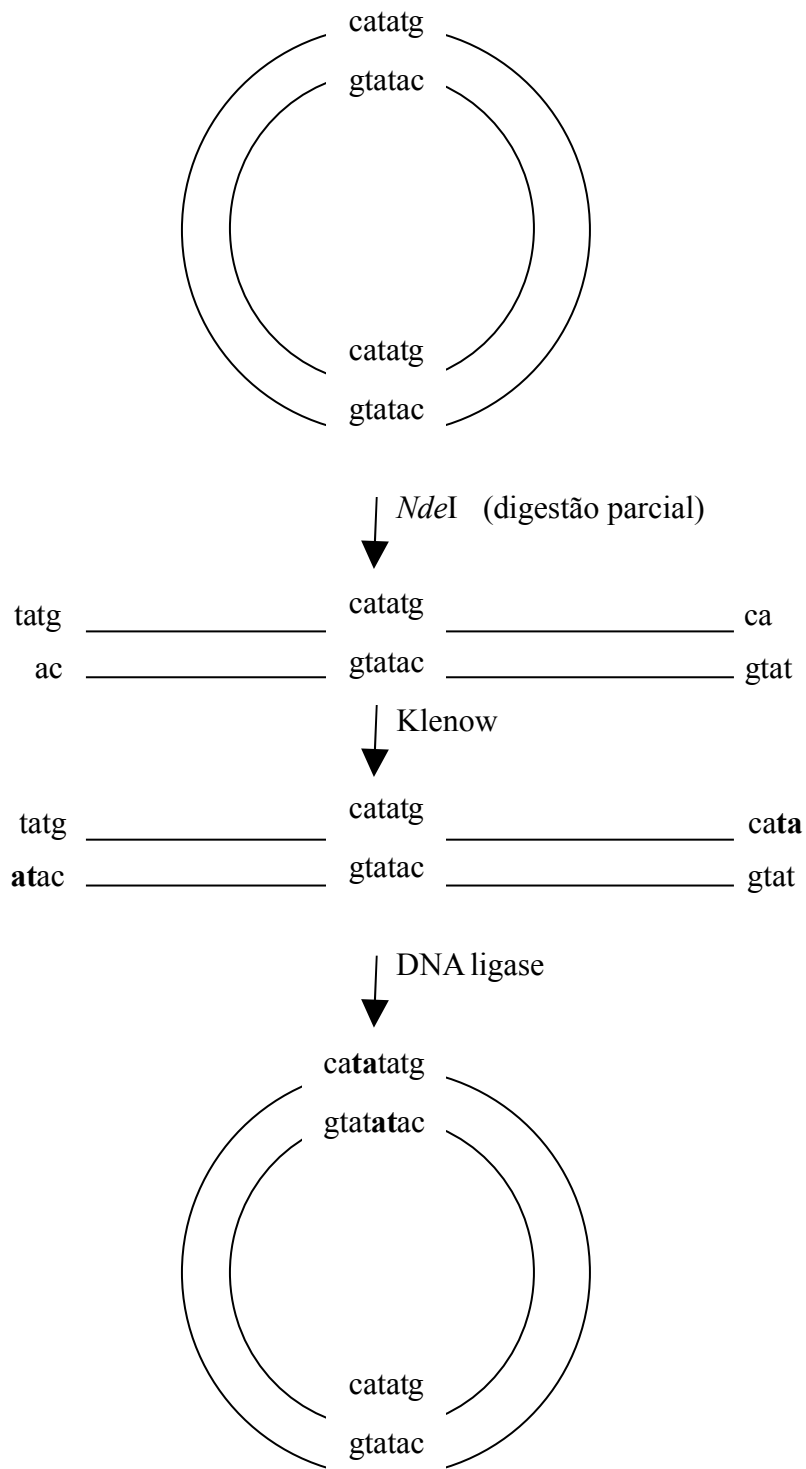


**Figura 4** – Mapa do vetor de expressão pKEN1. Em destaque são mostrados: sítios de clonagem (MCS), promotor *srp*, marcador de seleção (gene de resistência a ampicilina), origens de replicação e terminador de transcrição *rrnB T1T2* (fonte: Ezaz-Nikpay *et al.*, 1994).

A versão de pKEN1 disponível em nosso laboratório possuía um inserto de cerca de 750 pb correspondente ao gene repórter *gfp* (codificador da proteína verde fluorescente - GFP), clonado entre os sítios *EcoRI* e *HindIII*. Para utilizar pKEN1 como vetor de expressão para SOD de *C. violaceum* seria necessário primeiramente eliminar um sítio de restrição para *NdeI* na posição 185 do plasmídeo sem, contudo, alterar a seqüência de nucleotídeos de um outro sítio *NdeI* localizado junto ao início da tradução de *gfp*. Se o procedimento fôsse realizado com sucesso, teríamos a possibilidade de identificar os plasmídeos recombinantes que não contivessem a construção de interesse por meio da visualização da fluorescência emitida pelos clones quando expostos a luz ultravioleta, após termos clonado um inserto entre os sítios de *NdeI* e *HindIII*. Neste caso, o gene *gfp* não seria alterado, já que o sítio de *NdeI* resultante estaria localizado após o final do gene, onde está o sítio de *HindIII*. Por outro lado, se o sítio de *NdeI* no início da tradução de *gfp* fôsse mantido, e o outro eliminado, quando um inserto qualquer fôsse clonado no vetor, *gfp* seria liberado e assim não seria possível visualizar a emissão de fluorescência característica.

Dessa forma, foi proposta a utilização do fragmento maior da DNA Polimerase I, o fragmento Klenow, para preencher o “espaço” deixado pela digestão com *NdeI* em apenas um dos sítios presentes no plasmídeo, de modo que quando as extremidades preenchidas fôssem religadas, o sítio seria desfeito (figura 5).

Para a obtenção de corte para apenas um sítio de *NdeI*, foi realizado um teste de digestão com diferentes concentrações da enzima em dois períodos de incubação, 30 min e 120 min a 37 °C, com o intuito de verificar as melhores condições de digestão parcial de pKEN1-GFP. Após a digestão parcial de 1 µg do plasmídeo, a banda correspondente à presença de apenas um corte no DNA foi purificada do gel de agarose 0,8 %. Para preencher as extremidades coesivas deixadas pela endonuclease, o vetor linearizado foi tratado com 5 U da enzima Klenow num sistema de volume total de 40 µL, contendo ainda tampão 1X, dNTP 0,3 mM e água deionizada esterilizada. O sistema foi incubado nas seguintes condições: (A) 16 °C por 30 min; (B) 20 °C por 30 min; e (C) 65 °C por 15 min. A auto-ligação do plasmídeo foi feita com 5 U de T4 DNA ligase, num sistema incubado por 16 a 18 horas a 16 °C. Em seguida, o sistema de ligação foi precipitado, utilizando NaCl 3 M, 2,5 V de etanol absoluto e 2 µg de glicogênio; e clonado em células eletrocompetentes de XL1 Blue sensíveis a ampicilina.

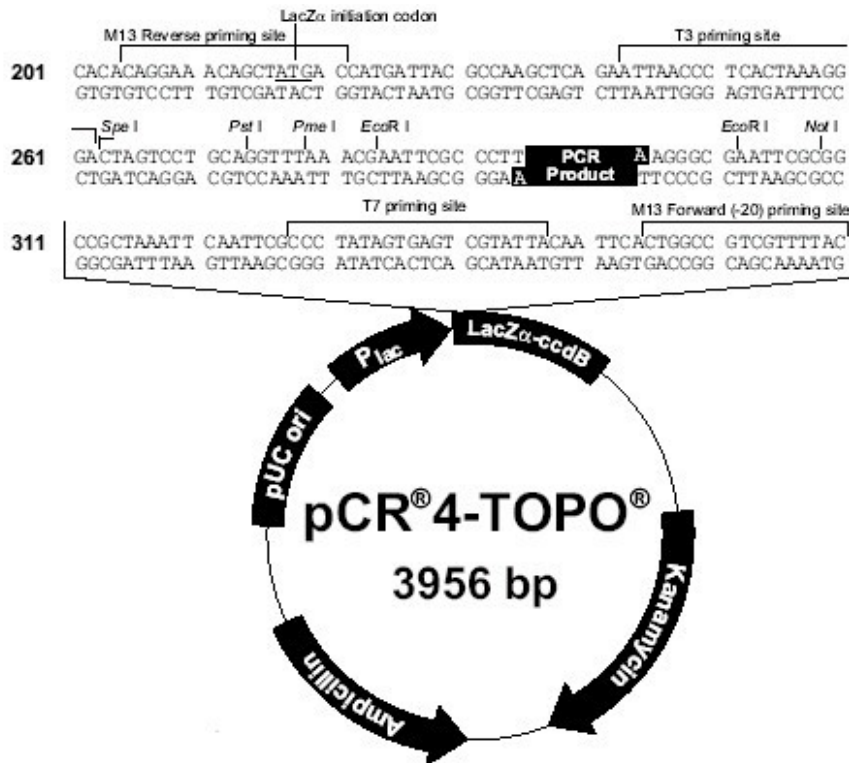


**Figura 5** – Estratégia para a eliminação de um sítio para *NdeI* do vetor pKEN1-GFP.



por 10 min, (D) 35 °C por 10 min, e (E) 28 °C por 10 min. Para o preenchimento das extremidades coesivas foram acrescentados 10 U de fragmento Klenow e tampão 1X, resultando num volume final de 60 µL. A incubação do sistema deu-se a (A) 16 °C por 30 min, (B) 20 °C por 30 min, e (C) 65 °C por 15 min.

O oligonucleotídeo dupla-fita obtido (denominado SRP) foi então submetido a um tratamento com 5 U de *Taq* DNA polimerase, durante 10 min a 72 °C, para a adição de desoxiadenosina trifosfato em suas extremidades 3'. Este passo foi necessário porque o vetor pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (figura 7) é um plasmídeo linear que, assim como o pGEM<sup>®</sup>-T *Easy*, possui em suas extremidades timinas livres prontas para se ligarem a produtos de PCR. O oligonucleotídeo SRP foi então purificado a partir de gel de agarose 1,0 % e incubado na presença de solução salina 4X durante 20 min a temperatura ambiente, juntamente com o vetor, para a reação de clonagem conforme especificações do fabricante. O sistema de ligação foi então utilizado para transformar células de *E. coli* TOP10 eletrocompetentes selecionadas em meio contendo 200 µg/mL de ampicilina.



**Figura 7** – Mapa do vetor pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen). Em destaque são mostrados: origem de replicação, promotor e genes marcadores de seleção. Em destaque, sítio de clonagem múltipla e região de anelamento dos iniciadores M13 e T3 (fonte: <http://www.invitrogen.com>).

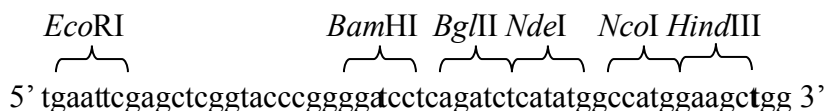
Para a confirmação da clonagem, alguns clones transformantes foram submetidos a PCR a partir de colônia utilizando iniciadores M13 *forward* e *reverse*, cujas sequências já foram apresentadas anteriormente. O produto de PCR esperado deveria apresentar um tamanho de aproximadamente 250 pb quando analisado em gel de agarose 1,0 %.

Os plasmídeos recombinantes pCR4-SRP foram extraídos e digeridos com *NdeI* e *EcoRI* (g↓aattc) para a visualização da liberação de inserto em gel de agarose 1,0 %.

### 2.3.3- Construção de um Vetor Derivado de pUC72 com Promotor *srp*

De maneira semelhante, o oligonucleotídeo descrito no item 2.3.2 também foi inserido no vetor de clonagem pUC72 (2683 pb), derivado de pUC18.

A fase inicial do experimento, que consistia no anelamento das fitas e preenchimento com Klenow foi idêntica a do item 2.3.2. No entanto, após a obtenção do oligonucleotídeo dupla-fita SRP, este foi digerido com *EcoRI* e *NdeI*, assim como o vetor pUC72. Os produtos da digestão foram purificados a partir de gel de agarose 1,0 % com o uso do kit *GFX PCR BandPrep* (*Amersham Biosciences, GE Healthcare*) e ligados com T4 DNA ligase. O produto ligado pUC-SRP foi precipitado e clonado em células TOP10 eletrocompetentes, sensíveis a ampicilina. Abaixo o sítio de clonagem múltipla de pUC72:



A confirmação da clonagem foi realizada também de maneira semelhante ao item anterior: PCR de colônia utilizando iniciadores M13, extração dos plasmídeos recombinantes pUC-SRP e digestão com *NdeI* e *EcoRI*.

### 2.4- Subclonagem em Vetores de Expressão

Após a obtenção dos vetores de expressão, procedeu-se a subclonagem do gene *sodB1* e, em alguns casos, de outros genes utilizados como controle para a verificação da expressão heteróloga.

Para a liberação de *sodB1*, os plasmídeos recombinantes pG-SOD foram submetidos à digestão primeiramente com *NdeI* e logo em seguida com *NotI* (gc↓ggccgc) (item 2.4.1) ou

então digestão dupla com *NdeI* e *HindIII* (itens 2.4.2 e 2.4.3) para posterior subclonagem junto aos sítios respectivos do vetor de expressão, previamente digerido com as mesmas enzimas. Inseto e vetor foram então purificados do gel de agarose 0,8 %, ligados com T4 DNA ligase e precipitados.

Para todos os casos descritos a seguir, os clones transformantes foram selecionados em meio LB contendo 200 µg/mL de ampicilina.

#### **2.4.1- Subclonagem de *sodB1* em pCR4-SRP para expressão heteróloga**

O sistema de ligação pCR4-SRP+SOD foi inserido em células eletrocompetentes de *E. coli* DH5αF'IQ, as quais apresentam gene que codifica para proteína repressora do promotor *lac*. Dessa forma, a expressão de SOD poderia ser inibida, diminuindo o risco de qualquer efeito deletério para a célula.

Os clones transformantes foram repicados para placas contendo meio LB acrescido somente de 200 µg/mL de ampicilina e placas contendo meio LB acrescido de 200 µg/mL de ampicilina mais 2 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo). O IPTG é um análogo da lactose, utilizado como indutor para expressão do promotor *lac*. Os dois sistemas (com e sem IPTG) foram comparados quanto ao crescimento dos clones para a seleção daqueles potencialmente expressando a proteína recombinante.

#### **2.4.2- Subclonagem de *sodB1* em pUC-SRP para expressão heteróloga**

O sistema de ligação pUC-SRP+SOD foi inserido por eletroporação em células DH5αF'IQ. Como experimento controle, também foram subclonados em pUC-SRP genes codificadores para a α-amilase e para a *Pfu* DNA polimerase, ambos clonados em pGEM®-T

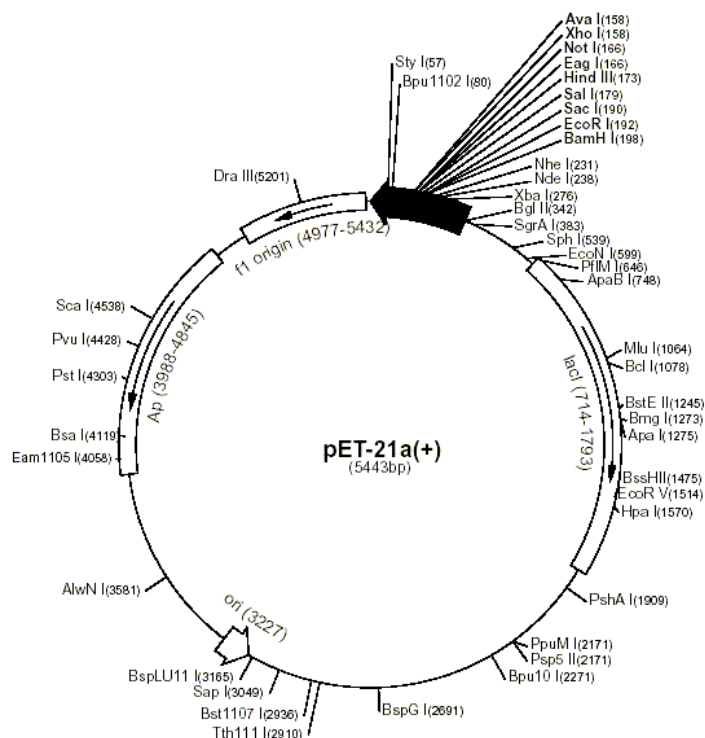


*Easy*, sendo que os sistemas de ligação foram denominados pUC-SRP+AMY e pUC-SRP+PFU, respectivamente.

### 2.4.3- Subclonagem de *sodB1* em pET-21a para expressão heteróloga

O vetor de expressão pET-21a (*Novagen*) apresenta um promotor de baixa regulação, o T7, sendo um vetor apropriado para altos níveis de expressão heteróloga (figura 8).

Células de *E. coli* XL1 Blue eletrocompetentes foram transformadas com o sistema de ligação pET-SOD. Alguns clones transformantes selecionados foram digeridos com *NdeI* e *HindIII* para a verificação da liberação de *sodB1* e, dessa forma, confirmar a clonagem.

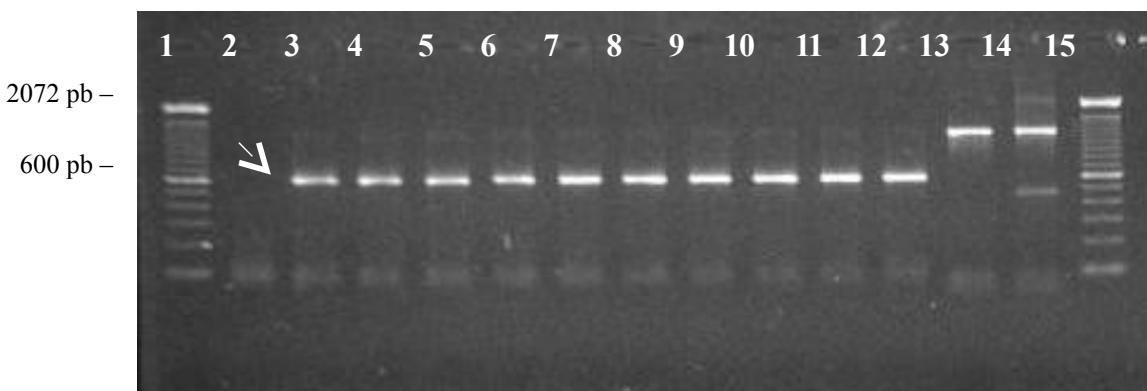


**Figura 8** - Mapa do vetor pET-21a. Em destaque são mostrados: sítio de clonagem múltipla, origem de replicação e gene marcador de seleção (fonte: <http://www.novogene.com>).

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

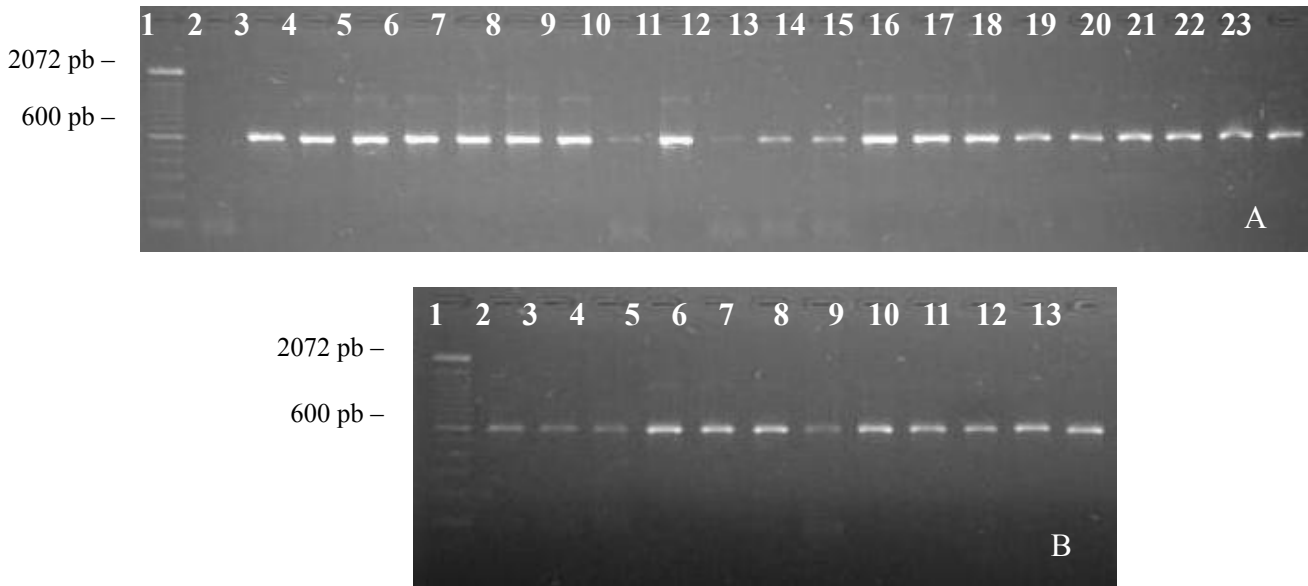
#### 3.1- Amplificação das Sequências Correspondentes aos Genes *sodB*

A amplificação de *sodB1* de *C. violaceum* ATCC 12472 ocorreu com sucesso em todas as temperaturas de anelamento de iniciadores testadas. Além da reação teste, foram acrescentados também um controle negativo sem DNA e dois controles positivos com DNA molde de duas linhagens diferentes de *C. violaceum*: ATCC 12472 e CVT12, ambos utilizando um par de iniciadores para 16S rDNA (figura 9).



**Figura 9** - Amplificação de *sodB1* em diferentes temperaturas (°C): 50 (2), 51,2 (3), 52,5 (4), 54,2 (5), 56,4 (6), 58,9 (7), 61 (8), 62,7 (9), 63,9 (10), 64,7 (10). Colunas 1 e 15 – marcador de peso molecular *ladder* 100 pb (*Invitrogen*); coluna 2 – controle negativo; coluna 13 – controle positivo ATCC 12472; coluna 14 – controle positivo CVT12. A seta indica a banda de cerca de 600 pb correspondente à seqüência amplificada.

Para avaliar a amplificação do gene *sodB1* em outras linhagens de *C. violaceum*, foram feitas PCRs utilizando o DNA de 32 isolados da Amazônia. A análise em gel de agarose confirmou a amplificação do gene para todas as amostras, demonstrando a eficiência e confiabilidade do par de iniciadores desenhado (figura 10).

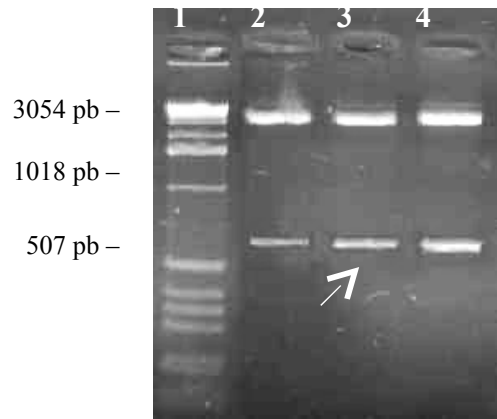


**Figura 10** – Amplificação de *sodB1*, dividido nas figuras A e B. Colunas 4 a 23 na figura A e 2 a 13 na figura B – genes *sodB1* amplificados para diferentes linhagens de *C. violaceum* isolados na Amazônia; colunas 1A e 1B – marcador de peso molecular *ladder* 100 pb; coluna 2A – controle negativo sem DNA; e coluna 3A – controle positivo ATCC 12472.

Para o gene *sodB2* não houve amplificação utilizando-se as condições propostas inicialmente. Com o intuito de tentar otimizar a reação, foram testados outros fatores que afetam a PCR, tais como: concentração de dNTPs, concentração de  $MgCl_2$ , concentração de iniciadores e concentração de DNA molde. Apesar das alterações, não foi possível obter produto de amplificação para esse gene.

### 3.2- Análise de Restrição e Seqüenciamento dos Plasmídeos Recombinantes

Com a clonagem do produto de PCR no vetor pGEM<sup>®</sup>-T *Easy*, foi obtido o vetor pG-SOD (3,6 kb). Após o tratamento do plasmídeo recombinante com as endonucleases *NdeI* e *HindIII*, foi observada em gel de agarose a liberação de um inserto de cerca de 600 pb, conforme esperado, confirmando assim a clonagem do gene de interesse (figura 11).



**Figura 11** – Análise de restrição de pG-SOD com *NdeI* e *HindIII*. Coluna 1 – marcador de peso molecular *ladder* 1 kb (*Invitrogen*); coluna 2 a 4 – plasmídeos digeridos com *NdeI* e *HindIII*. A seta indica um dos fragmentos liberados.

O seqüenciamento dos plasmídeos pG-SOD e a análise por Blastn indicaram uma similaridade completa com o gene *sodB1* de *C. violaceum* (E-value 0.0; Score = 1148 bits; 100 % de identidade). Com este resultado, a integridade da seqüência amplificada pôde ser confirmada, indicando a fidelidade do processo de amplificação.

Outros resultados obtidos de similaridade alta foram: Fe-SOD de *Ralstonia solanacearum* (E-value 2e-108, Score = 400 bits, 85 % de identidade) e SOD de *Bordetella bronchiseptica* (E-value 2e-83, Score = 317 bits, 82 % de identidade). Quando comparado com os genomas de outros organismos já depositados no *GenBank*, o genoma de *C. violaceum* apresenta uma maior similaridade com o de *R. solanacearum* (Vasconcelos *et al.*, 2004), uma bactéria fitopatogênica, sendo *sodB1* um exemplo da proximidade genética entre estes microrganismos. *B. bronchiseptica* é uma  $\beta$ -proteobactéria patogênica que coloniza o trato respiratório de mamíferos.

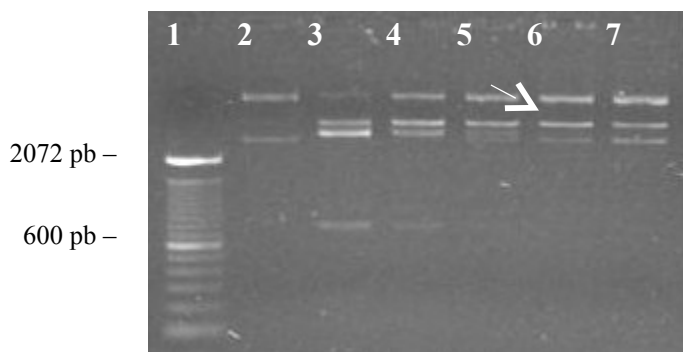
Com a confirmação da integridade da sequência de *sodB1* clonada em pGEM<sup>®</sup>-T *Easy* (pG-SOD), o gene isolado poderia ser então subclonado em vetor de expressão para a produção de Fe-SOD recombinante em *E. coli*.

### 3.3- Construção de Vetores de Expressão

#### 3.3.1- Eliminação de um sítio para *NdeI* no vetor pKEN1

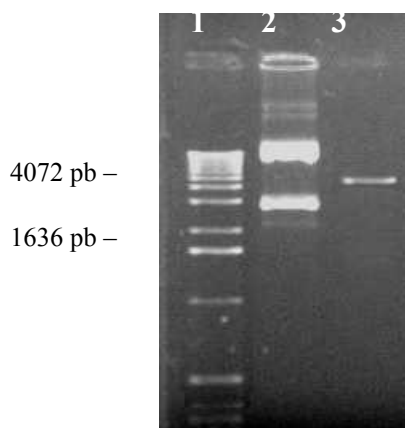
Para possibilitar a clonagem do gene *sodB1* em um vetor de expressão derivado de pKEN1 foi seguida a estratégia experimental descrita no item 2.3.1 (Material e Métodos).

A análise de restrição de pKEN1-GFP utilizando diferentes concentrações de *NdeI* por 30 min (figura 12) e 120 min (dados não mostrados) resultou na obtenção do plasmídeo linear (3,5 kb), a partir de digestão parcial. A amostra tratada por 30 min com 1,25 U da enzima (coluna 6) foi escolhida para prosseguir com o experimento, uma vez que nestas condições foram obtidos fragmentos isolados.



**Figura 12** – Análise de restrição de pKEN1-GFP com diferentes concentrações de *NdeI*, num sistema incubado por 30 min a 37 °C. Coluna 1 – marcador de peso molecular *ladder* 100 pb; coluna 2 – plasmídeo intacto (controle), colunas 3 a 7 – pKEN1-GFP digerido com (3) 5 U, (4) 2,5 U, (5) 1,25 U, (6) 0,62 U, e (7) 0,31 U de *NdeI*. A seta indica uma das bandas correspondentes à digestão parcial.

Nenhum clone foi obtido após transformação das células com pKEN1-GFP tratado com Klenow e auto-ligado (pKEN-nde). A análise do sistema de ligação em gel de agarose (figura 13) mostrou que o plasmídeo permaneceu linearizado após incubação com T4 DNA ligase (coluna 3). Testes com cinco alíquotas diferentes de DNA ligases disponíveis no laboratório foram realizados, tendo pUC18 como controle, e todas mostraram atividade frente o substrato (dados não mostrados). O experimento foi então repetido desde o passo de digestão com *NdeI*, mas os resultados permaneceram os mesmos. Testes utilizando diferentes sistemas de digestão parcial com *NdeI* foram realizados, prosseguindo com os passos seguintes do experimento, porém não foram obtidos resultados satisfatórios.

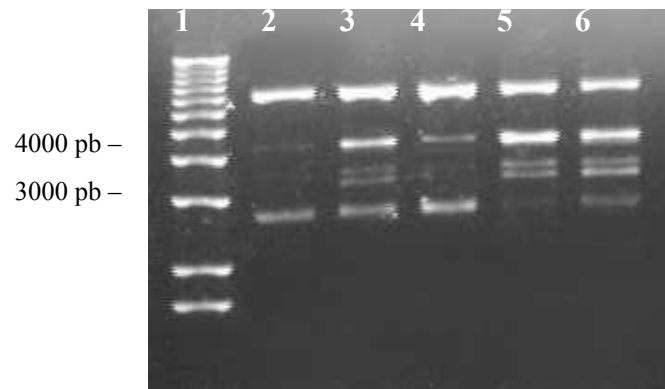


**Figura 13** – Sistema de ligação para pKEN-nde. Coluna 1 – marcador de peso molecular *ladder* 1 kb; coluna 2 – pKEN1-GFP intacto (controle); e coluna 3 – pKEN-nde tratado com T4 DNA ligase.

Fragmentos com extremidades abruptas apresentam uma maior dificuldade para ligarem entre si do que fragmentos com extremidades coesivas. A taxa de ligação é de 50 vezes maior nesses últimos. Apesar da probabilidade menor de obter plasmídeos religados, pelo fato de o plasmídeo obtido apresentar extremidades abruptas, o resultado esperado era

de que pelo menos alguns clones transformantes fôssem obtidos, considerando a eficiência de transformação genética obtida nos experimentos, que foi de aproximadamente  $10^5$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA. Este pode ter sido um fator limitante para a estratégia proposta.

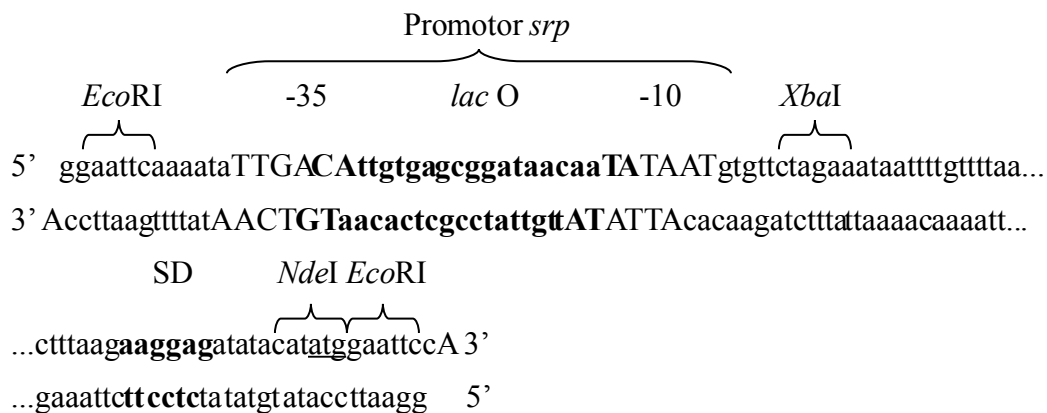
A possibilidade de o gene *gfp* clonado em pKEN1 possuir sítios internos para *NdeI* foi verificada. A análise em gel de agarose 0,8 % da digestão total do plasmídeo incubado por 3 horas mostrou o aparecimento de múltiplos fragmentos não observados nos géis anteriores (figura 14). No *GenBank* estão depositadas centenas de seqüências para *gfp*, que podem variar quanto ao conteúdo de sítios de restrição. Os resultados indicam que o gene clonado no plasmídeo utilizado apresenta sítios adicionais de *NdeI*, o que tornou inviável o prosseguimento desta estratégia.



**Figura 14** – Análise de restrição de pKEN1-GFP com *NdeI*. Coluna 1 – marcador de peso molecular *ladder* 1 kb *plus* (*Invitrogen*); coluna 2 – plasmídeo intacto (controle), colunas 3 a 6 – plasmídeos digeridos.

### 3.3.2- Construção de um vetor derivado de pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> com promotor *srp* altamente regulável

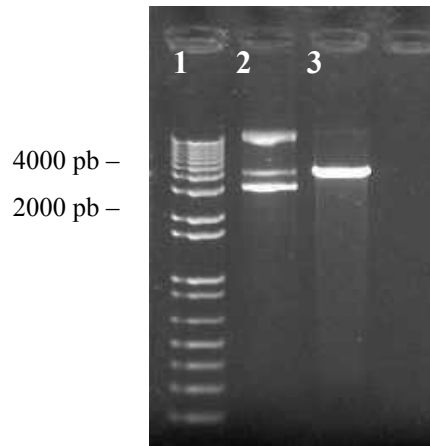
O oligonucleotídeo SRP sintético (figura 15), obtido conforme descrito no item 2.3.2 (Material e Métodos), foi utilizado para a construção de um vetor de expressão para a produção de SOD recombinante.



**Figura 15** – Oligonucleotídeo SRP sintético. Em destaque são mostradas as seqüências correspondentes aos sítios de restrição, promotor *srp*, região SD e códon de início da tradução (sublinhado). As desoxiadenosinas trifosfato encontradas nas extremidades 3' do oligonucleotídeo foram adicionadas pela *Taq* DNA polimerase.

O êxito da clonagem de SRP em pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> foi confirmado pela obtenção de clones recombinantes, sendo o plasmídeo obtido denominado pCR4-SRP. Fragmentos de tamanho esperado foram obtidos a partir da amplificação da região contendo o inserto, utilizando iniciadores M13 (dados não mostrados). A análise de restrição em gel de agarose 0,8 % mostrou a presença de um sítio para a endonuclease *NdeI* no plasmídeo, indicando portanto a incorporação do oligonucleotídeo SRP ao vetor em questão (figura 16), uma vez que pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> não apresenta sítio para esta enzima.



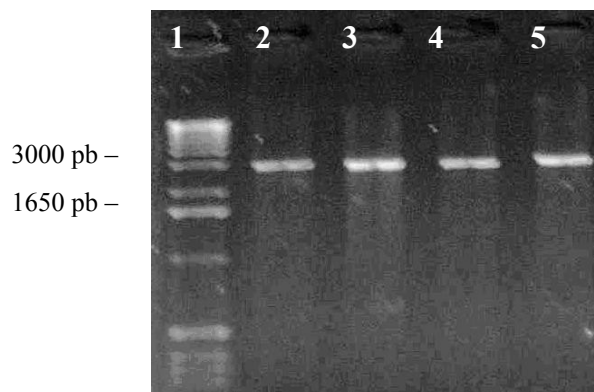


**Figura 16** – Análise de restrição de pCR4-SRP com *NdeI*. Coluna 1 – marcador de peso molecular *ladder* 1 kb *plus*; coluna 2 – pCR4-SRP intacto (controle); e coluna 3 – pCR4-SRP digerido.

### 3.3.3- Construção de um vetor derivado de pUC72 com promotor *srp*

Conforme descrito anteriormente (item 2.3.3 de Material e Métodos), o oligonucleotídeo SRP sintético foi obtido apresentando a mesma seqüência mostrada na figura 15, mas sem desoxiadenosinas trifosfato livres nas extremidades 3'.

A partir da amplificação da região correspondente ao MCS de pUC72, foram obtidos fragmentos de tamanho esperado (250 pb), confirmando assim a clonagem de SRP (dados não mostrados). Como resultado da digestão de pUC-SRP com *XbaI* foram obtidos plasmídeos lineares (figura 17), indicando a presença de um sítio de restrição presente no oligonucleotídeo sintetizado mas não no plasmídeo original.



**Figura 17** – Análise de restrição de pUC-SRP com *Xba*I. Coluna 1 – marcador de peso molecular *ladder* 1 kb *plus*; colunas 2 a 5 – pUC-SRPs digeridos.

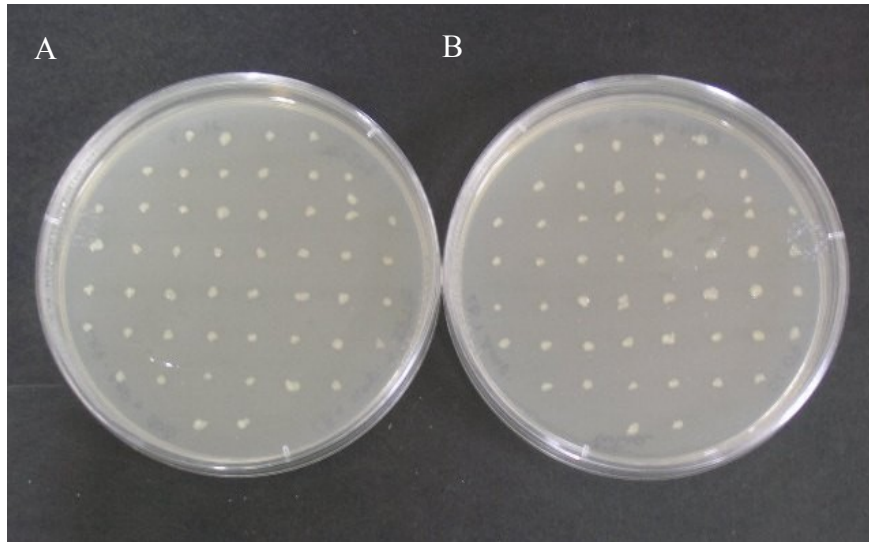
A digestão de pUC-SRP com as enzimas *Eco*RI e *Nde*I indicou a liberação de um fragmento de cerca de 100 pb, correspondente ao fragmento SRP (dados não mostrados).

### 3.4- Subclonagem de *sodB1* em Vetores de Expressão

#### 3.4.1- Subclonagem de *sodB1* em pCR4-SRP

A subclonagem de *sodB1* no vetor pCR4-SRP foi descrita no item 2.4.1 (Material e Métodos).

Clones transformantes foram obtidos em meio seletivo e, em seguida, repicados para meio LB com e sem IPTG, com o intuito de selecionar células para testes subsequentes de indução da expressão gênica. Após a análise preliminar de 80 clones transformantes, não foi observado indício de produção da proteína recombinante, ou seja, não houve diferença no tamanho dos clones quando crescidos na presença ou ausência do indutor da expressão gênica IPTG (figura 18).



**Figura 18** – Clones pCR4-SRP+SOD crescidos na presença e ausência de IPTG. (A) Clones em meio LB contendo 200 µg/mL de ampicilina e IPTG 2mM; (B) clones em meio LB contendo 200 µg/mL de ampicilina.

A análise de restrição com *NdeI* e *HindIII* de alguns clones selecionados aleatoriamente indicou que nenhum deles continha o inserto (figura 19).



**Figura 19** – Análise de restrição de pCR4-SRP+SOD com *NdeI* e *HindIII*. Coluna 1 – marcador de peso molecular *ladder* 1 kb *extension* (*Invitrogen*); coluna 2 – pG-SOD digerido; coluna 3 a 10 – pCR4-SRP+SOD digeridos. A seta indica o fragmento liberado correspondente ao gene *sodB1*.

Paralelamente, outro trabalho foi realizado no laboratório utilizando as células DH5αF 1Q para a análise da expressão gênica heteróloga a partir do vetor caça-promotor pKK232-8.

Os resultados confirmaram a eficiência destas células na inibição da expressão gênica (dados não publicados).

Apesar da utilização de células hospedeiras apropriadas para a inibição de promotores baseados no sistema *lac*, o cassete de expressão obtido parece ter sido letal para as células. A manutenção de um plasmídeo de expressão ocasionalmente induz uma resposta de estresse, alterando de maneira drástica vários processos celulares, especialmente quando a proteína recombinante é superexpressa (Hoffmann e Rinas, 2004). Dessa forma, a toxicidade promovida por altas concentrações de proteínas recombinantes podem causar recombinação genética, perda do vetor, proteólise *in vivo* da proteína alvo, retardamento no crescimento ou até mesmo morte celular (Sorensen e Mortensen, 2005).

Um importante fator que pode ter contribuído para um alto nível de expressão da proteína recombinante foi a inclusão de uma região *UP element* à montante da região -35 do promotor *srp*. Esta seqüência, também conhecida como *enhancer*, pode aumentar consideravelmente os níveis de transcrição do(s) gene(s) sob o controle do promotor ao qual está associada (Schumann e Ferreira, 2004).

### **3.4.2- Subclonagem de *sodB1* em pUC-SRP**

As subclonagens dos fragmentos gênicos para superóxido dismutase,  $\alpha$ -amilase e *Pfu* DNA polimerase em pUC-SRP estão descritas no item 2.4.2 (Material e Métodos).

Nenhum clone foi obtido a partir da transformação da linhagem DH5 $\alpha$ F'IQ com os 3 sistemas de ligação (pUC-SRP+SOD, pUC-SRP+AMY ou pUC-SRP+PFU). Os resultados também foram negativos quando: (A) foi repetida a transformação genética utilizando os mesmos sistemas de ligação, (B) foi repetida a ligação utilizando os mesmos produtos purificados, e (C) foi repetida a digestão dos vetores.

De forma similar ao que foi descrito no item 3.4.1 para os clones pCR4-SRP+SOD, a superexpressão de proteínas recombinantes promovida pelo cassete de expressão em estudo possivelmente ocasionou a morte das células hospedeiras, mesmo na ausência de um indutor. O UP *element* também deve ter contribuído para esta superexpressão.

### **3.4.3- Subclonagem de *sodB1* em pET-21a**

Como descrito no item 2.4.3 (Material e Métodos), *sodB1* foi subclonado no vetor de expressão comercial pET-21a (*Novagen*) para a obtenção de clones superexpressando Fe-SOD de *C. violaceum*.

A análise em gel de agarose 0,8 % da digestão com *NdeI* e *HindIII* dos clones transformantes pET-SOD mostrou que nenhuma das amostras continha o gene *sodB1* (dados não mostrados). A transformação por eletroporação foi repetida, desta vez utilizando-se células TOP10, mas novamente cresceram somente clones sem o inserto.

Paralelamente, o gene para a *Pfu* DNA polimerase foi clonado no vetor pET-21a e a análise de restrição mostrou que clones recombinantes pET-PFU foram obtidos (dados não mostrados).

Uma possível explicação para estes resultados é a de que o promotor T7, presente no vetor pET-21a, induz à superexpressão fracamente regulada das proteínas recombinantes, não sendo recomendado para a produção heteróloga de produtos tóxicos ou de produtos que possam vir a se tornar tóxicos para a célula quando acumulados em grandes quantidades. Apesar de as células utilizadas no experimento (XL1 Blue e TOP10) não apresentarem em seus cromossomos o gene responsável pela codificação da T7 RNA polimerase, necessária para a transcrição do gene cuja expressão esteja sob o controle do promotor T7, acredita-se

que houve nível de expressão suficiente para que as células sofressem efeitos deletérios, impossibilitando assim a obtenção de vetores recombinantes pET-SOD.

#### 4- CONCLUSÕES

A estratégia para o isolamento dos genes codificadores para superóxido dismutases de *C. violaceum* demonstrou bons resultados para a ORF CV2504, tendo sido obtido o gene *sodB1* completo clonado em pGEM<sup>®</sup>-T *Easy*.

O par de iniciadores sintetizado para a amplificação de *sodB1* foi eficiente para amplificação do gene de todos os isolados de *C. violaceum* da Amazônia depositados no Laboratório de Tecnologias de DNA da UFAM, trazendo a possibilidade de seleção de outros genes *sodB1* para expressão heteróloga. A amplificação de *sodB2* não foi obtida.

Os plasmídeos pCR4-SRP e pUC-SRP, desenvolvidos para a expressão de SOD em *E. coli*, provavelmente induziram a superexpressão dos genes clonados, acarretando a eliminação dos clones recombinantes.

Outras estratégias para a construção de vetores apropriados para expressão regulada de SOD foram delineadas, mas nenhuma originou os produtos esperados. Isso demonstra a necessidade da obtenção prévia de vetores de expressão, seja pelo seu desenvolvimento por técnicas de Engenharia Genética em laboratório, seja pela aquisição de vetores comerciais com níveis de produção protéica assegurados pelas empresas competentes.

### 3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amo, T.; Atomi, H.; Imanaka, T. 2003. Biochemical properties and regulated gene expression of the superoxide dismutase from the facultatively aerobic hyperthermophile *Pyrobaculum calidifontis*. *Journal of Bacteriology*, 185: 6340-6347.
- Anderson, D. 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 350(1): 103-108.
- Andrade, E.V.; Albuquerque, F.C.; Moraes, L.M.P.; Brígido, M.M.; Santos-Silva, M.A. 2000. Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. *Journal Of Biochemistry*, 128(6): 891-895.
- Andrighetti-Fröhner, C.R.; Antonio, R.V.; Creczynski-Pasa, T.B.; Barardi, C.R.M.; Simões, C.M.O. 2003. Citotoxicity and potencial antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(6): 843–848.
- Andrus, J.M.; Bowen, S.W.; Klaenhammer, T.R.; Hassan, H.M. 2003. Molecular characterization and functional analysis of the manganese-containing superoxide dismutase gene (*sodA*) from *Streptococcus thermophilus* AO54. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 420: 103–113.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5): 411-421.



- Benov, L.T.; Fridovich, I. 1994. *Escherichia coli* expresses a copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 25310-25314.
- Benzie, I.F.F. 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 39: 53–61.
- Bergonzini, C. 1881. Um nuevo bacterio colorato. *Ann. Soc. Natural. Modena.*, Ser.2, 14: 149-158.
- Bhattacharya, J.; GhoshDastidar, K.; Chatterjee, A.; Majee, M.; Majumder, A.L. 2004. *Synechocystis* Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(2): 540-544.
- Birnboim, H.C.; Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6): 1513-1523.
- Boisbaudran, L. 1882. Matière colorante se formant dans la colle de farine. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 94: 562-563.
- Bullock, W.O.; Fernandez, J.M.; Short, J.M. 1978. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with a beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5:376-379.
- 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.
- Cymbalyuk, E.S.; Chernomordik, L.V.; Broude, N.E.; Chizmadzhev, Yu.A. 1988. Electro-stimulated transformation of *E. coli* cells pretreated by EDTA solution. *FEBS Letters*, 234(1): 203-207.

- Dufour, E.; Larsson, N.G. 2004. Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1658(1-2): 122-132.
- Durán, N.; Erazo, S.; Campos, V. 1983. Bacterial chemistry. II. Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 55: 231–234.
- Durán, N.; Campos, V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Pereira, M.F.; Haun, M. 1989. Bacterial chemistry. III. Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 61: 31–36.
- Durán, N.; Menck, C.F.M. 2001. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 27(3): 201-222.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C.; Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8: 175-185.
- Ezaz-Nikpay, K.; Uchino, K.; Lerner, R.E.; Verdine, G.L. 1994. Construction of an overproduction vector containing the novel *srp* (sterically repressed) promoter. *Protein Science*, 3(1): 132-138.
- Finkel, T. 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2): 247–254.
- Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14): 7761–7764.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97–112.
- Fridovich, I. 1997. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30): 18515–18517.

- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1203–1209.
- Fubini, B.; Hubbard, A. 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(12): 1507–1516.
- Gabbianelli, R.; Signoretti, C.; Marta, I.; Battistoni, A.; Nicolini, L. 2004. *Vibrio cholerae* periplasmic superoxide dismutase: isolation of the gene and overexpression of the protein. *Journal of Biotechnology*, 109(1-2): 123-130.
- Hassan, H.M. 1988. Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radical Biology & Medicine*, 5: 377-385.
- Hoffmann, F.; Rinas, U. 2004. Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 89: 73-92.
- Imlay, J.A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, 57: 395–418.
- Jana, S.; Deb, J.K. 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67: 289-298.
- Jessee, J.; Blodgett, K. 1988. MAX Efficiency *E. coli* DH5.alpha.FIQ.TM.: a new M13 and phagemid host. *BRL Focus*, 10:69.
- Lassègue, B.; Griendling, K.K. 2004. Reactive oxygen species in hypertension: an update. *American Journal of Hypertension*, 17(9): 852-860.
- Leon, L.L.; Miranda, C.C.; De Souza, A.O.; Durán, N. 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 449-450.

- Liochev, S.I.; Fridovich, I. 2002. The Haber-Weiss cycle – 70 years later: an alternative view. *Redox Report*, 7(1).
- Loguercio, C.; Federico, A. 2003. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(1): 1-10.
- Keele, B.B., Jr; McCord, J.M.; Fridovich, I. 1970. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 245(22): 6176-6181.
- Keyer, K.; Gort, A.M.; Imlay, J.A. 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *Journal of Bacteriology*, 177(23): 6782-6790.
- Kitashiba, H.; Ishizaka, T.; Isuzugawa, K.; Nishimura, K.; Suzuki, T. 2004. Expression of a sweet cherry DREB1/CBF ortholog in *Arabidopsis* confers salt and freezing tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 161(10): 1171-1176.
- Makrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60(3): 512-538.
- Marinus, M.G. 1973. Location of DNA methylation genes on the *Escherichia coli* K-12 genetic map. *Molecular & General Genetics*, 127:47-55.
- McCord, J.M.; Fridovich, I. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 243(21): 5753-5760.
- McCord, J.M.; Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *Journal of Biological Chemistry*, 244(22): 6049-6055.
- McCord, J.M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 108: 652-659.

- Melo, P.S.; Maria, S.S.; Vidal, B.C.; Haun, M.; Durán, N. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Animal.*, 36: 639–543.
- Michalski, W.P. 1996. Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *Journal of Chromatography B.*, 684: 59–75.
- Miller, A.-F. 2001. Fe superoxide dismutase. *In: Messerschmidt, A.; Huber, R.; Poulos, T.; Wieghardt, K. (Eds). Handbook of metalloproteins.* John Wiley & Sons Ltd, Chichester. p. 668–682.
- Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P.H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *European Molecular Biology Organization Journal.*, 1(7): 841-845.
- Ödberg-Ferragut, C.O.; Renault, J.P.; Viscogliosi, E.; Toursel, C.; Briche, I.; Engels, A.; Lepage, G.; Morgenstern-Badarau, I.; Camus, D.; Tomavo, S.; Dive, D. 2000. Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor characterisation of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 106(1): 121-129.
- Paramchuk, W.J.; Ismail, S.O.; Bhatia, A.; Gedamu, L. 1997. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90(1): 203-221.
- Pelicano, H.; Carney, D.; Huang, P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2): 97–110.
- Roberto, P.G.; Kashima, S.; Soares, A.M.; Chioato, L.; Faça, V.M.; Fuly, A.L.; Astolfi-Filho, S.; Pereira J.O.; França, S.C. 2004. Cloning and expression of an acidic platelet

- aggregation inhibitor phospholipase A<sub>2</sub> cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. *Protein Expression and Purification*, 37(1): 102-108.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R., Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. 1988 Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Sambrook, J.; Fritesh, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>a</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- San Mateo, L.R.; Toffer, K.L.; Kawula, T.H.. 1998. The *sodA* gene of *Haemophilus ducreyi* encodes a hydrogen peroxide-inhibitable superoxide dismutase. *Gene*, 207(2): 251-257.
- Sanger, F. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS*, 74: 5463-5467.
- Santos, R.; Bocquet, S.; Puppo, A.; Touati, D. 1999. Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 181(15): 4509–4516.
- Schott, E.J.; Vasta, G.R. 2003. The PmSOD1 gene of the protistan parasite *Perkinsus marinus* complements the *sod2Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, and directs na iron superoxide dismutase to mitochondria. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 126: 81–92.
- Schumann, W.; Ferreira, L.C.S. 2004. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3): 442-453.
- Son, O-L.; Kim, H-T.; Ji, M-H.; Yoo, K-W.; Rhee, M.; Kim, C-H. 2003. Cloning and expression analysis of a Parkinson's disease gene, *uch-L1*, and its promoter in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(3): 601-607.
- Sorensen, H.P.; Mortensen, K.K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115:113–128.

- Stephens, C. 2004. Microbial genomics: tropical treasure? *Current Biology*, 14: 65–66.
- Sydow, K.; Münzel, T. 2003. Diabetes mellitus, oxidative stress and endothelial dysfunction. *International Congress Series*, 1253: 125–138.
- Tabares, L.C.; Bittel, C.; Carrillo, N.; Bortolotti, A.; Cortez, N. 2003. The single superoxide dismutase of *Rhodobacter capsulatus* is a cambialistic, manganese-containing enzyme. *Journal of Bacteriology*, 185: 3223-3227.
- Torres, A.C.; Ferreira, A.T.; Sá, F.G. de; Buso, J.A.; Caldas, L.S.; Nascimento, A.S.; Brígido, M.M.; Romano, E. 2000. *Glossário de Biotecnologia Vegetal*. Brasília: Embrapa Hortaliças. 128p.
- Vasconcelos, A.T.R. *et al.* (Brazilian National Genome Project Consortium). 2003. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20): 11660–11665.
- Wu, S-C.; Huang, H.; Lin, C-C. 2004. Expression and functional characterization of *Helicobacter pylori* catalase from baculovirus-infected insect cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6-7): 482-487.
- Williams, M.S.; Kwon, J. 2004. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(8): 1144–1151.
- Yazawa, K.; Takahata, K.; Kamada, H. 2004. Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(3): 215-223.
- Yokoyama, M. 2004. Oxidant stress and atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(2): 110-115.

- Yost, F.J., Jr; Fridovich, I. 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 248(14): 4905–4908.
- Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu/Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3): 337–349.
- Zhu, X.; Raina, A.K.; Lee, H.; Casadesus, G.; Smith, M.A.; Perry, G. 2004. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1000(1-2): 32–39.