André Andrade Baceti

Construção de biossensor para detecção de
compostos BTEX baseado em fosfatase
alcalina sob regulação *xylR*/Pu e avaliação de
sua regulação metabólica

Dissertação apresentada ao Departamento
de Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2011

André Andrade Baceti

Construção de biossensor para detecção de
compostos BTEX baseado em fosfatase
alcalina sob regulação *xylR*/Pu e avaliação de
sua regulação metabólica

Dissertação apresentada ao Departamento
de Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider

SÃO PAULO
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Baceti, André Andrade.

Construção de biossensor para detecção de compostos BTEX baseado em fosfatase alcalina sob regulação xyLR/Pu e avaliação de sua regulação metabólica / André Andrade Baceti. -- São Paulo, 2011.

Orientador: René Peter Schneider.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia.

Versão do título para o inglês: Construction of a biosensor for BTEX compounds detection based on alkaline phosphatase under regulation of xyLR/Pu and evaluation of its metabolic regulation.

Descritores: 1. Microbiologia ambiental 2. Compostos aromático 3. Biologia molecular 4. Biotecnologia I. Schneider, René Peter II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB044/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): André Andrade Baceti.

Título da Dissertação: Construção de biossensor para detecção de compostos BTEX baseado em fosfatase alcalina sob regulação xyLR/Pu e avaliação de sua regulação metabólica.

Orientador(a): René Peter Schneider.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Agradecimentos

Aos meus pais e irmão pelo apoio dado durante toda minha vida.

Ao meu orientador Dr. René Schneider pelo projeto e por me encorajar muitas vezes quando intimamente pensava em desistir.

Ao Dr. Beny Spira por ter me orientado em muitos momentos durante a execução do projeto e por ter aberto seu laboratório, sem o qual dados que foram gerados não seriam possíveis.

Aos ex-orientadores que de certa forma fazem parte dessa dissertação mesmo que não tenham participado de forma direta: Dra. Nanci do Nascimento, Dr. Patrick Jack Spencer, Dr. Murilo Casare da Silva e Dr. Bronislaw Polakiewicz.

Às professoras Dr. Maria Cristina Arias, Dr. Cristina Yumi Miyaki e à técnica Susy Coelho Oliveira pela oportunidade de ser monitor da disciplina de biologia molecular e por todo o aprendizado decorrente dessa oportunidade.

Aos alunos do Dr. Beny Spira pela paciência e conselhos sobre metodologia e biologia molecular: Heloiza Filus Galbiati, Luiz Gustavo de Almeida e Fernanda Nogales.

A todos os amigos de laboratório que me ajudaram com conselhos, reagentes, conselhos, cafés, bolachas quando já tinha perdido o horário do bandeirão. Fernando Freitas de Oliveira, Mestre Leandro Jorge da Silva, Júlia Helena Ortiz, Luciana de Oliveira, Bianca de Miranda Peres, Diana Maria Chica Cardona, Georges Mikhael Nammoura Neto, Mestra Roberta Novaes e Mestra Maria do Carmo Zaza Daulisio.

Aos amigos que não pertencem ao departamento por me ajudarem a esquecer um pouco de bactérias, operons e clonagens. Marina Rodrigues, Eliane Bacchi Machado, Carla Furlan de Andrade, Paulo Rodrigo Unzer Falcade, Rodrigo da Silva Melo, Gustavo Fogolin, Flavia Svissero Tenan, Pedro Henrique Imenez Silva, Marie-Claire Monier Chelini, apenas alguns dentre muitos.

Aos que moraram comigo na famosa república Belugas que no final do mestrado puderam vislumbrar minha calma de espírito e paciência e aos quais agradeço pelos sambas, choros e conversas. Débora Gutierrez, Tiago Ucella, Fabricio Santos, Talhi Cesar Zuppardo e Kailash

Bernucci.

”Não há maior sinal de loucura do que fazer uma coisa repetidamente e esperar a cada vez um resultado diferente.”

Albert Einstein

“O trabalho, o amor e o conhecimento são a fonte da vida, deveriam também governá-la”

Wilhem Reich

Resumo

BACETI, A. B. **Construção de biossensor para detecção de compostos BTEX baseado em fosfatase alcalina sob regulação *xylR*/Pu e avaliação de sua regulação metabólica.** 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Este projeto teve como objetivo a construção de biossensores para a detecção de compostos monoaromáticos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) a partir dos componentes da via de degradação de compostos monoaromáticos codificada no plasmídeo TOL de *Pseudomonas putida*, mais precisamente: o promotor Pu, que regula a expressão dos genes da via superior de degradação, e o gene *xylR*, que ativa o promotor Pu após a ligação da proteína associada a este gene ao efetor monoaromático, junto com o seu promotor nativo Pr. Um objetivo secundário foi a verificação da existência de sequências reguladoras desconhecidas a montante do promotor Pu, construindo três variantes com fragmentos de Pu que se estendem por diferentes comprimentos a montante do promotor (Pu202 pb, Pu396 pb e Pu802 pb), cuja existência foi sugerida em trabalho anterior do laboratório sobre o assunto. O promotor Pu foi ligado ao gene indicador para fosfatase alcalina isolado de *E. coli*. Os compostos monoaromáticos do grupo do BTEX são os principais contaminantes detectados em aquíferos e solos contaminados, devido à sua presença na gasolina e outros combustíveis líquidos derivados do petróleo. Todos os componentes das três variantes de biossensores foram clonados com sucesso. A construção de um dos plasmídeos de biossensoramento com a variante mais curta de Pu (Pu202) foi concluída.

Palavras-chave: Biossensor. Monoaromáticos. Regulação gênica. Biologia molecular

Abstract

BACETI, A. B. **Construction of a biosensor for BTEX compounds detection based on alkaline phosphatase in regulation *xylR*/Pu and evaluation of its metabolic regulation.** 2011. 92 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Monoaromatic compounds are mainly responsible for the contamination of areas, this is because they are components of gas and the fuel stations most of accidents sites. Such compounds are highly toxic and, in between non-polar compounds, present high solubility and vapor pressure which assists them in dispersion at groundwaters and soil. This work aim to develop a biosensor based on alkaline phosphatase indicator gene under the regulation of the Pu promoter and its regulatory protein, XylR, that is activated by monoaromatic. Moreover, this work will continue a previous project of the research group that indicated a possible regulatory region not described for Pu, that hypothesis will be tested by producing different plasmids biosensors with varying sizes of Pu (202 bp, 396 bp and 802 bp). All biosensor fragments were purified and cloned on pGem T Easy and biosensor with Pu 202 pb was produced. Next goals are finishing others biosensors assemble and perform induction tests.

Keywords: Biosensor. Monoaromatics compounds. Genetic regulation. Molecular biology

Lista de Tabelas

Tabela 1 –	Compostos metabolizáveis por diferentes espécies e cepas de <i>Pseudomonas</i>	21
Tabela 2 –	Características dos principais compostos BTEX ¹	22
Tabela 3 –	Genes e enzimas da via de catabolismo de compostos BTEX ²	27
Tabela 4 –	Diferentes fatores σ de <i>E. coli</i> e sua função ³	29
Tabela 5 –	Indução dos biossensores produzidos por Kim et al. ⁴	42
Tabela 6 –	Diferentes iniciadores utilizados nos ensaios	50
Tabela 7 –	Ciclos utilizados para a amplificação dos fragmentos de Pu	51
Tabela 8 –	Iniciadores utilizados exclusivamente para o sequenciamento	53

Lista de Figuras

Figura 1:	Dados retirados do relatório da CETESB, 2009 ⁵	23
Figura 2:	Vias de catabolismo de compostos BTEX ²	24
Figura 3:	Via de metaclivagem catabolismo de compostos BTEX ²	27
Figura 4:	Diversas etapas da transcrição	28
Figura 5:	Disposição da bEBP em relação à RNA polimerase	32
Figura 6:	Ativação de <i>xylR</i> na presença do efetor	33
Figura 7:	Organização dos genes <i>xylR</i> e <i>xylS</i> e seus promotores	34
Figura 8:	Expressão de <i>xylR</i> e <i>xylS</i> na presença de compostos BTEX	34
Figura 9:	Regulação gênica do catabolismo de compostos BTEX no plasmídeo TOL	35
Figura 10:	Diferentes construções de <i>XylS</i> feitas por Kaldalu et al. ⁶	37
Figura 11:	Ativação de <i>XylS</i> pela ligação do efetor	38
Figura 12:	Mapa do plasmídeo utilizado por Willardson et al. ⁷	40
Figura 13:	Diferentes plasmídeos construídos produzidos no trabalho de Kim et al. ⁴	41
Figura 14:	Plasmídeo que será usado para a montagem do biossensor	44
Figura 15:	Diagrama mostrando o método de cultura de <i>Pseudomonas putida</i> Mt-2	48
Figura 16:	Região do promotor Pu mostrando os iniciadores de PCR	55
Figura 17:	Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR de <i>phoA</i>	56
Figura 18:	Eletroforese em gel de agarose 1% da extração de do plasmídeo Tol .	57
Figura 19:	Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR de <i>xylR</i>	58
Figura 20:	Ancoragem dos iniciadores <i>nested</i>	58
Figura 21:	Eletroforese em gel de agarose 1% do PCR gradiente de Pu <i>nested</i> . .	59
Figura 22:	Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão de pGem T Easy(Pu <i>nested</i>)	60
Figura 23:	Eletroforese das reações de PCR usando diferentes iniciadores para a amplificação de Pu	60
Figura 24:	Curva de crescimento de diferentes cepas de <i>P. putida</i> Mt-2	71

Figura 25:	Estratégia de produção do biossensor por amplificação da ligação Pu- + <i>phoA</i>	72
Figura 26:	Digestão dos plasmídeos pGem T Easy contendo os fragmentos clonados	73
Figura 27:	Eletroforese dos fragmentos purificados	73
Figura 28:	PCR da ligação de Pu202 e <i>phoA</i>	74
Figura 29:	Digestão do plasmídeo pGem T Easy(Pu202+ <i>phoA</i>) oriundo de difer- entes colônias	74
Figura 30:	Purificação de Pu202+ <i>phoA</i> , obtido da digestão de pGem T Easy- (Pu202+ <i>phoA</i>)	75
Figura 31:	Eletroforese da digestão do plasmídeo pKK232-8(Pu202+ <i>phoA</i>) . . .	75
Figura 32:	Eletroforese da digestão do plasmídeo pKK232-8(Pu202+ <i>phoA</i> + <i>xylR</i>)	76
Figura 33:	Estratégia por clonagem direta dos fragmentos Pu e <i>phoA</i> no vetor pKK232-8	77
Figura 34:	Eletroforese em agarose 0,7% da digestão por <i>Hind</i> III e <i>Bam</i> HI de diferentes clones possivelmente portando o plasmídeo pKK232-8(Pu396+- <i>phoA</i>)	78
Figura 35:	Eletroforese em gel 1% dos plasmídeos contendo Pu396 ou Pu802 e <i>phoA</i> oriundos da dupla ligação à pKK232-8	78
Figura 36:	Estratégia de troca do promotor Pu para obtenção do plasmídeo sensor pKK232-8(802+ <i>phoA</i>)	79
Figura 37:	Purificação do fragmento pKK232-8(<i>phoA</i>) da digestão do plasmídeo pKK232-8(Pu202+ <i>phoA</i>)	79
Figura 38:	Eletroforese dos plasmídeos resultantes da ligação pKK232-8(+ <i>phoA</i>) e Pu802	80

Sumário

1 Introdução	15
1.1 Técnicas tradicionais adaptadas para utilização <i>in situ</i>	16
1.2 Biossensores	18
1.3 Plasticidade metabólica em <i>Pseudomonas sp.</i>	20
1.4 Vias de <i>orto</i> e <i>meta</i> clivagem	21
1.5 Plasmídeo TOL	25
1.5.1 Fatores sigma	28
1.5.2 Via superior de catabolismo	31
1.5.3 Via inferior de catabolismo	36
1.5.4 Silenciamento da via de degradação de BTEX do plasmídeo TOL	38
1.6 Biossensores para compostos BTEX	39
1.6.1 Willardson et al., 1998	39
1.6.2 Kim et al., 2005	40
1.6.3 Paitan et al., 2004	42
1.7 Trabalhos prévios com biossensores no laboratório	42
2 Materiais e métodos	45
3.1 Cepas utilizadas no projeto	45
3.2 Meios de cultura utilizados	45
3.2.1 Luria Bertani (LB)	45
3.2.2 SOC	45
3.2.3 Meio Mineral Mínimo	46
3.3 Extração de DNA	46
3.3.1 Preparo de fenol tamponado pH 8	46
3.3.2 DNA genômico de <i>E. coli</i> MG1655	46
3.3.3 Plasmídeo Tol de <i>Pseudomonas putida</i> Mt-2	47
3.3.4 Extrações de vetores de clonagem e expressão	48
3.4 Curva de crescimento das diferentes cepas de <i>Pseudomonas putida</i> Mt-2	49
3.5 Precipitação de DNA	49

3.6	Reação em cadeia da polimerase - PCR	50
3.6.1	<i>Iniciadores utilizados nas reações</i>	50
3.6.2	<i>Amplificação dos fragmentos contendo Pu</i>	51
3.6.3	<i>Amplificação do fragmento contendo xylR</i>	51
3.6.4	<i>Amplificação do fragmento de fosfatase alcalina (phoA)</i>	51
3.6.5	<i>Amplificação da ligação Pu202+phoA</i>	52
3.7	Sequenciamento	52
3.8	Quantificação por espectrofotometria	52
3.9	Eletroforese em gel de agarose	53
3.10	Purificação a partir do gel de agarose	53
3.11	Clonagem	54
3.12	Digestão com enzimas de restrição	54
3	<i>Resultados e discussão</i>	55
4.1	Produção dos componentes do biossensor	55
4.1.1	<i>Produção de phoA</i>	56
4.1.2	<i>Produção de xylR e Pu</i>	57
4.2	Sequenciamento dos componentes	61
4.2.1	<i>Sequenciamento de Pu794</i>	61
4.2.2	<i>Sequenciamento de phoA</i>	62
4.2.3	<i>Sequenciamento de xylR</i>	66
4.3	Montagem do biossensor	71
4.3.1	<i>Digestão fragmentos e purificação a partir do gel de agarose</i>	72
4.3.2	<i>Montagem do plasmídeo pKK232-8(Pu202+phoA+xylR)</i>	72
4.3.3	<i>Montagem do plasmídeo pKK232-8(Pu396+phoA+xylR)</i>	76
4.3.4	<i>Montagem do plasmídeo pKK232-8(Pu802+phoA)</i>	77
4	<i>Conclusão</i>	81
5	<i>Referências</i>	95

1 Introdução

Nos últimos anos, diversas leis de regulamentação de disposição de resíduos foram criadas^{8, 9, 10, 11}, estabelecendo concentrações máximas de compostos nocivos no ar, água e solo, o que tornou necessário o desenvolvimento de técnicas de quantificação desses compostos.

As técnicas tradicionais de análise baseiam-se nas propriedades físico-químicas dos poluentes, como ponto de ebulição, polaridade, afinidade por determinadas resinas cromatográficas e peso molecular¹². Tais técnicas são suficientemente sensíveis para o monitoramento exigido pela legislação, porém demandam a aquisição de equipamentos caros que não podem ser facilmente transportados.

A complexidade dos equipamentos e protocolos de análise demandam pessoal altamente qualificado e infra-estrutura específica. Na prática, poucos laboratórios são credenciados pelos órgãos ambientais para efetuar estas análises e todos estes estão localizados em centros urbanos com boa infra-estrutura, enquanto que as áreas contaminadas se encontram distribuídas pelo país, com concentração maior nas áreas periféricas longe de grandes centros urbanos. Isto leva à necessidade do transporte das amostras que causa o encarecimento do processo e introduz erro na quantificação devido a perda de componentes voláteis ou degradação dos compostos.

A avaliação dos níveis de poluentes se mostra importante em todas as fases do processo de remediação. Inicialmente é necessária a verificação da extensão do dano causado à área, sendo coletadas inúmeras amostras de forma que se possa ter uma noção mais precisa da distribuição espacial do poluente; durante a remediação as análises ajudam na avaliação da eficácia dos métodos de descontaminação utilizados; por último a quantificação para assegurar que a área foi remediada de forma satisfatória.

Visto que a quantificação dos níveis de poluentes permeia todas as etapas do processo de remediação, a demanda pela redução do número de amostras¹³ e por métodos de fácil utilização no campo vem crescendo. Hoje é necessária a coleta e análise de diversas amostras como brancos de campo e viagem, além de diversas duplicatas. Cada lote de amostragem e análise para uma área com 20 poços tem custo estimado entre 5.000 e 10.000 dólares, além da demora

de cerca de 3 semanas para obtenção do resultado¹².

1.1 Técnicas tradicionais adaptadas para utilização *in situ*

Considerando as dificuldades encontradas na amostragem e análise, certas técnicas têm sido adaptadas para a utilização em campo¹⁴:

- Cromatógrafo a gás: Baseia-se no tempo de retenção de um gás à uma determinada fase estacionária. Hoje existem alguns modelos disponíveis para a utilização em campo:

Femtoscanner : Equipamento baseado em espectrometria de mobilidade de íons, no qual a detecção é próxima a tempo real. Possui vantagem de ser portátil, com reprodutibilidade, alta sensibilidade a vapores (ppb), porém não pode ser usado *in situ*.

HAPSITE : Equipamento baseado na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa sendo capaz de identificar compostos voláteis em minutos. Pesa cerca de 15 quilos e é acondicionado em mochila, facilitando o deslocamento, utiliza como fonte de energia baterias e é à prova de chuva. Entretanto trata-se de um equipamento caro (\$76.000), que não pode ser utilizado *in-situ*.

- Espectrometria de Mobilidade iônica (ICMS): Os compostos são ionizados por uma fonte radioativa e seus íons são acelerados em um campo eletromagnético e a detecção de dá em função do seu tempo de voo, comparado à padrões de identificação. Assemelha-se a espectrometria de massa, porém trabalha a condições atmosféricas não necessitando de bombas de vácuo o que torna o produto mais barato e miniaturizável.

Rapid Alarm and Identification Device É compacto (75 x 165 x 180mm), leve (2,6Kg) e pode detectar compostos na faixa de ppm. Além disso, opera em ampla faixa de temperaturas (-30 a 50°C), porém não pode ser utilizado *in-situ*.

- Sensores eletroquímicos: Tais sensores podem ser divididos em: potenciométricos (medem a diferença de potencial elétrico); amperométricos (medem a corrente produzida); e condutométricos (medem a condutância do sistema). Tais sistemas são compostos por polímeros que adsorvem substâncias químicas mudando a resistividade do sistema; em sensores catalíticos que se baseiam em reações dos compostos a serem analisados; óxidos-metálicos se baseiam na adsorção de oxigênio à periferia do metal que leva a geração de carga negativa fora e positiva dentro, sendo que na presença de compostos orgânicos

voláteis estes capturam oxigênio através da combustão e reduzem a diferença de potencial.

Adsistor Technology Baseia-se em fios de metal ligados por um polímero condutor sensível à vapores de compostos orgânicos, mudando a resistividade do sistema. Tal companhia não possui equipamentos prontos, apenas fornece os sensores e aparelhos de medição. Cada um custa cerca de \$50. Outras empresas o incorporaram como Veeder-root™ Vapor sensor (www.veeder.com). O principal problema dessa tecnologia é o fato do dispositivo não discriminar entre diferentes compostos e muitas vezes os polímeros reagem fortemente com vapores de água o que pode diminuir o tempo de vida do equipamento, além de sofrer histerese que pode mudar a linha base do equipamento.

- **Sensores de onda acústica de superfície (Surface Acoustic Wave Sensor, SAW):** Baseia-se na propagação de uma onda sonora produzida por um efector que passa por um substrato capaz de absorver o composto de interesse e um transdutor que capta a onda. A análise se baseia na mudança da propagação de ondas acústica no sensor devido à adsorção do composto a ser analisado. Essa tecnologia pode diferenciar organofosfatos, hidrocarbonetos clorados, acetonas, alcoóis, hidrocarbonetos aromáticos e saturados e água.

SAW Arrays Sandia National Laboratories desenvolveu um sistema de diversos SAWs que é capaz de detectar 14 diferentes compostos orgânicos com cerca de 92% de acurácia. Tais sensores são pequenos, precisam de pouca energia e conseguem detectar compostos a concentrações muito baixas (180 pg.cm^2), porém não discriminam uma mistura de compostos e muitos de seus polímeros reagem com vapor de água.

- **Ensaio colorimétricos:** Baseiam-se em reações químicas que produzem cromóforos ao reagir com os compostos a serem analisados. Diversos ensaios colorimétricos de bolso estão disponíveis, via de regra eles comparam a amostra com um branco no qual não há o composto.

No mercado há varias empresas que oferecem diversos kits colorimétricos baseados em ensaios imunoenzimáticos, dentre eles para a detecção de hidrocarbonetos totais de petróleo com sensibilidade que chega a 20 ppm para amostras de solo e 2 ppm para água. Possui a vantagem de ser portátil e mostrar visualmente a presença dos compostos.

- **Sensores de infravermelho:** Baseiam-se no padrão de absorção no infravermelho dos

diferentes compostos, podendo analisar tanto compostos voláteis quanto mostras de solo e água.

Íon Optics Utiliza um sensor de infravermelho que é baseado em uma montagem em silício que atua tanto como um emissor como um detector. Um pulso de radiação é emitido, reflete no fundo da câmera e retorna, na presença do gás a radiação é absorvida e essa diferença detectada. Pode detectar gases específicos e necessita de pouca calibração, porém só detecta gases com moléculas não lineares e a leitura pode sofrer interferências decorrentes da umidade, além da impregnação de sujeira no sensor afetando tanto a emissão quanto a detecção no caso de aplicações *in-situ*.

- Fotoionização, ionização por chama (PID/FID): FID se baseia no padrão de ionização de um determinado composto sob radiação UV. O composto é ionizado e interage com um detector produzindo corrente, cada composto é ionizado a um determinado comprimento de onda tornando possível a diferenciação dos compostos. PID se baseia no padrão de ionização por chama, o composto é queimado na presença de H₂ e os íons detectados no ânodo.

TVA 10000B, Thermo Electron Corporation Incorpora no mesmo aparelho sensores de PID e FID, permitindo um amplo espectro de detecção de compostos com sensibilidade de 100 ppb para benzeno e 300 ppb para hexano. Pesa cerca de 5,8 Kg com dimensões de 343 x 262 x 81 mm. Necessita de hidrogênio 99,995% para a utilização do PID.

1.2 Propostas alternativas para a detecção

Biossensores

Outras alternativas para a detecção de contaminantes ambientais têm sido propostas, dentre elas os biossensores. Biossensores são equipamentos onde a detecção do poluente ocorre por meio de reações biológicas, que produzem um sinal físico (luz) ou químico (produção de cromóforo) detectado através de instrumentação analítica simples. A diversidade de sistemas de detecção e amplificação de sinais biológicos para uso em biossensores é muito grande¹⁵. Dentre estes sistemas se destacam: detecção de poluentes através da imobilização de enzimas ou células contendo enzimas oxidativas acopladas a um ânodo^{16, 17}; expressão de enzimas ou proteínas indicadoras (fosfatase alcalina, luciferase, GFP, β -galactosidase) controladas por um promotor sensível ao poluente^{4, 18, 19, 20}; mudanças fisiológicas (taxa de disparo de potenciais de ação; polarização da membrana) em células sensíveis^{21, 22}.

Dentre estas alternativas, a utilização de genes indicadores sob a regulação de promotores sensíveis a poluentes possui a vantagem de apresentar grande versatilidade^{23, 24, 20, 25, 18, 17, 19}. Isto decorre do fato de serem construções gênicas relativamente simples, podendo uma construção ou modelo de construção ser aproveitado para a montagem de outro sensor através da troca do par promotor/proteína reguladora. Além disso, a criação de uma série de sensores para compostos diferentes com um mesmo gene repórter oferecem a vantagem de detecção com um único equipamento para a leitura do sinal.

A literatura descreve diversos biossensores que já foram construídos utilizando diferentes genes indicadores:

Proteína fluorescente verde (GFP) Proteína isolada da água-viva *Aequorea victoria*²⁶ que possui fluorescência verde quando irradiada com luz UV. O principal problema desse indicador é a necessidade de um fluorímetro (equipamento de alto custo) de campo para analisar as amostras.

Luciferase - Eucariótica Enzima isolada inicialmente do vaga-lume norte-americano *Photinus pyralis*, também presente em outras espécies de insetos com diferentes comprimentos de onda de emissão²⁷. Existem diversos plasmídeos comerciais que utilizam esta enzima como indicador da atividade de promotores, porém sua quantificação necessita da lise celular.

Luciferase - Procariótica²⁸ Esta enzima foi isolada de diferentes gêneros bacterianos (*Photobacterium*, *Vibrio*, *Xenorhabdus*) e é composta por duas subunidades com 30% de identidade. A Luciferase é responsável pela oxidação da flavina mononucleotídeo reduzida ($FMNH_2$) e de um aldeído graxo (RCO) resultando na emissão de luz no comprimento de 490 nm (Equação 1).

Em bactérias os genes codificadores da Luciferase (*luxAB*) são flanqueados pelos genes responsáveis pela biossíntese do aldeído de cadeia longa (*luxCDE*). Ensaio enzimático para quantificação de luciferase levam a curtos períodos de emissão devido à baixa estabilidade da flavina mononucleotídeo reduzida. Alternativamente, os genes responsáveis pela produção do aldeído de cadeia longa podem ser clonados juntamente aos da luciferase, esse tipo de montagem leva a produção de um sinal estável e longo.

β -galactosidase (*LacZ*) Enzima responsável pela hidrólise de ligações β -galactosídicas de substratos que contenham um anel D-piranosídico em uma ligação β -glicosídica, presente em um grande número de organismos²⁹. Substratos cromóforos, fluorescentes ou quimioluminescentes podem ser utilizados para medir sua atividade^{30, 31}, entretanto a enzima encontra-se no ambiente citoplasmático o que leva à necessidade de permeabilização da célula ou transporte do substrato para que a enzima possa ser quantificada.

Fosfatase alcalina proteína de localização periplasmática³², consequentemente mais acessível ao reagente colorimétrico não sendo necessária a lise celular. Além disso, não possui dependência de oxigênio e a produção do cromóforo se dá por apenas um passo enzimático não sendo necessários cofatores.

A fosfatase alcalina se destaca por suas diversas vantagens como gene indicador, que além das já citadas, ainda possibilita o monitoramento de sua atividade através de eletrodos¹⁷ tornando a aquisição de dados passível de ser executada em tempo real

1.3 *Pseudomonas sp.*

Fonte de promotores e proteínas reguladoras

Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* apresentam uma grande plasticidade metabólica³³ (Tabela 1), o que permite seu crescimento em diferentes fontes de carbono. Tal característica proporciona o arcabouço para a busca de diferentes promotores e proteínas reguladoras que podem ser usados junto a um gene indicador, proporcionando a montagem de um biossensor para o composto anteriormente utilizado como fonte de carbono.

O aumento da diversidade de xenobióticos metabolizáveis por uma comunidade microbiana pode ocorrer de duas formas diferentes:

Diversificação vertical Incorporação de enzimas que transformam novos compostos em outros já utilizados no metabolismo.

Diversificação horizontal Mutações pontuais nas enzimas que representam os gargalos metabólicos, aumentando a diversidade de substratos ou mudando a especificidade de substrato.

Dentre os compostos metabolizáveis por espécies e cepas do gênero *Pseudomonas*, os BTEX (benzenos, toluenos, xilenos e etil-benzenos) destacam-se por serem importantes contaminantes ambientais (Figura 1a). Tais compostos são abundantes na gasolina e a maior parte

Tabela 1 – Compostos metabolizáveis por diferentes espécies e cepas de *Pseudomonas*

Microrganismo	Fonte de Carbono	Referência
<i>Pseudomonas</i> sp.	o-xileno	34
<i>Pseudomonas</i> SA-3	Bifenil clorados	35
<i>Pseudomonas putida</i>	Metil-purinas	36
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pireno	37
<i>Pseudomonas</i> sp. Cepa B13	Cloro-catecol	38
<i>Pseudomonas putida</i> KF715	Difenil e salicilato	39
<i>Pseudomonas</i> sp.	Análogos não clorados de DDT	40
<i>Pseudomonas putida</i>	Naftaleno	41
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Octano	42
<i>Pseudomonas putida</i>	Cânfora	43
<i>Pseudomonas putida</i> Mt-2	Monoaromáticos ^a	44
<i>Pseudomonas putida</i>	Catecol	45
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	Fenois	46

^a Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno

das contaminações derivam justamente do vazamento de reservatórios de postos de combustível (Figura 1b). Os BTEX, quando comparados à outros hidrocarbonetos, apresentam alta volatilidade e solubilidade em água (Tabela 2), o que aumenta sua difusão em águas subterrâneas e no solo. Além da sua grande distribuição em áreas contaminadas e rápida dispersão devido à pressão de vapor e solubilidade, os compostos BTEX são nocivos à saúde humana sendo relacionados à carcinogênese, síndromes hematopoéticas e depressão do sistema nervoso central constituindo um importante problema de saúde pública⁴⁷.

Com base nessas características, o desenvolvimento de biossensores para compostos BTEX apresenta grande apelo tanto econômico como ambiental. Dentre as vias de catabolismo descritas, as melhor estudadas são as vias de *meta* e *orto* clivagem, codificadas pelo plasmídeo TOL e pelo cromossomo de *Pseudomonas putida*-Mt2 respectivamente.

1.4 Vias de *orto* e *meta* clivagem

Catabolismo de toluenos e xilenos em *Pseudomonas putida* e sua relação com outras vias de degradação

No catabolismo aeróbico de compostos aromáticos, a maioria das vias descritas apresentam como enzima chave uma dioxigenase que é responsável pela quebra do anel para a posterior

Tabela 2 – Características dos principais compostos BTEX¹

Composto	% em gasolina	Solubilidade	BCF ^a	Dose Ar ^b	Dose Oral ^c	Câncer ^d	Câncer Ar ^e	Câncer Oral ^f
Benzeno	0,12-3,5%	1780 mg/L	5,2	N.A. ^g	N.A.	A	$2,9 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-2}$
Etilbenzeno	0,36-2,86%	152-208	37,5	$2,9 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-1}$	D	N.A.	N.A.
Tolueno	2,73-21,8%	490-627	10,7	$1,1 \times 10^{-1}$	2×10^{-1}	D	N.A.	N.A.
Xileno	0,77-1,58%	162-200	132	N.A.	2.0	D	N.A.	N.A.

^a Índice de bioacumulação em peixes

^b Dose de exposição crônica por inalação

^c Dose de exposição crônica por ingestão

^d Classificação do potencial de carcinogenicidade⁴⁸: A: Carcinogênico para humanos; D: Evidências inadequadas para classificação

^e Índice de tendência à câncer por inalação

^f Índice de tendência à câncer por ingestão

^g Não analisado, no caso de compostos carcinogênicos para humanos não existem níveis tolerados

(a) Número de áreas contaminadas divididas pelo tipo de contaminação. *São as principais fontes de contaminação por compostos BTEX

(b) Número de acidentes registrados pela divididos por atividade

Figura 1: Dados retirados do relatório da CETESB, 2009⁵

conversão em intermediários do ciclo de Krebs^{49, 2, 50}. Tais dioxigenases podem ser divididas em dois grupos de acordo com a posição de quebra do anel: dioxigenases de meta e orto clivagem (Figura 2.

cies bacterianas^{54, 55, 56}, e estes genes responsáveis pelo metabolismo de catecóis e ácido 3,4-dihidroxibensóico. Existem também as vias modificadas de orto clivagem, cujo genes encontram-se em sua maioria em plasmídeos (muitas vezes conjugativos), estas vias diferem das originais por possuírem maior amplitude de substratos, metabolizando também compostos BTEX clorados^{57, 58, 59}.

A via de *meta* clivagem foi descrita para *Pseudomonas putida* Mt-2⁴⁴, entretanto dois experimentos demonstraram que a cepa também era capaz de expressar enzimas da via de *orto* clivagem: A incubação de Mt-2 em meio rico suplementado com catecol levava à expressão de catecol 1,2-oxigenase, enzima característica da via *orto*; e mutantes da via *meta* que deixavam de expressar catecol 2,3-oxidase, enzima característica desta via, cresciam mais rapidamente em placas suplementadas com benzoato e expressavam catecol 1,2-oxidase⁴⁴.

A frequente ocorrência de mutantes Mt-2 *meta*⁻, quando cultivados em benzoato, e a descoberta do plasmídeo responsável pelo metabolismo de salicilato levaram a dedução de que os genes da via *meta* presentes na cepa Mt-2 encontravam-se em um plasmídeo (TOL)⁴⁴.

1.5 Plasmídeo TOL

Vias metabólicas e regulação

O plasmídeo TOL (pWW0) possui 117 kb, pertence a classe de incompatibilidade IncP-9⁵¹ e é estável em diversos hospedeiros (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas corrugata*, *Escherichia Coli*, *Burkholderia cepacia*)^{60, 61}. Os genes responsáveis pelo metabolismo de compostos BTEX encontram-se flanqueados por sequencias de inserção, no interior em um transposon de 56 kb (Tn4651) que por sua vez encontra-se no interior de um outro transposon de 70 kb (Tn4652)⁶², sendo ambos classificados como pertencentes à classe II⁶².

Além dos transposons catabólicos, o plasmídeo também possui genes que codificam para a formação do par conjugativo e replicação⁵¹. A conjugação e o fato dos genes catabólicos pertencerem a sequencias transponíveis faz com que o fenótipo TOL⁺ se dissemine pela comunidade microbiana em ambientes onde traga vantagens adaptativas⁶¹. O fenótipo TOL⁻ comum no crescimento com benzoato como fonte de carbono ocorre tanto devido a perda do plasmídeo, como dos transposons catabólicos⁶³.

Existem diversos outros plasmídeos que portam a via *meta* de catabolismo de compostos BTEX⁶⁴. Estes plasmídeos podem ter sido originados pela inserção dos transposons catabólicos em outros plasmídeos ou através da duplicação de genes, gerando genótipos diploides. Um

exemplo disso é a cepa 345 de *Alcaligenes eutropus* que apresenta um plasmídeo cujo padrão de restrição é idêntico ao de TOL, entretanto só é capaz de utilizar m- e p-tolatos e não precursores derivados de xileno⁶⁵. Além de plasmídeos, algumas cepas ainda podem apresentar tais genes de catabolismo em seus cromossomos, provavelmente adquiridos por transferência horizontal e posterior transposição em seu genoma⁶⁶

No plasmídeo TOL, os genes responsáveis pelo metabolismo de compostos BTEX podem ser divididos em três grupos⁵⁰:

Via superior Sob regulação do promotor Pu (dependente de σ^{54}), é responsável pela oxidação dos compostos BTEX ao seus respectivos ácidos (ânions em solução) (Figura 3) (ex. Tolueno $\Rightarrow$ toluato).

Via inferior Sob regulação do promotor Pm (dependente de σ^{70}), é responsável pela quebra do anel aromático e produção de intermediários do ciclo de Krebs (Figura 3).

Proteínas reguladoras Proteínas XylR e XylS, são responsáveis pela ativação dos promotores das vias superior e inferior respectivamente quando na presença de seus efetores (BTEX e derivados da via superior).

Figura 3: Via de metabolização catabolismo de compostos BTEX²

Tabela 3 – Genes e enzimas da via de catabolismo de compostos BTEX²

Gene	Função	Gene	Função
xy/A	Xileno oxidase	xy/F	2-hidroxiacetilacetato semialdeído desidrogenase
xy/B	Álcool benzílico desidrogenase	xy/G	2-hidroxiacetilacetato semialdeído desidrogenase
xy/C	Bezaldeído desidrogenase	xy/H	4-Oxalacetato isomerase
xy/D	Toluato oxigenase	xy/I	4-Oxalacetato descarboxilase
xy/X	Oxidase terminal?	xy/J	2-Oxopenta-4-enolato hidratase
xy/Y	Oxidase terminal?	xy/K	2-Oxopenta-4-enolato aldolase
xy/Z	?	xy/L	Dihidroxiciclohexadieno carboxilato desidrogenase
xy/E	Catecol 2,3-oxigenase		

Diferentes fatores σ são importantes na regulação da transcrição dos operons existentes no plasmídeo TOL. Dessa forma, mostra-se importante um aprofundamento no papel dos principais fatores σ utilizados pela via *meta* antes de ser iniciada uma discussão mais aprofundada sobre a regulação gênica do plasmídeo.

1.5.1 Fatores σ

Seu papel na regulação do plasmídeo TOL

Um dos principais passos regulatórios em eubactéria é o controle da transcrição³, sendo a enzima chave a RNA polimerase DNA dependente (RNAP). A RNAP não é capaz de iniciar a transcrição sozinha⁶⁷, necessariamente ela deve se ligar a um polipeptídio, o fator σ . Tal fator interage de forma reversível com RNAP⁶⁸ formando a chamada RNAP holoenzima. A RNAP ligada ao fator σ é capaz de reconhecer a sequência promotora levando a formação do complexo fechado, posteriormente ocorre a abertura da fita de DNA formando o complexo aberto. A RNAP holoenzima então sintetiza diversos fragmentos de 2 a 12 pb até que o fator σ seja liberado, permitindo o alongamento da cadeia até que a RNAP encontre uma região terminadora (Figura: 4)⁶⁹.

Figura 4: Diversas etapas da transcrição

A frequência com que a RNAP inicia a transcrição caracteriza a força do promotor e está diretamente relacionada à sequência da região promotora e conformação do DNA⁶⁹. Os fatores σ são os responsáveis pelo reconhecimento da região promotora, se ligando sempre a duas regiões chamadas de consenso que, salvo exceções, estão localizadas à -35 e -10 pares de base do início de transcrição⁷⁰.

O número de fatores σ sintetizados por uma determinada bactéria parece estar relacionado a estabilidade de seu habitat⁷¹. Bactérias simbiotes ou mesmo extremófilas tendem a possuir menor número de fatores σ e outros reguladores, já bactérias que estão sujeitas a diversas

mudanças ambientais, como patogênicas ou que vivem no solo e água, tendem a possuir um maior número de fatores σ e proteínas reguladoras⁷¹. Diversos fatores σ já foram isolados, caracterizados e associados com diferentes atividades celulares (Tabela 4).

Tabela 4 – Diferentes fatores σ de *E. coli* e sua função³

Fator σ	Função	Sequências consenso ^a			Referências
		-35	Espaçador	-10	
σ^{70}	Crescimento Exponencial e genes <i>house keeping</i>	TTGACA	16-18	TATAAT	70
σ^S	Entrada e manutenção em fase estacionária			CTATACT	72
σ^{28}	Expressão de quimiotaxia e genes tardios do flagelo	TAAA	15	GCCGATAA	73
σ^{32}	Expressão de genes de resistência a calor	CTTGAAA -24 ^b	11-16	CCCATnT -12 ^b	74
σ^{54}	Resposta a falta de nitrogênio, catabolismo de compostos BTEX	TGGCAC	5	TTGCW	75

^a Bases ambíguas: N, qualquer base; R, A ou G; W, A ou T; Y, C ou T; M, A ou C; K, G ou T

^b Os fatores σ da família 54 possuem sequências consenso que apresentam diferente espaçamento

De acordo com a homologia de sua sequência, os fatores σ podem ser divididos em duas famílias^{76, 77}: fatores σ^{70} e fatores σ^{54} .

Fatores da família σ^{70}

Os fatores similares a σ^{70} apresentam 4 regiões conservadas em sua estrutura. Além disso, podem ser divididos em 3 grandes grupos:

Fatores σ primários São os fatores que regulam a transcrição de genes básicos de sobrevivência do organismo, sendo responsáveis pela expressão dos genes de crescimento exponencial. À essa classe pertence o σ^{70} de *E. Coli*

Fatores σ semelhantes aos primários São semelhantes em sequência aos primários, mas não são essenciais ao crescimento microbiano. A esse grupo pertence o σ^S (entrada em fase estacionária).

Fatores σ alternativos Tais fatores diferem significativamente dos primários em sequência e são responsáveis pela transcrição de regulons específicos. A esse grupo pertencem os fatores σ^{28} , responsável pela expressão das proteínas do flagelo e σ^{32} , responsável pela resposta a agentes desnaturantes (etanol, aumento de temperatura, peróxido de hidrogênio), além de diversos outros fatores sigma que regulam desde resposta a carência de ferro, até produção de pigmentos para proteção contra luz.

Fatores da família σ^{54}

A família σ^{54} é diferente estruturalmente e funcionalmente das proteínas pertencentes à σ^{70} , não sendo possível reconhecer nenhuma estrutura homóloga entre essas duas famílias^{76, 77}.

Os fatores da família σ^{54} apresentam muitas similaridades com fatores de transcrição eucarióticos^{78, 77} como zíper de leucina, região ácida e a capacidade de interagir com a fita de DNA na ausência da RNA polimerase. O fator σ^{54} apresenta transcrição constitutiva⁷⁹, sendo que sua concentração celular correspondente a 15-20% do σ^{70} , permanecendo constante nas diferentes fases de crescimento de *E. coli* e *P. putida*⁸⁰.

Apesar disto a expressão de seus promotores dependentes permanece muito baixa devido a sua baixa afinidade pela RNA polimerase, situação modificada na presença de (p)ppGpp que atua mudando a dinâmica de competição com o σ^{70} ⁸¹. O (p)ppGpp também facilita a competição de outros fatores como σ^{32} (choque térmico, heat shock) e σ^S pela RNA polimerase. A atuação de (p)ppGpp sobre a transcrição de genes é variável podendo possuir forte relevância como, por exemplo, o promotor Po (dependente de DmpR, pertencente a mesma família de proteínas de XylR) ou menor relevância no caso de Pu⁸².

Além disso, diferente dos fatores σ^{70} , os fatores σ^{54} não são capazes de proporcionar a abertura do complexo fechado e iniciar a transcrição³. Os fatores σ^{54} são auxiliados por proteínas chamadas de bEBPs (bacterial enhancer-binding proteins) que possibilitam a formação do complexo aberto e consequentemente a transcrição do gene.

Fatores σ dos genes de catabolismo do plasmídeo TOL

Os genes de catabolismo de compostos BTEX do plasmídeo TOL são regulados por dois fatores σ^{50} :

Promotores e genes regulados por σ^{70} Esse fator de transcrição é responsável pela regulação da transcrição dos promotores constitutivos Pr1 e Pr2, que propiciam a transcrição de *xylR*, e Ps1 que regula a transcrição de *xylS*. Além disso, o fator σ^{70} , em conjunto com *xylS* ativado, também regula a atividade do promotor Pm, conjunto que propicia a transcrição da via inferior de catabolismo.

Promotores e genes regulados por σ^{54} Esse fator é responsável pela regulação da expressão do promotor Pu, que propicia a transcrição dos genes da via superior de catabolismo, e Ps2, que é um promotor forte responsável pela regulação da transcrição de *xylS*. Os

promotores dependentes de σ^{54} da via de catabolismo do plasmídeo TOL são ativados por XylR na presença de compostos BTEX.

1.5.2 Via superior de catabolismo

Proteína reguladora XylR

bEBP - Bacterial Enhancer-Binding Protein

A proteína reguladora XylR pertence a família chamada de bEBPs (Bacterial enhancer-binding proteins) que atuam sobre promotores dependentes de σ^{54} promovendo a passagem do complexo fechado para o aberto⁸³. Proteínas pertencentes a essa família se ligam a regiões a montante do promotor (UAS, Upstream Activating Sequences), que normalmente distam entre 100-150 pb do início da transcrição⁸⁴.

A base da ativação das proteínas dessa família consiste na oligomerização de diversas unidades (6 ou mais)^{85, 84, 86, 87}, apesar de manterem-se na forma de dímeros inativos tanto em solução como ligados às UAS⁸⁷. A oligomerização cria o sítio de hidrólise de nucleotídeos, localizado na região de interação dos domínios centrais de diferentes sub-unidades. A hidrólise leva a movimentação de uma região do domínio central chamada de Walker B que por sua vez transmite o movimento para alças que interagem com a holoenzima contendo o fator σ^{54} propiciando a passagem do complexo fechado para o aberto⁸³.

Por se ligarem a regiões distantes do promotor é necessário que o DNA se curve para que a bEBP possa interagir com a RNA polimerase^{88, 78, 89}. Tal curvatura pode ser causada por propriedades inerentes à composição do DNA (ex. repetição de bases)⁸⁹, ou mesmo pela atuação de proteínas que curvam o DNA como HU e IHF (Integrating Host Fator)^{90, 89}, sendo que na ausência destas a transcrição pode ser seriamente comprometida^{50, 91}. Além disso, é necessária uma correta disposição dos fatores em relação a fita de DNA, a bEBP deve interagir com a RNAP a partir da fita complementar à sequência promotora para a correta ativação do promotor⁹².

Diversas proteínas da família bEBPs atuam como efetores de sistemas de dois componentes, existindo ainda algumas, como o caso de XylR, que são responsáveis tanto pela captação dos estímulos ambientais como pela atuação sobre holoenzima contendo o fator σ^{54} ⁹³. Proteínas bEBPs regulam genes que não são fundamentais para a célula, mas que podem conferir vantagens adaptativas dependendo das condições ambientais (ex.: metabolismo de diferentes fontes de carbono, virulência, fixação de nitrogênio)⁹³.

As proteínas da família bEBPs podem ser divididas em quatro domínios funcionais (Figura

Figura 5: Disposição da bEBP em relação à RNA polimerase, mostrando a necessidade da EBP interagir com a RNAP através da fita complementar à região promotora

6)^{94, 95}.

Amino-terminal (domínio A) Este é o domínio sensor, podendo ser classificado como repressor ou ativador da oligomerização e hidrólise de nucleotídeos (Figura 6)⁸⁷. A proteína XylR, quando truncada neste domínio (XylRΔA), apresenta um fenótipo de transcrição constitutiva mesmo na ausência do efetor^{84, 96, 97}. Além disso, quando o domínio A é fornecido separadamente como um polipeptídeo, este impede a transcrição mesmo na presença do efetor^{96, 97}. A repressão intramolecular é um evento específico que depende da correta interação do domínio A com o domínio C e não só de um impedimento estérico simples⁹⁷, porém proteínas correlatas como DmpR (via de degradação de fenóis do plasmídeo pVI150)⁴⁶ e XylR podem ter seus domínios A trocados permanecendo a regulação derivada do domínio A recebido⁹⁸.

Ligante Q (domínio B) É proposto que este domínio possua a função de ligação do domínio amino-terminal (domínio A) com o central, dessa forma ele funciona como uma dobradiça permitindo o deslocamento dos domínios. O nome ligante Q advém do grande número de glutaminas em sua sequência conservada, tal constituição daria origem a uma região flexível sem estrutura secundária determinada⁹⁹. Entretanto tal domínio possui um papel chave em XylR por restringir a gama de ativadores da proteína, regulando a especificidade da interação pela distância dos domínios A e C¹⁰⁰, além de ser fundamental para o correto deslocamento do domínio A e perda da repressão intramolecular (Figura 6)⁹⁶.

Central (domínio C) Este é o domínio efetor da proteína, sendo o mais conservado. Possui sequências com alta similaridade com domínios Walker A e Walker B responsáveis pela

ligação e hidrólise de nucleotídeos⁸⁶. Além disso, essa região ainda possui um motivo GAFTGA que interage com a RNAP- σ^{54} e dois loops externos ao resto da proteína que apresentam semelhanças com DNA helicases⁸⁶.

Carboxi terminal (domínio D) Responsável pelo reconhecimento da sequência de DNA, apresentando a conformação HTH (Helix-Turn-Helix) comum em domínios que interagem com o DNA.

Figura 6: Ativação de *xy/R* na presença do efetor com a perda da repressão do domínio A sobre o catalítico (Domínio C). a) *xy/R* selvagem b) *xy/RΔA* com produção do domínio A como outro polipeptídeo

Os promotores Pr1 e Pr2 são os responsáveis pela expressão de *xy/R*¹⁰¹, são dependentes de σ^{70} , fracos e constitutivos, com transcrição relativamente constante independente da disponibilidade energética e presença de compostos BTEX^{102, 101, 103} tanto em *P. putida* como em *E. coli*¹⁰¹. Encontram-se a montante dos promotores Ps1 e Ps2 de *xy/S* orientados em direção oposta (Figura: 7).

O domínio carboxila terminal (domínio D), responsável pela especificidade da ligação da proteína ao DNA, reconhece duas regiões a montante de promotores σ^{54} no plasmídeo TOL:

Próximo ao promotor Pu responsável pela transcrição das enzimas da via superior^{104, 105}

Próximo ao promotor Ps2 responsável pela transcrição de altos níveis de *xy/S*¹⁰⁶.

Figura 7: Organização dos genes *xyIR* e *xyIS* e seus promotores

Ao se ligar ao promotor Ps2 de *xyIS*, XylR inibe sua própria transcrição¹⁰⁶ por ocupar seu próprio promotor (Pr, Figura 8). Para que a inibição seja efetiva, é necessário que ocorra a ativação da proteína com consequente gasto de ATP e oligomerização fazendo com que o bloco se ligue a mais de uma UAS tornando o complexo mais estável¹⁰⁷.

Figura 8: Expressão de *xyIR* e *xyIS* na presença de compostos BTEX. XylR se liga à seu próprio promotor diminuindo sua expressão e aumentando a expressão de *xyIS* através do promotor Ps2

Expressão da via superior:

O promotor Pu

O promotor Pu é responsável pelo início da transcrição dos genes da via catabólica superior. Tal promotor é reconhecido pela holoenzima contendo o fator σ^{54} , estando sob a regulação da proteína XylR e do fator de integração do hospedeiro (IHF, Integrating Host Factor, Figura 9)^{84, 108}.

O promotor Pu apresenta duas regiões de ativação a montante (UAS, Upstream Activat-

Organização gênica do catabolismo de BTEX

Figura 9: Regulação gênica do catabolismo de compostos compostos BTEX no plasmídeo TOL. 1-IHF dobra a fita de DNA trazendo para perto do promotor as regiões de ligação de XylR; 2-Na presença de compostos BTEX, XylR sofre oligomerização e promove a transcrição através do promotor Pu; 3-No excesso de XylS, ou na presença dos dos ácidos derivados de BTEX (produtos da via superior) que ativam XylS, existe a transcrição através do promotor Pm; 4-Na presença de BTEX, XylR sofre oligomerização e promove a transcrição de *xylS* através do promotor Ps2, que por sua vez impede sua própria transcrição por ocupar o seu próprio promotor

ing Sequences) localizadas a -190pb e -120pb do início de transcrição que são responsáveis pelo ancoramento de XylR^{109, 110}. Ambas regiões encontram-se protegidas da metilação por dimetil sulfato na presença de XylR, mesmo quando este não se encontra ativado (ausência de BTEX)¹¹⁰. Isto indica que as regiões de ligação permanecem ocupadas por XylR na ausência de efetores, entretanto o padrão de proteção dessas regiões sofre alteração quando XylR encontra-se ativada, demonstrando uma mudança conformacional em decorrência da ativação¹¹⁰.

A proteína reguladora ancorada aos UAS é aproximada da região promotora através da curvatura da hélice de DNA estabilizada pelo IHF que se liga de -67 a -55 do início da transcrição^{90, 109}. Além de aproximar a proteína reguladora da RNA polimerase, o IHF também auxilia na ocupação do promotor pela polimerase, sendo este o passo limitante da transcrição de Pu⁹¹. Na ausência de IHF a transcrição do promotor é seriamente comprometida.^{110, 111} (Figura 9).

A transcrição basal de Pu é muito baixa, provavelmente devido as regiões de ligação de XylR (UAS) serem terminadoras fortes¹¹², impedindo que ocorra a transcrição dos genes reg-

ulados por Pu devido a atividades à montante do promotor. O motivo pelo qual as UAS atuam como terminadoras fortes ainda não foi elucidado. Segundo a literatura o término da transcrição ocorre somente *in-vivo*, não sendo dependente de terminadores intrínsecos (dobramento do RNA transcrito em estruturas secundárias estáveis que levam ao desligamento da holoenzima da fita de DNA) ou de terminadores dependentes do fator Rho, o que sugere uma nova classe de terminadores de transcrição¹¹².

1.5.3 *Via inferior de catabolismo*

Proteína reguladora XylS

A proteína XylS é ativada pelos produtos derivados da via superior de catabolismo que consistem em benzoatos e benzoatos substituídos¹¹³. XylS mostra-se mais tolerante a substituições que ocorrem no carbono 3 (metilação, halogenação por cloro e bromo), sendo também toleradas algumas substituições simultâneas nos pares 2,3 e 3,4 (2,3-dimetilbenzoato, 3,4-dimetilbenzoato), porém outras substituições como hidroxilações, halogenações por iodo e alquilações por grupamentos maiores (etil, butil) não conseguem ativar a proteína¹¹³. No plasmídeo TOL, o gene que codifica para esta proteína encontra-se a montante do gene de *xylR* (Figura 7) e apresenta dois promotores:

Ps1 Responsável pela transcrição constitutiva de XylS sendo dependente de σ^{70} .

Ps2 Responsável pela transcrição na presença de compostos BTEX. Este promotor transcreve na presença de XylR ativado em conjunto com HU (Proteína semelhante a histona) e σ^{5489} .

XylS pertence a família AraC sendo por muito tempo uma das únicas proteínas dessa família a regular uma via de catabolismo, entretanto, com a utilização de técnicas computacionais, mais de 300 proteínas foram identificadas por apresentarem a cauda C-terminal característica dessa família^{114, 45}. Em geral seus genes encontram-se no mesmo sentido e a jusante dos quais regulam, mas *xylS* encontra-se a montante da via inferior de catabolismo e na direção oposta.

Proteínas da família AraC-XylS tendem a possuir de 293 a 322 aminoácidos¹¹⁴ e se associam em dímeros em solução. No caso de XylS, não é possível verificar diretamente a formação de dímeros, entretanto o peptídeo composto pela região N terminal de XylS fusionado a outras proteínas sofre dimerização independente da presença de efetores (produtos da via superior de catabolismo)¹¹⁵. A cauda C terminal conservada na família é a estrutura responsável pela

ligação ao DNA apresentando dois motivos HTH (Helix-turn-helix, domínio conservado para proteínas que interagem com o DNA) que se encontram entre os aminoácidos 231 a 252 e 282 a 305.

Kaldalu et al.⁶ construíram diversas fusões e deleções de XylS (Figura 10). Em seus experimentos foi verificado que a expressão excessiva de XylS leva a transcrição constitutiva do promotor Pm e além disso, o peptídeo composto apenas pela porção C terminal (112 aminoácidos), quando em excesso, é capaz de levar a transcrição e não se encontrava sob a regulação dos efetores. Tais experimentos aliados a *footprints* de DNA levaram a conclusão que o peptídeo C terminal é capaz de ocupar as regiões de ligação não necessitando estar multimerizado para que isso ocorra, visto que a interação XylS-XylS é proporcionada pelo domínio N terminal, também responsável pela percepção do efetor (Figura 11).

Figura 10: Diferentes construções de XylS feitas por Kaldalu et al.⁶. Em todas essas construções as proteínas foram expressas em excesso por um promotor forte. Em excesso XylS leva a transcrição constitutiva de Pm, assim como apenas a porção C terminal; Quando inserida uma sequência sintética rica em glicina e alanina, XylS torna-se regulável novamente; O domínio N terminal não é capaz de levar a transcrição mesmo em excesso e na presença de efetor

Figura 11: Ativação de XylS pela ligação do efetor. O domínio N terminal é responsável multimerização e pela ligação do efetor; O domínio C terminal característico da família AraC que interage com o DNA através de dois motivos HTH

1.5.4 Silenciamento da via de degradação de BTEX do plasmídeo TOL

Silenciamento por excesso energético

Os promotores da via catabólica do plasmídeo TOL são silenciados em crescimento exponencial em meio rico^{79, 116, 117, 102, 118, 103}. Inicialmente foi dado o nome de silenciamento exponencial⁷⁹, entretanto foi demonstrado que culturas que crescem exponencialmente em meio-mínimo não apresentavam tal fenômeno, sendo então o silenciamento atribuído a algum composto presente no meio rico¹⁰³. Além disso, algumas fontes de carbono (glicose, gluconato, α -cetoglutarato, lactato, acetato) e não outras (succinato, citrato, piruvato, glicerol, frutose, arabinose) inibem a ativação de Pu em culturas contínuas^{79, 118, 119}, porém quando culturas são cultivadas a taxas máximas com succinato como fonte de carbono ocorre o silenciamento¹⁰². Em culturas que tem sua taxa de crescimento limitada por nutrientes (fósforo, enxofre ou nitrogênio, células com grande disponibilidade energética) a via presente no plasmídeo TOL apresenta-se reprimida, enquanto culturas limitadas pelo substrato catabólico (fonte de carbono ouceptor de elétrons (O_2 , células com baixa disponibilidade energética) a via encontra-se funcional¹²⁰. Isto indica que na verdade a repressão metabólica é mediada pelo excesso de carbono ou energia, ao invés da taxa de crescimento.

O mecanismo molecular pelo qual ocorre o silenciamento não foi ainda esclarecido, Hugouvieux-Cotte-Pattat et al.¹¹⁶ em seus experimentos verificou que mutantes nas vias de

produção de AMP cíclico e ppGpp não apresentaram mudanças no padrão de expressão das proteínas da via superior e inferior. Cases, Lorenzo e Perez-Martín⁷⁹ verificaram que tão pouco a produção e ativação de XylR ou curvatura do DNA pelo IHF são responsáveis pelo silenciamento, entretanto em seus experimentos a super produção de σ^{54} levou à transcrição de *lacZ* quando este encontrava-se fusionado à Pu mesmo na fase exponencial. Cases, Lorenzo e Perez-Martín⁷⁹ sugerem a existência de um elemento regulatório ainda não descrito que interagiria com o fator σ de forma reversível sinalizando a limitação de fonte de carbono sendo eliminado no processo de purificação do fator sigma.

Diversas proteínas podem estar envolvidas no silenciamento como IIA^{ntr} e $\text{Crc}^{121, 122}$. Além disso, contradições existem, como a necessidade de concentrações maiores de fonte de carbono para gerar a mesma repressão em culturas constantes que em culturas de batelada¹²³

Silenciamento por temperatura sub-ótima de crescimento

Rescalli et al.¹²⁴ identificaram uma proteína que se ligava a região promotora de Pu através do fracionamento por afinidade em coluna de heparina e posterior eluição com gradiente de sal. As frações foram então testadas com a região promotora de Pu, sendo uma proteína identificada como ligante da região.

Posteriormente tal proteína foi sequenciada, sendo sua sequência N terminal correspondente à uma presente no cromossomo de *Pseudomonas putida* KT2440. Através de sua mutação, puderam concluir que era responsável pela inibição da expressão da via de degradação quando a célula encontrava-se em temperatura de crescimento sub-ótima, sendo a proteína nomeada TurA (Repressor do operon superior A, TurA).

1.6 Biossensores para compostos BTEX

1.6.1 Willardson et al., 1998

Neste trabalho⁷, os autores utilizaram o gene indicador luciferase sob a regulação do promotor Pu e da proteína XylR para a montagem do biossensor para compostos BTEX. A figura abaixo mostra o mapa do plasmídeo construído (Figura 12).

Os fragmentos foram amplificados a partir do plasmídeo TOL e de um plasmídeo para a detecção de benzoatos¹²⁵, sendo o plasmídeo sensor clonado em *E. coli* DH5 α . O promotor Pu possuía 325 pb, contendo as sequências promotoras σ^{54} , as regiões de ligação de XylR e IHF e mais 90 pb do gene *xylA*.

Figura 12: Mapa do plasmídeo utilizado por Willardson et al.⁷, mostrando a orientação do promotor Pu, a sequência terminadora de *E. coli rrnB*, o gene *luc* da luciferase, o promotor Pr e o gene *xylR*.

A montagem levou a produção de um biossensor capaz de testar amostras laboratoriais em 30 minutos com grande reprodutibilidade e limite de detecção entre 0,92 e 1,84 ppm dependendo do composto monoaromático. Além disso, quando desafiado com misturas de dois compostos dentre benzeno, tolueno e m-xileno, este apresentava resposta aditiva para a concentração dos compostos usados.

Quando desafiado com amostras ambientais, o biossensor gerou resultados de equivalentes de tolueno (soma dos compostos BTEX efetores de XylR) muito similares ao obtido por cromatografia gasosa (19,8 e 20,9 respectivamente).

1.6.2 Kim et al., 2005

Neste trabalho⁴, os autores utilizaram a luciferase eucariótica como gene indicador da atividade do promotor Pu, estando este sob a regulação de XylR e ambos inseridos em um plasmídeo que foi clonado em *E. Coli* DH5 α (Figura 13).

O promotor Pu utilizado possuía 252 pb e as construções, nas quais o gene *luc*⁺ era regulado por esse promotor, apresentaram atividade basal (sem adição de compostos BTEX) entre 6%-17% do máximo de indução. Suspeitando de uma possível mutação que levaria a transcrição constitutiva do promotor, os fragmentos Pu e XylR foram sequenciados e o resultado foi idêntico ao presente nos bancos de dados, o que seria não condizente, visto que tal atividade

Figura 13: Diferentes construções executadas no trabalho de Kim et al.⁴. UAS, Upstream activating sequences (loais de ligação de de XylR); A) O gene luc^+ está sob a regulação do promotor Pu; B) O gene luc^+ está sob a regulação do promotor Po, oriundo da via de catabolismo de fenóis, mas utilizando as UASs presentes no promotor Pr para sua ativação; C) O gene luc^+ está sob a regulação do promotor Ps que leva a transcrição de XylS na via de meta-clivagem de compostos BTEX.

basal do promotor Pu não é verificada na via de catabolismo em *P. putida*. Segundo o artigo de Kim et al.⁴, possivelmente essa alta atividade do promotor Pu na ausência de efetores pode ser explicada pela clonagem em direção oposta ao promotor Pr, levando à união de quatro sequências UAS (Figura: 13A) que causariam a transcrição inespecífica. Esta teoria é corroborada pelo experimento de *gel shift* descrito no mesmo artigo no qual a proteína XylR, na ausência de efetores e na presença do promotor Pu, teve seu padrão de bandas deslocado para maior peso molecular indicando ligação à sequência promotora.

Devido a redução da sensibilidade do sensor decorrente da alta atividade basal do promotor Pu, novas construções foram executadas utilizando o promotor Ps, que regula a transcrição de XylS, e Po, que regula a transcrição para o catabolismo de compostos fenólicos sendo ativado originalmente pela proteína reguladora CapR¹²⁶. O promotor Po foi clonado sem suas regiões de ligação para XylR, isto porque, foi clonado em direção oposta à Pr e dessa forma as próprias UAS desse promotor já bastariam para ativar a transcrição.

A indução das três montagens foram feitas para 15 diferentes compostos BTEX, os resultados mais significantes são mostrados na tabela 5.

O artigo chega a conclusão que são necessárias duas UASs para que os promotores testados tornem-se ativos e um número maior de regiões de ligação leva ao aumento da transcrição basal do gene indicador. Além disso, o promotor Po pode ser ativado por XylR, que se liga as UASs presentes em seu próprio promotor (Pr), isto apesar de Po ser originalmente regulado por outra proteína da mesma família, CapR.

Tabela 5 – Dados da indução dos biossensores utilizando diferentes promotores presentes no trabalho de Kim et al.⁴

Efetor	Amplitude de detecção mM			Concentração de indução máxima (50% da indução máxima) mM		
	Pu	Po	Ps	Pu	Po	Ps
Benzeno	0,5-10	1-10	1-10	5,5 ± 2,6(0,92)	681 ± 46(4,57)	14,5 ± 3,2(3,55)
Tolueno	0,1-5	0,5-10	0,5-7,5	6,5 ± 3,2(0,32)	754 ± 51(1,45)	42,8 ± 13,9(1,48)
Etil-benzeno	0,01-3	0,1-5	0,5-4	11,1 ± 0,0(0,07)	222 ± 26(0,72)	9,5 ± 1,2(0,79)
o-Xyleno	0,05-5	0,1-10	0,1-5	20,3 ± 1,6(0,19)	3151 ± 156(0,80)	32,5 ± 6,1(0,25)
m-Xyleno	0,05-5	0,1-7,5	0,05-5	31,5 ± 1,4(0,06)	2714 ± 225(0,36)	74,1 ± 3,5(0,40)
p-Xyleno	0,05-5	0,25-10	0,1-7,5	28,7 ± 0,2(0,10)	2217 ± 170(0,87)	33,8 ± 1,7(0,42)
o-Clorotolueno	0,01-2	0,01-4	nd ^a	9,1 ± 0,3(0,20)	1015 ± 10(0,05)	nd ^a
Álcool	0,25-10	nd ^a	0,1-4	12,6 ± 0,2(0,50)	nd ^a	14,5 ± 0,6(0,05)
m-Metilbenzílico						

^a Não detectado

1.6.3 Paitan et al., 2004

Neste trabalho, Paitan et al.¹⁷ utilizaram os genes indicadores fosfatase alcalina e β -galactosidase sob a regulação do promotor Ps1 de XylS que foram clonados em *E. coli* MC1061 para a montagem do biossensor. O ponto inovador desse trabalho foi o registro dos dados de indução do sensor em tempo real, através da leitura amperométrica da atividade das enzimas transcritas pelos genes indicadores.

Os biossensores produzidos permitiram a detecção de 0,05 mM de tolueno em um período inferior à 30 minutos para β -galactosidase e 45 minutos para fosfatase alcalina. Além disso, a construção com β -galactosidase permitiu a detecção de vapores de tolueno e benzeno em 35 e 25 minutos respectivamente.

1.7 Trabalhos prévios com biossensores no laboratório

Nesse trabalho busca-se continuar os experimentos iniciados no projeto de doutorado de Adelaide Muraro Anjo Janizelli¹²⁷ que teve o objetivo de produzir um biossensor para detecção de compostos BTEX, onde são utilizados o promotor Pu e o gene de indicador fosfatase alcalina. No trabalho executado por Janizelli foram construídas quatro versões distintas de sensor, mas nenhuma delas resultou em um OGM (Organismo geneticamente modificado) apto a ser utilizado no biossensoramento de BTEX. Todas as construções foram realizadas com dois plasmídeos: um contendo Pu ligado a *phoA* e outro contendo *xylR* sob controle de seu promotor Pr.

Biossensor 1 Foi utilizado o plasmídeo pBSK como vetor de Pu+*phoA* e pWSK para *xylR*.

O resultado dessa montagem foi a expressão constitutiva da fosfatase alcalina mesmo na ausência de compostos BTEX. Janizelli atribui esse fato a uma possível transcrição não esperada (*cross-reading*) causada pela forte transcrição do gene de seleção do plasmídeo (resistência à ampicilina).

Biossensor 2 Foi utilizado o vetor pKK232-8 para inserção de Pu+*phoA* flanqueados por dois terminadores fortes, o *xylR* foi inserido novamente no vetor pWSK. Essa montagem não apresentou atividade da fosfatase alcalina, mesmo a presença de compostos BTEX. Esse fato corroborou a hipótese de expressão não específica. Foi levantada a hipótese que haveria uma baixa concentração da proteína reguladora *xylR* o que impediria a expressão de *phoA* através do promotor Pu.

Biossensor 3 Foi utilizado o plasmídeo pEZ6 onde *xylR* foi clonado sob a regulação de um promotor forte pTAC aumentando assim sua expressão. Mesmo assim o biossensor ainda não apresentou produção de fosfatase alcalina. Foi levantada a hipótese que haveria mutações na proteína reguladora ou no próprio promotor Pu.

Sequenciamento de *xylR* e Pu O sequenciamento mostrou que existiam duas mutações no gene de *xylR* utilizado. Dessa forma foi construído um novo biossensor a partir de outra cepa de *Pseudomonas putida* que não apresentava mutações.

Biossensor 4 Foi utilizado o vetor TOPO XL PCR cloning para o gene *xylR* e pKK232-8 para Pu+*phoA*. Ainda assim não houve expressão de fosfatase alcalina. Acredita-se que o mau funcionamento do biossensor seria devido a pequena extensão do fragmento de Pu clonado (210 pb) em comparação com outros autores que teriam utilizado fragmentos que variavam de 250 pb a 350 pb.

2 *Objetivo*

Além da produção do biossensor, este projeto também buscará elucidar o motivo pelo qual não foi possível obter o biossensor no trabalho de Janizelli¹²⁷. A razão pela qual o Biossensor 4 do trabalho de Janizelli não foi funcional continua incerto. Neste trabalho, em paralelo, procurará verificar se após 200 pb ainda existem elementos importantes para o funcionamento do promotor Pu, visto que segundo a literatura todos os elementos de regulação encontram-se anteriores à esta posição.

Propõe-se a construção de um biossensor para compostos monoaromáticos através da clonagem do gene fosfatase alcalina oriunda da cepa MG1655 sobre a regulação de Pu, promotor oriundo do plasmídeo pWW0 (Tol) de *Pseudomonas putida* (Figura 14). Este promotor é ativado pela presença de monoaromáticos, que interagem com sua proteína reguladora *xylR* levando à transcrição do gene indicador.

Figura 14: Plasmídeo que será usado para a montagem do biossensor

3 *Materiais e métodos*

3.1 Cepas utilizadas no projeto

Durante a execução do projeto foram utilizadas diferentes cepas bacterianas: O DNA cromossômico de *Escherichia coli* MG1655 foi utilizado de molde para a reação de PCR usada para amplificar o gene *phoA*, a cepa *Pseudomonas putida* Mt-2 teve seu plasmídeo Tol extraído e utilizado para a amplificação do promotor Pu e do gene que codifica para a proteína reguladora XylR e a cepa *Escherichia coli* DH10B foi utilizada como hospedeira para o plasmídeo do kit comercial *pGem Easy* portando os diferentes fragmentos amplificados.

3.2 Meios de cultura utilizados

Todos os meios foram autoclavados antes de sua utilização.

3.2.1 *Luria Bertani (LB)*

Este meio¹²⁸ foi utilizado no crescimento, descongelamento e seleção de bactérias transformadas (quando adicionado antibiótico). Este meio é composto por 10g de triptona, 5g de extrato de levedura e 10g de cloreto de sódio para cada 1000ml de água destilada. Os componentes do meio foram dissolvidos e o pH corrigido para 7,5 através da adição de NaOH 10M. Para o preparo de meio na forma sólida são adicionados 17g de ágar à solução sendo esta posteriormente distribuída em placas de Petri descartáveis.

3.2.2 *SOC*

Este meio¹²⁹ foi utilizado após procedimento de eletroporação para a incorporação de plasmídeos em bactérias competentes. Este meio é composto por 20g de triptona, 5g de extrato de levedura, 0,58g de NaCl, 2,46g de $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ e 0,95g de $MgCl_2$ dissolvidos em 1000ml de

água destilada e pH ajustado para 7,5 através da adição de NaOH 10M.

3.2.3 Meio Mineral Mínimo

Este meio¹³⁰ foi utilizado no cultivo de *Pseudomonas putida* com suplemento de vapor de xileno¹³¹ como única fonte de carbono orgânico. Este meio contém: 1,5 g de $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 0,2 g de $CaCl_2 \bullet 2H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, 1 ml de solução de estoque de vitaminas (Ácido p-amino benzóico 0,05g/L; piridoxina 0,1g/L; tiamina 0,05 g/L; riboflavina 0,05 g/L; ácido nicotínico 0,05 g/L; pantotenato de cálcio 0,05 g/L; ácido fólico 0,02 g/L; ácido linólico 0,05 g/L; nicotinamida 0,05 g/L; vitamina B₁₂ 0,05 g/L; biotina 0,02 g/L) e 1 ml da solução de elementos traço ($FeCl_3 \bullet 6H_2O$ 8 g/L; $ZnCl_2$ 0,07 g/L; $MnCl_2 \bullet 4H_2O$; $CoCl_2 \bullet 6H_2O$ 0,12 g/L; $NiCl_2 \bullet 6H_2O$ 0,025 g/L; $CuCl_2 \bullet 2H_2O$ 0,015 g/L; $NaMoO_4 \bullet H_2O$ 0,025 g/L), EDTA 4 mM, dissolvidos em tampão fosfato de sódio 15mM e pH corrigido para 7.

3.3 Extração de DNA

3.3.1 Preparo de fenol tamponado pH 8

O fenol foi inicialmente derretido e foi adicionado hidroxiquinolona até a concentração final de 0.1%. Posteriormente foi adicionado igual volume de 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0) e a mistura agitada por 15 minutos. Esta foi decantada por cerca de 30 minutos até que as fases estivessem separadas, sendo então a fase aquosa removida e adicionado 1 volume de 0.1 M Tris-HCl. O mesmo procedimento de mistura e decantação das fases foi repetido sendo novamente retirada a fase aquosa.

Por último foi adicionado novamente 1 volume de 0.1 M Tris-HCl sendo este misturado e decantado. Entretanto na remoção da fase aquosa, foi deixada uma camada de tampão e a mistura estocada à 4 °C.

3.3.2 DNA genômico de *E. coli* MG1655

Uma pré-cultura de *E. Coli* MG1655 em 100 ml de meio LB foi incubada sob agitação à 37 °C *overnight*. No dia posterior, tal cultura foi centrifugada à 7000 rpm por 10 minutos sendo o precipitado ressuspensionado em 5 ml de solução A (50 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl pH 8) e incubado à -70 °C por 15 minutos. Em seguida, ao congelado, foi adicionado 0,5 ml da solução B (10 $mg.ml^{-1}$ lisozima em 0,25 TRIS ph 8), e o material descongelado sob suave

agitação a temperatura ambiente. A amostra foi transferida para um recipiente com gelo e, após 45 minutos, foi adicionado 1 ml da solução C (1 mg.ml^{-1} proteinase K, 0,5% SDS, 0,4 mM EDTA) e o conjunto agitado suavemente por 60 minutos à 50 °C e posteriormente *overnight* à 37 °C.

No próximo dia foram adicionados 6 ml de fenol tamponado (Tris-HCl pH 7,5-8), a mistura foi homogenizada por inversão e as fases foram separadas através da centrifugação à 7000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionada a mesma quantidade de fenol tamponado e as fases foram separadas sob as mesmas condições de centrifugação. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o procedimento de adição e separação de fenol tamponado foi executado novamente sob as mesmas condições, mas dessa vez, ao invés de fenol tamponado, 1 volume de clorofórmio foi adicionado à solução aquosa proveniente da separação das fases. Novamente a fase aquosa da mistura bifásica foi transferida para um novo tubo e a ela foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5 e dois volumes de etanol 100%. Neste ponto o DNA genômico tornou-se insolúvel, foi coletado através de uma pipeta pasteur e transferido para um tubo de microcentrífuga no qual foi lavado duas vezes através da adição de 500 μl de etanol 70% e precipitação à rotação máxima por dois minutos.

O DNA purificado foi seco à 37 °C para a remoção do etanol residual e resuspendido em tampão TRIS-EDTA.

3.3.3 *Plasmídeo Tol de Pseudomonas putida Mt-2*

Foi utilizado um protocolo para extração de cosmídeos devido ao tamanho do plasmídeo Tol (117 Kb). A cepa Mt-2 de *Pseudomonas putida* foi inoculada em meio mínimo possuindo vapor de xileno como única fonte de carbono, que era administrado através de um tubo contendo xileno disposto no interior do erlenmeyer de cultura (Figura: 15).

A cultura foi incubada no interior de uma capela à temperatura ambiente por uma semana, tempo necessário para que o meio turvasse devido ao crescimento microbiano.

Em seguida, a cultura foi centrifugada a 6500 rpm por 10 minutos sendo descartado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 4 ml de GTE (25 mM Tris-HCl pH 8 + 10 mM EDTA + 50 mM glicose), a solução foi transferida para um tubo pré-gelado e deixada no gelo por 10 minutos. 8 ml da solução A (0,2 M NaOH + 1% SDS) foram adicionados e a solução foi novamente incubada no gelo por 10 minutos sendo o tubo agitado ocasionalmente. Após a incubação, 6 ml de acetato de potássio 5 M foram adicionados e a solução foi novamente

Figura 15: Diagrama mostrando o método de cultura de *Pseudomonas putida* Mt-2

incubada por 10 minutos, mas à temperatura ambiente. A neutralização do pH pela adição de acetato de sódio leva a precipitação de ácidos nucleicos grandes (DNA cromossomal) e de boa parte das proteínas, assim para separá-los, a mistura foi centrifugada à 4000 rpm por 40 minutos à 4 °C e o sobrenadante transferido para outro tubo. 0,8 volume de isopropanol foi adicionado a solução e esta incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, o que leva a precipitação do DNA restante que é separado através da centrifugação à 7000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em 500 μ l de tampão TRIS-EDTA e transferido para um tubo de microcentrífuga.

Após a adição de 500 μ l de cloreto de lítio gelado 5M ao tubo de microcentrífuga, este foi centrifugado por 10 minutos à 14000 rpm e 4 °C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 500 μ l de isopropanol e incubado por 10 minutos. O isopropanol é responsável pela precipitação do DNA e, para separá-lo, o tubo contendo a solução foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado com 200 μ l de tampão Tris-HCl+EDTA e em seguida foram adicionados 4 μ l de RNase (10 mg.ml⁻¹) e a reação foi incubada por 15 minutos. À digestão, foram adicionados 400 μ l de cloreto de sódio 1,6 M em PEG 8000 13% gelado. A solução foi homogenizada e centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos.

O precipitado foi ressuscitado em 200 μ l de tampão Tris-HCl+EDTA e a solução de DNA plasmidial purificado foi estocada à -20 °C.

3.3.4 Extrações de vetores de clonagem e expressão

A bactéria portadora do plasmídeo foi cultivada *overnight* à 37 °C em 5 ml de meio LB. 2 ml foram separados e centrifugados à 7000 rpm por 5 minutos sendo o sobrenadante descartado posteriormente. O precipitado de células foi ressuscitado em 100 μ l de tampão 25 mM Tris-

HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glicose, 100 g.l⁻¹ RNase A (pH 8) e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente adicionados 150 µl de solução fresca de 0,2 M NaOH e 1% SDS. Após incubar no gelo por 5 minutos, foram adicionados 150 µl de acetato de sódio 3 M pH 5, que levou à precipitação do DNA genômico e outros contaminantes celulares, que foram separados por centrifugação à velocidade máxima de 5 minutos.

Ao sobrenadante da centrifugação foram adicionados de 0.5 volume de fenol tamponado pH 8, a solução foi novamente centrifugada por 15 minutos, a fase superior foi coletada e esta etapa repetida trocando o fenol por clorofórmio puro. A fase superior foi novamente coletada, acrescida de 2 volumes de etanol 100% e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. A solução foi posteriormente centrifugada por 15 minutos à velocidade máxima para a precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado por 500 µl de Etanol 75% seguido de centrifugação por 5 minutos à velocidade máxima e descarte do sobrenadante.

O DNA plasmidial purificado foi seco a 37 °C e ressuspendido em volumes que variavam de 20 µl à 50 µl de água ultra pura. No caso de processamento de volumes maiores de cultura, os passos eram ajustados proporcionalmente.

3.4 Curva de crescimento das diferentes cepas de *Pseudomonas putida* Mt-2

Diferentes cepas de *Pseudomonas putida* Mt-2 disponíveis no estoque -70 °C da coleção do Prof. Dr. Beny Spira (End. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 sala 114) foram reativadas em meio sólido LB-Ágar e repassadas para 5 ml de meio LB. Desta cultura, 200 µl foram inoculados em 100 ml de meio mínimo exposto à vapor de xileno conforme o descrito na secção 3.3.3.

Após as culturas atingirem a fase estacionária, um inóculo de 200 µl foram transferidos para cultivo em 100 ml de meio mínimo suplementado com vapor de xileno à temperatura ambiente sendo acompanhado pelo aumento da densidade ótica da cultura à 540 nm.

3.5 Precipitação de DNA

As soluções de DNA à serem precipitadas, caso apresentassem volumes inferiores à 50 µl, foram completadas até 50 µl com água ultra-pura. Foram adicionados 0,1 vol. de acetato de sódio 3M (ph 5,0), 30 µg de glicogênio e 2 vol. de etanol 100% sendo a solução incubada à -70 °C por 20 minutos. As amostras foram então centrifugadas à velocidade máxima (18000 g)

por 15 minutos à 4 °C. Com a precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70% seguido por outra centrifugação à velocidade máxima por 5 minutos.

Por último a solução de etanol 70% foi descartada, o precipitado seco à 37 °C por 30 minutos e ressuspensionado em um volume variável de água ultra-pura dependendo da aplicação posterior.

3.6 Reação em cadeia da polimerase - PCR

As reações foram executadas com 0,25 mM de dNTPs, 0,3 µM de ambos os iniciadores e 0,5 U de *Taq* polimerase para cada 12,5 µl de reação, em todos os casos foram executados 35 ciclos de amplificação com tempo de desnaturação de 3 minutos e tempo de *annealing* de 30 segundos. Já as concentrações de MgCl₂ e a temperatura de anelamento variaram buscando a otimização das reações (maior especificidade e eficiência).

Água ultra-pura, livre de RNase ou DNase, foi utilizada nos ensaios e todos os reagentes usados foram adquiridos através da empresa Invitrogen.

3.6.1 Iniciadores utilizados nas reações

A tabela abaixo resume os iniciadores utilizados no trabalho (Tabela 6).

Tabela 6 – Diferentes iniciadores utilizados nos ensaios

Nome	Sequência ^a	Enzima de Restrição	Referência ^b
xylR(-)	TTGGGATCCTGAGCGACT	<i>Bam</i> HI	
xylR(+)	(AGCACTCGAG)AAATAACGCCAAGCAGAACG	<i>Xho</i> I	
Pu(-)	TAGCGGTACCTGAAGGGTCACCAC	<i>Kpn</i> I	127
Pu202(+)	(AAGC)TTGATCAAATCGACAGGTGG	<i>Hind</i> III	
Pu398(+)	(AAGCTT)AAACCTCAGGCGCTATATC	<i>Hind</i> III	
Pu794(+)	AGAAGCTTGAGCACCAGAAT	<i>Hind</i> III	
PuNest(-)	TGGTCTTGGATAAGCACACG	\s	
PuNest(+)	GGATATACATGGCGAAAGCAA	\s	
phoA(-)XhoI	(ATTGTTCTCGAG)TGCCATTAAGTCTGGTTG	<i>Xho</i> I	
phoA(-)BamHI	(GGATCC)ATTGTTCTCGAGTGCCA	<i>Bam</i> HI	
phoA(+)	AATGTATTGGTACCTGGAGAA	<i>Kpn</i> I	127

^a Sequências entre parênteses correspondem a s caudas dos iniciadores para inserção de sequências de restrição; sequências em negrito correspondem aos pontos de restrição

^b Iniciadores sem referência foram desenhados neste trabalho

3.6.2 Amplificação dos fragmentos contendo Pu

Uma reação de PCR foi executada usando os iniciadores Pu *nested* e o plasmídeo Tol como molde, o fragmento obtido foi clonado em pGem Easy. O plasmídeo contendo o fragmento Pu *nested* foi então utilizado como molde para a amplificação dos demais fragmentos (Pu 202 pb, Pu 398 pb, Pu 794 pb).

Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos contendo o promotor Pu

A tabela abaixo resume os diferentes ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos que continham o promotor Pu (Tabela 7).

Tabela 7 – Ciclos utilizados para a amplificação dos fragmentos de Pu

Iniciadores	°C Desnaturação	Tempo Extensão	MgCl ₂ mM
Pu <i>nested</i>	53	3'	1,5
Pu202(+)/Pu(-)	54	1'	1,5
Pu398(+)/Pu(-)	54	1'	1,5
Pu794(+)/Pu(-)	54	1'	1,5

3.6.3 Amplificação do fragmento contendo xylR

A amplificação de *xylR* foi executada usando os iniciadores *xy/R* e como molde o plasmídeo Tol, extraído a partir da cultura de *P. putida* Mt-2. A temperatura de anelamento de 55 °C e o tempo de extensão de 2 minutos e 30 segundos foram utilizados nos ciclos, assim como MgCl₂ 1,5 mM.

O fragmento obtido a partir da reação foi purificado e clonado no plasmídeo comercial *pGem-T Easy*¹³².

3.6.4 Amplificação do fragmento de fosfatase alcalina (*phoA*)

A amplificação de *phoA* foi executada utilizando os iniciadores *phoA* e a extração de DNA genômico de *E. coli* MG1655 ou o vetor pGem T Easy contendo *phoA* como moldes. A temperatura de 52 °C de *annealing* e tempo de extensão de 2 minutos foram utilizados nos ciclos, assim como MgCl₂ 1,5 mM.

Inicialmente fez-se a amplificação de *phoA* pelo par de iniciadores *phoA*(+)/*phoA*(-)XhoI, sendo o *amplicon* clonado em pGem T Easy. Posteriormente este plasmídeo foi utilizado como molde para a reação com os iniciadores *phoA*(+)/*phoA*(-)BamHI, sendo este *amplicon* também clonado em vetor pGem T Easy gerando um inserto de *phoA* com duas sequências de restrição em sua porção terminal (*XhoI* e *BamHI*) separadas por 6 nucleotídeos.

Tal região possibilitou a clonagem de *xylR* no plasmídeo biossensor.

3.6.5 Amplificação da ligação Pu202+*phoA*

A reação de ligação dos fragmentos Pu 202 e *phoA* foi utilizada de molde para a reação de PCR, Pu 202(+) e *phoA*(-)BamHI como iniciadores da reação e 1,5 mM para concentração de MgCl₂. A reação de amplificação constituiu-se de 5 minutos de desnaturação inicial à 95 °C, 35 ciclos que compreendiam 30 segundos de desnaturação à 94 °C, 30 de anelamento à 55 °C e extensão de 2 minutos e 15 segundos à 72 °C, seguido por último por uma extensão final de 3 minutos à 72 °C.

O fragmento obtido foi purificado, ligado ao vetor pGem T Easy, de acordo com as especificações do fabricante¹³², posteriormente clonado em *E. coli* DH10B, uma colônia selecionada e congelada à -70 °C.

3.7 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado a partir dos plasmídeos compostos pelo vetor de clonagem pGEM-T Easy e incertos (Pu202, Pu394, Pu794, *phoA*, *xylR*), através dos iniciadores utilizados para amplificação e outros desenhados exclusivamente para o sequenciamento. O Centro do Genoma Humano foi responsável pela reação e sequenciamento das amostras.

As sequências foram analisadas sendo partes que não apresentavam qualidade satisfatória foram excluídas e os fragmentos unidos por regiões de alinhamento. O resultado foi então alinhado com a sequências disponíveis no NCBI^{51, 133}.

3.8 Quantificação por espectrofotometria

As concentrações de DNA e eventuais impurezas das amostras foram medidas através da absorção de luz. Foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop fabricado pela Thermo Fisher

Tabela 8 – Iniciadores utilizados exclusivamente para o sequenciamento

Nome	Sequência
Pu(+)-500	CAACGCAATTTTACCAATCG
PhoA(+)-500	AGATGACCGACAAAGCCATT
PhoA(+)-1000	GCGACCGGTAACGTTTCTAC
XylR(+)-500	TTTCGGCTGAATGTTTTTCC
XylR(+)-1000	CTGTGAGACCATCGACAAGG
XylR(+)-1500	CTGCGGTTGGGCTATCAG
M13/pUC Forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG ^a
M13/pUC Reverse	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG ^a

^a Invitrogen

Scientific Inc (81 Wyman Street, Waltham MA 02454 USA) para a quantificação das amostras, usando como referência a solução na qual o DNA estava dissolvido.

3.9 Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram confeccionados com agarose 1% e corridos a 5 volts.cm⁻¹. O tampão TAE (TRIS, ácido acético, EDTA) foi utilizado nas corridas e obtido a partir da diluição do tampão estoque 50x (242 g TRIS, 57,1 ml de ácido acético, 100 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0), completado com água destilada até obter-se 1000 ml).

3.10 Purificação a partir do gel de agarose

Os fragmentos e resultados de digestão que precisavam ser purificados foram aplicados em gel de agarose de baixo ponto de fusão na concentração de 1%. Após corar com brometo de etídeo, as bandas visualizadas sob luz ultravioleta foram cortadas submetidas à purificação por kit comercial Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega¹³⁴ seguindo as orientações existentes no próprio kit.

3.11 Clonagem

Os fragmentos foram clonados no vetor comercial *pGem Easy* (Promega, Madison-USA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante¹³². As colônias que apresentaram coloração branca, após o crescimento em placas de LB ágar suplementadas com ampicilina, IPTG e X-Gal, foram inoculadas em 5 ml de LB+ampicilina.

Caso as culturas derivadas das colônias apresentassem os plasmídeos com os fragmentos, estas eram inoculadas em 50 ml do mesmo meio, cultivadas *overnight*, ressuspendidas em LB 20% glicerol e congeladas à -70 °C.

3.12 Digestão com enzimas de restrição

Nas digestões cujo objetivo era verificar a presença dos fragmentos, foram utilizados 5 µl de DNA e 10 U de enzima para reações de 20 µl incubados à temperatura ótima por 2 horas. No caso de digestões para posterior purificação dos fragmentos foram utilizados 100 µl de DNA e 40 U de enzima para reações de 300 µl incubadas à temperatura ótima *overnight*.

No caso de duplas digestões, uma reação era executada e posteriormente precipitada, ressuspensa em outro tampão e digerida por outra enzima.

4 Resultados e discussão

4.1 Produção dos componentes do biossensor

O primeiro passo para a obtenção dos biossensores consistiu na amplificação dos componentes por PCR e sua clonagem em pGem T Easy. Abaixo encontra-se um breve descrição dos fragmentos e sua função na construção dos biossensores:

Promotores Pu O promotor Pu será o responsável pela transcrição do gene indicador fosfatase alcalina. Foram amplificados três diferentes promotores com três diferentes comprimentos estendendo-se à partir do início de transcrição (Figura 16):

Figura 16: Região do promotor Pu mostrando os locais de ligação dos elementos reguladores (IHF e XylR) e de ancoramento dos iniciadores utilizados nos PCRs desse trabalho e para a montagem do biossensor 4 de Janizelli.

Pu 202 Estende-se de 0 à -202 pb do início de transcrição. Corresponde ao promotor com todas as sequencias de regulação descritas na literatura. Semelhante ao promotor não funcional de 210 pb utilizado em Janizelli¹²⁷.

Pu 396 Estende-se de 0 à -396 pb do início de transcrição. O intuito da produção desse biossensor é testar a hipótese levantada por Janizelli¹²⁷ de que haveriam outras

regiões ainda não descritas poderiam também controlar sua ativação, isto devido a ausência de atividade do biossensor 4 descritor em seu trabalho.

Pu 802 Estende-se de 0 à -802 pb do início de transcrição. Segue o mesmo princípio do promotor Pu 396, estendendo-se mais 406 pb dentro da região de repetição a montante de Pu.

xylR Proteína reguladora responsável pela ativação de Pu na presença de monoaromáticos.

phoA Gene indicador que será utilizado junto com substrato cromóforo para verificar a atividade do promotor Pu.

4.1.1 *Produção de phoA*

Extração do DNA cromossômico de E. coli e amplificação do fragmento

A extração do DNA cromossômico resultou em um bom rendimento ($5225 \mu\text{g.ml}^{-1}$) e boa qualidade. Foi utilizado $1 \mu\text{l}$ como molde para a reação de PCR e posteriormente $3 \mu\text{l}$ do produto foi aplicado em um gel de agarose para verificar o resultado da reação (Figura 17)

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR de *phoA*. M, Marcador 1Kb (Fermentas); C, Controle da reação (s\ DNA molde); 1, Reação 1 ($\approx 1500\text{pb}$); 2, Reação duplicata da reação 1 ($\approx 1500\text{pb}$)

O produto de PCR do gene *phoA* incorporou uma sequência de restrição para a enzima *XhoI*. O produto de PCR foi ligado ao em pGem T Easy e clonado em *E. coli* DH10B, sendo esta preservada à -80°C . Esta bactéria foi cultivada e teve seu plasmídeo extraído, este foi utilizado

de molde para a amplificação pelos iniciadores *phoA*(+)/*phoA*(-)BamHI dando origem à um *amplicon* contendo o gene *phoA* e duas sequencias de restrição, *XhoI* e *BamHI* respectivamente.

4.1.2 *Produção de xylR e Pu*

Extração do plasmídeo Tol e amplificação dos fragmentos

A extração do DNA plasmidial das diferentes cepas de Mt-2 de *Pseudomonas putida* resultou em um bom rendimento (Figura 18).

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1% da extração do plasmídeo Tol de *Pseudomonas putida* Mt-2 de diferentes cepas (116,580 pb). M, Marcador 1Kb (Fermentas); V.L., TOL cepa Victor de Lorenzo; Isr., TOL cepa Israel; Lar., TOL cepa Larry

O plasmídeo Tol da cepa Victor de Lorenzo foi utilizado como molde para a amplificação de Pu e *xyI*R.

Amplificação de *xyI*R

O plasmídeo Tol foi utilizado como molde para a reação de PCR de *xyI*R, o produto da reação foi caracterizado através da eletroforese. Revelou-se uma única banda com o número de bases condizente com o esperado de 2099 pb (Figura 19).

O fragmento foi purificado e clonado em pGem T Easy e a bactéria hospedeira foi congelada à -70 °C

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR de *xyIR* (≈ 2100 pb). M, marcador 1 Kb Fermentas; C, Reação controle; 1, Reação de PCR de *xyIR*; 2, Duplicata

Amplificação de Pu

O maior problema encontrado nessa etapa do trabalho foi a inespecificidade na amplificação dos fragmentos correspondentes à Pu de diferentes extensões, provavelmente devido à existência da região de repetição logo a montante de Pu. Este problema foi solucionado pela utilização de iniciadores que flanqueavam os demais, abarcando todos os diferentes tamanhos de Pu. Tais iniciadores (*Pu nested*) ancoravam-se no interior de genes, regiões mais estáveis que as intergênicas, facilitando a amplificação (Figura 20).

Figura 20: Região gênica do promotor Pu no plasmídeo Tol salientando a ancoragem dos iniciadores *nested* e os promotores Pu de diferentes tamanhos.

Devido a dificuldades ainda existentes em obter bandas individuais de *Pu nested*, foi executado um PCR gradiente com a finalidade de definir uma temperatura de anelamento e concen-

tração de MgCl_2 ótimas para a amplificação de *Pu nested*. O plasmídeo Tol foi utilizado como molde e obteve-se uma única banda entre as temperaturas de $50,7^\circ\text{C}$ à 57°C na concentração de MgCl_2 de 1,75 mM (Figura 21).

Figura 21: Eletroforese em gel de agarose 1% do PCR gradiente de *Pu nested* (2621 pb) com temperatura variando de raia a raia igualmente de $50,2^\circ\text{C}$ à 57°C e diferentes concentrações de cloreto de magnésio. M, Marcador 1 Kb (Fermentas)

As amostras que apresentaram uma única banda no gel foram unidas, purificadas e usadas para clonagem em pGem T Easy.

Clonagem de *Pu nested* Uma colônia que continha o inserto e uma sem foram cultivadas em meio líquido suplementado com ampicilina e tiveram seus plasmídeos extraídos. O resultado da extração foi digerido com *EcoRI* e a digestão, assim como o controle, foram aplicados em gel de agarose 1% (Figura 22).

Os fragmentos gerados pela digestão foram condizentes com pGem T Easy (*Pu nested*) clivado com *EcoRI* (fragmentos com aproximadamente 860 e 1760 pb e 3000 pb do vetor vazio), com isso este plasmídeo foi utilizado como molde para a amplificação dos promotores *Pu* de diferentes tamanhos (202, 396 e 802 pb).

Amplificação dos fragmentos de *Pu* A amplificação dos diferentes fragmentos ocorreu sem problemas apresentando todos bandas únicas com o tamanho esperado (Figura 23)

Os fragmentos foram purificados e clonados em pGem T Easy e as bactérias hospedeiras

Figura 22: Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão de *Pu nested* clonado em *pGem Easy*. M, marcador 1 Kb Fermentas; -C, colônia azul não digerida; -E, colônia azul digerida com *EcoRI* (≈ 3000 pb); 1C, colônia branca não digerida; 1E, colônia branca digerida com *EcoRI* (≈ 3000 pb, ≈ 1760 pb e ≈ 860 pb)

Figura 23: Eletroforese das reações de PCR usando diferentes iniciadores para a amplificação de *Pu*. M, marcador 1 Kb Fermentas; Pu 802, PCR usando os iniciadores Pu802(+)/Pu(-) (802 pb); Pu 398, PCR usando os iniciadores Pu398(+)/Pu(-) (396 pb); Pu 202, PCR usando os iniciadores Pu202(+)/Pu(-) (202 pb)

foram congeladas à -80°C

4.2 Sequenciamento dos componentes

4.2.1 Sequenciamento de Pu794

A análise das sequências obtidas mostrou correspondência com a sequência de referência até cerca de 550 bases suficiente para a montagem dos dois primeiros biossensores (Pu202 e Pu396).

Pu794_seq	1	tgaagggtcaccactatTTTTATTTTAAGTCTCGTATAGCTAGCAACCGC	50
Pu794_base	1	TGAAGGGTCACCACTATTTTTATTTTAAGTCTCGTATAGCTAGCAACCGC	50
Pu794_seq	51	catgccattgcttataccgatccccttatttcatctaaattattgatttt	100
Pu794_base	51	CATGCCATTGCTTATACCGATCCCCTTATTTGATCTAAATTATTGATTTT	100
Pu794_seq	101	ctttgtaaaaaagaaagggggggtatgagagaaaatctacagcacgctgg	150
Pu794_base	101	CTTTGTAAAAAAGAAAGGGGGGTATGAGAGAAAATCTACAGCACGCTGG	150
Pu794_seq	151	ctgtatttgagcaaatcatcaatcgcgcataaccacctgtcgatttgatc	200
Pu794_base	151	CTGTATTTGAGCAAAATCATCAATCGCGCATAACCACCTGTCGATTTGATC	200
Pu794_seq	201	aaggcagcgataaaaaaggttcacgcgctttccggggaagacagcctt	250
Pu794_base	201	AAGGCAGCGATAAAAAAGGTTTCATCGCGCTTCCCGGGGAAGACAGCCTT	250
Pu794_seq	251	gactttcaggaagaagtagtccgagccccgaaaccataggccatgcgct	300
Pu794_base	251	GACTTTCAGGAAGAAGTAGTCCGAGCCCCGAAACCATAGGCCATGCGCT	300
Pu794_seq	301	tgatcaccttgattcggttggttcacgccCtccagcaggCtgggtatgcatg	350
Pu794_base	301	TGATCACCTTGATTTCGGTTGTTTCACGCCCTCCAGCAGGCTGGTATGCATG	350
Pu794_seq	351	ggaaaacgggcgcTggcgaggatgccgcggatatagcgcctgaggttttt	400

Pu794_base	351	GGAAAACGGGCGCTGGCGAGGATGCCGCGGATATAGCGCCTGAGGTTTTT	400
Pu794_seq	401	ggcgaagcgcctaagccccctgtcacgggcatgcCgtagccaggccccgccag 	450
Pu794_base	401	GGCGAAGCGCTAAGCCCCTGTACAGGGCATGCCGTAGCCAGGCCCGCCAG	450
Pu794_seq	451	cgttgccagccttcccatacgtctggggcgtagcagacttccttcagggc 	500
Pu794_base	451	CGTTGCCAGCCTTCCCATACGCTCGGGCGTAGCAGACTTCCTTCAGGGC	500
Pu794_seq	501	acctCgaaaaacctcggccccCtgCgattggtaaaaCtgCgttgctcctga .	550
Pu794_base	501	ACCTCGAAAAACCTCGGCCCCCTGCGATTGGTAAATTGCGTTGTCCTGA	550
Pu794_seq	551	tttcgttctCTgacaccagccaTgaagaagcgactgccatcaagacgga 	600
Pu794_base	551	TTTCGTTCTCTGACACCAGCCATGAAGAAGCGCACTGCCATCAAGACGGA	600
Pu794_seq	601	cCtgttSgCtgAcgaacatcatcggaagaagatcgacmcgcttgagatc .	650
Pu794_base	601	CCTGTTGCTGACGAACATCATCGGAAGAAGATCGACACGCTTGAGATC	650
Pu794_seq	651	cgctgrcccagatcgagtcgtacatcgat----- .	679
Pu794_base	651	CGCTGGCCCAGATCGAGTCGTACATCGATTTCGCGGCACTTGCGGCGGAA	700
Pu794_seq	679	-----	679
Pu794_base	701	GTCGATCGGGTAGCGCCGCGCCCTGTCAGCCCTCAAGCGGTGCCCCCGG	750
Pu794_seq	679	-----	679
Pu794_base	751	TATCCGACGGAGACGATGGTGCGGATTCTGGTGCTCAAGCGGC	793

4.2.2 Sequenciamento de *phoA*

O resultado do sequenciamento de *phoA* condiz com a base de dados exceto pela existências de duas mutações no início de sua sequencia devido à utilização de iniciadores degenerados

com o intuito da produção de um sítio de restrição. Além disso, existem 5 nucleotídeos que não puderam ser resolvidos pelo sequenciamento.

PhoA_seq	1	aatgtattggtacctggagaaaataaagngaacaaagcactattgcact	50
		. .	
PhoA_base	1	AATGTATTTGTACATGGAGAAAATAAAGTGAAACAAAGCACTATTGCACT	50
PhoA_seq	51	ggcactcttaccgttactgtttaccctgtgacaaaagcccgacaccag	100
PhoA_base	51	GGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCCGACACCAG	100
PhoA_seq	101	aaatgcctgttcttgaaaaccgggctgctcagggcgatattactgcaccc	150
PhoA_base	101	AAATGCCTGTTCTTGAAAACCGGGCTGCTCAGGGCGATATTACTGCACCC	150
PhoA_seq	151	ggcgggtgctcgccgtttaacgggtgatcagactgccgctctgcgtgattc	200
PhoA_base	151	GGCGGTGCTCGCCGTTTAACGGGTGATCAGACTGCCGCTCTGCGTGATTC	200
PhoA_seq	201	tcttagcgataaacctgcaaaaaatattatTTTgctgattggcgatggga	250
PhoA_base	201	TCTTAGCGATAAACCTGCAAAAAATATTATTTGCTGATTGGCGATGGGA	250
PhoA_seq	251	tgggggactcggaattactgccgcacgtaattatgccgaaggtgcgggc	300
PhoA_base	251	TGGGGGACTCGGAAATTACTGCCGCACGTAATTATGCCGAAGGTGCGGGC	300
PhoA_seq	301	ggctTTTTTaaaggtatagatgccttaccgcttaccgggcaatacactca	350
PhoA_base	301	GGCTTTTTTAAAGGTATAGATGCCTTACCGCTTACGGGCAATACACTCA	350
PhoA_seq	351	ctatgcgctgaataaaaaaacggcaaaccggactacgtcacgactcgg	400
PhoA_base	351	CTATGCGCTGAATAAAAAAACGGCAAACCGGACTACGTCACCGACTCGG	400
PhoA_seq	401	ctgcatcagcaaccgcctgggtcaaccgggtgtcaaacctataacggcgcg	450
PhoA_base	401	CTGCATCAGCAACCGCTGGTCAACCGGTGTCAAAACCTATAACGGCGCG	450

PhoA_seq	451	ctgggcgctcgatattcacgaaaaagatcacccaacgattctggaaatggc	500
PhoA_base	451	CTGGGCGTCGATATTACGAAAAAGATCACCCAACGATTCTGGAAATGGC	500
PhoA_seq	501	aaaagccgcaggtctggcgaccggtaacgtttctaccgcagagttgcagg	550
PhoA_base	501	AAAAGCCGCAGGTCTGGCGACCGGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTGCAGG	550
PhoA_seq	551	atgccacgcccgtgcgctggtggcacatgtgacctcgcgcaaatgctac	600
PhoA_base	551	ATGCCACGCCCGCTGCGCTGGTGGCACATGTGACCTCGCGCAAATGCTAC	600
PhoA_seq	601	ggtccgagcgcgaccagtgaaaaatgtccgggtaacgctctggaaaaagg	650
PhoA_base	601	GGTCCGAGCGCGACCAGTGAAAAATGTCCGGGTAACGCTCTGAAAAAGG	650
PhoA_seq	651	cggaaaaggatngannaccgaacagctgcttaacgctcgtgccgacgtta	700
PhoA_base	651	CGGAAAAGGATCGATTACCGAACAGCTGCTTAACGCTCGTGCCGACGTTA	700
PhoA_seq	701	cgcttggcggcgcgcaaaaacctttgctgaaacggcaaccgctggtgaa	750
PhoA_base	701	CGCTTGCGGCGCGCAAAAACCTTTGCTGAAACGGCAACCGCTGGTGAA	750
PhoA_seq	751	tggcagggaaaaacgctgcgtgaacaggcacaggcgcgtggttatcagtt	800
PhoA_base	751	TGGCAGGGA AAAACGCTGCGTGAACAGGCACAGGCGGTGTTATCAGTT	800
PhoA_seq	801	ggtgagcgatgctgcctcactgaattcggtgacggaagcgaatcagcaaa	850
PhoA_base	801	GGTGAGCGATGCTGCCTCACTGAATTCGGTGACGGAAGCGAATCAGCAAA	850
PhoA_seq	851	aaccctgcttggcctgtttgctgacggcaatatgccagtgcgctggcta	900
PhoA_base	851	AACCCCTGCTTGGCCTGTTTGCTGACGGCAATATGCCAGTGCGCTGGCTA	900
PhoA_seq	901	ggaccgaaagcaacgtaccatggcaatatcgataagcccgagtcacctg	950

PhoA_base	901	GGACCGAAAGCAACGTACCATGGCAATATCGATAAGCCCGCAGTCACCTG	950
PhoA_seq	951	tacgccaaatccgcaacgtaatgacagtgtaccawccctggcgcagatga	1000
PhoA_base	951	TACGCCAAATCCGCAACGTAATGACAGTGTACCAACCCTGGCGCAGATGA	1000
PhoA_seq	1001	ccgacaaagccattgaattgttgagtaaaaatgagaaaggctttttcctg	1050
PhoA_base	1001	CCGACAAAGCCATTGAATTGTTGAGTAAAAATGAGAAAGGCTTTTTCCTG	1050
PhoA_seq	1051	caagttgaaggctgcgtcaatcgataaacaggatcatgctgcgaatccttg	1100
PhoA_base	1051	CAAGTTGAAGGTGCGTCAATCGATAAACAGGATCATGCTGCGAATCCTTG	1100
PhoA_seq	1101	tgggcaaattggcgagacggctcgatctcgatgaagccgtacaacgggcgc	1150
PhoA_base	1101	TGGGCAAATTGGCGAGACGGTCGATCTCGATGAAGCCGTACAACGGGCGC	1150
PhoA_seq	1151	tggaattcgctaaaaaggagggtaacacgctgggtcatagtcaCCGCTGat	1200
PhoA_base	1151	TGGAATTCGCTAAAAAGGAGGGTAACACGCTGGTCATAGTCACCGCTGAT	1200
PhoA_seq	1201	cacgcccacgccaGccagatTgttgcgCggatAccaaagctccgggcct	1250
PhoA_base	1201	CACGCCCACGCCAGCCAGATTGTTGCGCCGATACCAAAGCTCCGGGCCT	1250
PhoA_seq	1251	cacccaggcGctaaataccaagatggCgcagtgatgggtgatgagttacg	1300
PhoA_base	1251	CACCCAGGCGCTAAATACCAAAGATGGCGCAGTGATGGTGATGAGTTACG	1300
PhoA_seq	1301	ggaactccgaaggaggttcacaagAacataccggcagtcagttgcgtatt	1350
PhoA_base	1301	GGAACTCCGAAGAGGATTACACAAGAACATACGGCAGTCAGTTGCGTATT	1350
PhoA_seq	1351	gcggcgtatggcccgcatgccgccaatgttggttgactgaccgaccagAc	1400
PhoA_base	1351	GCGGCGTATGGCCCGCATGCCGCCAATGTTGTTGGACTGACCGACCAGAC	1400

PhoA_seq	1401	cgatctCttctacaccatgaaagccgctCtggggCTGAAATaaaaccgcg	1450
PhoA_base	1401	CGATCTCTTCTACACCATGAAAGCCGCTCTGGGGCTGAAATAAAACCGCG	1450
PhoA_seq	1451	cccgGcagtgaattttcgtgcccgggtgggttttttgcgtgtagcaacca	1500
PhoA_base	1451	CCCGGCAGTGAATTTTCGCTGCCGGGTGGTTTTTTTGTGTGTAGCAACCA	1500
PhoA_seq	1501	gacttaaTGGC	1511
PhoA_base	1501	GACTTAATGGC	1511

4.2.3 Sequenciamento de *xylR*

O sequenciamento de *xylR* apresentou algumas diferenças com relação a sequencia de referência⁵¹, sendo as duas últimas devido a utilização de iniciadores degenerados na amplificação. As mutações presentes nos nucleotídeos 403 e 404 já foram discutidas por Janizelli¹²⁷ e por outro plasmídeo continha *xylR*¹³³, sendo que o último foi capaz de gerar um plasmídeo sensor funcional para a atividade de Pu. A mutação presente no nucleotídeo 2089 é encontra-se fora do gene e as duas ultimas correspondem à inserção de sítios de restrição.

XylR_seq	1	aataacgccaagcagaacgaagacgttctttttaagaagcgagaacacca	50
XylR_base	1	AATAACGCCAAGCAGAACGAAGACGTTCTTTTAAAGAAGCGAGAACACCA	50
XylR_seq	51	gaagttcgtgctgtcggggcatgcggcgacgaattggcggataaagggga	100
XylR_base	51	GAAGTTCGTGCTGTCTGGGGCATGCGGCGACGAATTGGCGGATAAAGGGGA	100
XylR_seq	101	tctgcgttgaggtggatttcagttaatcaattggttaatctttcaggacc	150
XylR_base	101	TCTGCGTTGAGGTGGATTTCAGTTAATCAATTGGTTAATCTTTCAGGACC	150
XylR_seq	151	acctaagcaaagtctaaagtggcagatggaatgctgagccggcaagcaca	200
XylR_base	151	ACCTAAGCAAATGCTAAAGTGGCAGATGGAATGCTGAGCCGGCAAGCACA	200

XylR_seq	201	ggccttgacgttgcaaggtagtcatgaccgcagtgagcctctgatgttcc	250
XylR_base	201	GGCCTTGACGTTGCAAGGTAGTCATGACCGCAGTGAGCCTCTGATGTTCC	250
XylR_seq	251	gccgggtggatcatccccgataaaaacaagaggaaaacaaatgtcgcttac	300
XylR_base	251	GCCGGGTGGATCATCCCGATAAAAACAAGAGGAAAACAAATGTCGCTTAC	300
XylR_seq	301	atacaaaccgaagatgcagcatgaggatatgcaagaccttagcagccaga	350
XylR_base	301	ATACAAACCCAAGATGCAGCATGAGGATATGCAAGACCTTAGCAGCCAGA	350
XylR_seq	351	tccgtttcgttgccgccgaaggcaagatctggttgggagagcagcgcgatg	400
XylR_base	351	TCCGTTTCGTTGCCGCCGAAGGCAAGATCTGGTTGGGAGAGCAGCGCATG	400
XylR_seq	401	ctgctaatgcagctatctacgctggccagcttccgtcgcgaaattatcag	450
		..	
XylR_base	401	CTCGTAATGCAGCTATCTACGCTGGCCAGCTTCCGTCGCGAAATTATCAG	450
XylR_seq	451	cttgatcggcgtcgagcgggccaaagggtttcttcctgcggttgggctatc	500
XylR_base	451	CTTGATCGGCGTCGAGCGGGCCAAGGGTTTCTTCCTGCGGTTGGGCTATC	500
XylR_seq	501	agtcggcctgatggatgccgagctggcacgcaagctgcggccggccatg	550
XylR_base	501	AGTCCGGCCTGATGGATGCCGAGCTGGCACGCAAGCTGCGCCGGCCATG	550
XylR_seq	551	cgcgaggaggaggtgttcctggctgggcctcaattgtatgcgctcaagg	600
XylR_base	551	CGCGAGGAGGAGGTGTTCTGGCTGGGCCTCAATTGTATGCGCTCAAGGG	600
XylR_seq	601	gatggtcaaagtacgcttgctgacaatggatatcgccatccgggacggac	650
XylR_base	601	GATGGTCAAAGTACGCTTGCTGACAATGGATATCGCCATCCGGGACGGAC	650
XylR_seq	651	gtttcaacgtggaggccgagtggttgattcctttgaagtggatatctgc	700

XylR_base	651	GTTTCAACGTGGAGGCCGAGTGGATTGATTCCTTTGAAGTGGATATCTGC	700
XylR_seq	701	cgaactgagctgggcctgatgaatgagcccgctctgctggacggcgctagg	750
XylR_base	701	CGAACTGAGCTGGGCCTGATGAATGAGCCCGTCTGCTGGACGGTGCTAGG	750
XylR_seq	751	ctatgctagcggctatggttcggcattcatgggccgcagaatcattttcc	800
XylR_base	751	CTATGCTAGCGGCTATGGTTCGGCATTGATGGCCGCAGAATCATTTTCC	800
XylR_seq	801	aggaaactagctgtcgcgggtgcggtgacgataaatgccttatcgtcggc	850
XylR_base	801	AGGAACTAGCTGTGCGGGTGCGGTGACGATAAATGCCTTATCGTCGGC	850
XylR_seq	851	aagaccgcagaagagtggggcgatgtcagcagtttcgaagcctacttcaa	900
XylR_base	851	AAGACCGCAGAAGAGTGGGGCGATGTCAGCAGTTTCGAAGCCTACTTCAA	900
XylR_seq	901	aagcgacccgatcgtagacgagcgctacgagctgcagacccaggttgcca	950
XylR_base	901	AAGCGACCCGATCGTAGACGAGCGCTACGAGCTGCAGACCCAGGTTGCCA	950
XylR_seq	951	acctgcgcaaccgcctgaagcagtagcatgggcagtagtattacggcattggc	1000
XylR_base	951	ACCTGCGCAACCGCCTGAAGCAGTACGATGGGCAGTATTACGGCATTGGC	1000
XylR_seq	1001	cattcgccagcctacaagcgcatctgtgagaccatcgacaaggctgcacg	1050
XylR_base	1001	CATTCGCCAGCCTACAAGCGCATCTGTGAGACCATCGACAAGGCTGCACG	1050
XylR_seq	1051	cggcagggtttcggtcctgctactgggtgagactggggtgggcaaggagg	1100
XylR_base	1051	CGGCAGGGTTTCGGTCCTGCTACTGGGTGAGACTGGGGTGGGCAAGGAGG	1100
XylR_seq	1101	taatcgcgcgagcgtgcatttgcgagtgagcgcgagagcaacccttc	1150
XylR_base	1101	TAATCGCGCGAGCGTGCAATTTGCGCAGTGAGCGCGAGAGCAACCCTTC	1150

XylR_seq	1151	gtcgcggtgaactgtgcggcaattccgccgatctgatcgagtcggaact	1200
XylR_base	1151	GTCGCGGTGAACTGTGCGGCAATTCCGCCGATCTGATCGAGTCGGAAC	1200
XylR_seq	1201	gtttggtgtcgataaggcgccctatacggcgcggtcaatgcangnnng	1250
XylR_base	1201	GTTTGGTGTGATAAGGGCGCCTATACGGGCGCGGTCAATGCACGCGCTG	1250
XylR_seq	1251	gncgttttgaacgggccaacggcgccaccatctttcttgatgaggtgatc	1300
XylR_base	1251	GACGTTTTGAACGGGCCAACGGCGGCACCATCTTCTTGATGAGGTGATC	1300
XylR_seq	1301	gaattgacgccgagggccaggccaccctgctacgggtattgcaggaagg	1350
XylR_base	1301	GAATTGACGCCGAGGGCCCAGGCCACCCTGCTACGGGTATTGCAGGAAGG	1350
XylR_seq	1351	agagctagagcgggtcggcggcgaccgcacgcgaaaggtcgacgtgaggt	1400
XylR_base	1351	AGAGCTAGAGCGGGTCGGCGGCGACCGCACGCGAAAGGTCGACGTGAGGT	1400
XylR_seq	1401	taatcaccgcaacaaacgagaacctggaagaggcgggtcaagatggggcgc	1450
XylR_base	1401	TAATCACC GCAACAAACGAGAACCTGGAAGAGGCGGTCAAGATGGGGCGC	1450
XylR_seq	1451	tttcgcgacagacctgttctttcggtgaatgtttttcccgatcatatccc	1500
XylR_base	1451	TTTCGCGCAGACCTGTTCTTTCGGCTGAATGTTTTCCCGTGCATATCCC	1500
XylR_seq	1501	gccgttgcgcgagcgcggtggaagatatcccgctgctggctcgagcattttc	1550
XylR_base	1501	GCCGTTGCGGAGCGCGTGGAAGATATCCCGCTGCTGGTCGAGCATTTTC	1550
XylR_seq	1551	ttagaaggcaccataaggaatacggtaagaagactcttggcctgtctgat	1600
XylR_base	1551	TTAGAAGGCACCATAAGGAATACGGTAAGAAGACTCTTGGCCTGTCTGAT	1600
XylR_seq	1601	cgagcgatggaggcctgcctccactaccaatggccaggcaatatccgcga	1650

XylR_base	1601	CGAGCGATGGAGGCCTGCCTCCACTACCAATGGCCAGGCAATATCCGCGA	1650
XylR_seq	1651	gctggagaacgcccttgagcgcggggtgattcttaccgagagcaacgaaa	1700
XylR_base	1651	GCTGGAGAACGCCCTTGAGCGCGGGGTGATTCTTACCGAGAGCAACGAAA	1700
XylR_seq	1701	gcatcaatgtcgagtcgctgttcccggggtggcgacggctaccgaaggc	1750
XylR_base	1701	GCATCAATGTCGAGTCGCTGTTCCCGGGGTGGCGACGGCTACCGAAGGC	1750
XylR_seq	1751	gacaggctatcgagcgagggccggttgaggaggagtcggtgacagttg	1800
XylR_base	1751	GACAGGCTATCGAGCGAGGGCCGTTGGAGGAGGAGTCCGGTGACAGTTG	1800
XylR_seq	1801	gtttaggcaaattatcgaccaggcgctcagcctcgaagatctcgaagcgg	1850
XylR_base	1801	GTTTAGGCAAATTATCGACCAGGGCGTCAGCCTCGAAGATCTCGAAGCGG	1850
XylR_seq	1851	gtttaatgcgcacggccatggaccgttggtgggcagaatatctcacaggcg	1900
XylR_base	1851	GTTTAATGCGCACGGCCATGGACCGTTGTGGGCAGAATATCTCACAGGCG	1900
XylR_seq	1901	gcgcggttgctgggattgacccgcccggcaatggcctatcgacttaagaa	1950
XylR_base	1901	GCGCGGTTGCTGGGATTGACCCGCCCGCAATGGCCTATCGACTTAAGAA	1950
XylR_seq	1951	gcttgacccagcttatctgtgaaagcaatgggccgatagctgctttgcg	2000
XylR_base	1951	GCTTGACCCCAGCTTATCTGTGAAAGCAATGGGCCGATAGCTGCTTTGCG	2000
XylR_seq	2001	ccaggtttgggcctttctaaggtccttcgcggttctggggaaagagcga	2050
XylR_base	2001	CCAGGTTTGGGCCTTCTAAGTCTTCGCGGATTCTGGGGAAAGAGCGA	2050
XylR_seq	2051	gttggcaggcaggggagtgggtaaattggcagtcgctcaggatcccaa	2098
		.	
XylR_base	2051	GTTGACAGGCAGGGGAGTGGGTAAATTGGCAGTCGCTCAACATCCCAA	2098

Comparação das curvas de crescimento de diferentes cepas de *Pseudomonas putida*

Apesar das mutações verificadas pelo sequenciamento do gene *xyIR*, a cepa V. Lorenzo apresentou crescimento em meio mínimo suplementado com vapor de xileno (Figura 24).

Figura 24: Curva de crescimento de diferentes cepas de *P. putida* Mt-2

Como todas as cepas apresentaram crescimento e tais mutações também foram descritas para um biossensor funcional¹³³, não existem motivos para argumentar que a mutação encontrada em *xyIR* interfira na sua atividade.

4.3 Montagem do biossensor

Para a obtenção dos biossensores foi utilizada a amplificação da ligação dos fragmentos Pu e *phoA* extraídos de pGem T Easy por enzimas de restrição. O amplificado Pu+*phoA* é clonado em pGem T Easy, é extraído por enzimas de restrição e o fragmento gerado clonado em pKK232-8. O plasmídeo pKK232-8(Pu+*phoA*) é aberto na extremidade de *phoA*, recebendo o gene *xyIR* e concluindo assim a montagem do plasmídeo sensor.

Figura 25: Estratégia de produção do biossensor por amplificação da ligação Pu+*phoA*, clonagem em pGem T Easy e posterior digestão, purificação do fragmento Pu+*phoA*, seguida pela clonagem deste no vetor pKK232-8 e posterior inserção de *xylR*. Sítios de restrição: , *HindIII*; , *KpnI*; , *XhoI*; , *BamHI*.

4.3.1 Digestão fragmentos e purificação a partir do gel de agarose

As digestões dos plasmídeos de clonagens resultaram na liberação dos fragmentos que apresentaram o número de pares de base esperado (Figura 26)

Após a eletroforese, as bandas foram cortadas e purificadas apresentando bom rendimento (Figura 27).

4.3.2 Montagem do plasmídeo pKK232-8(Pu202+*phoA*+*xylR*)

PCR de Pu202+*phoA* e posterior clonagem em pGem T Easy

Os fragmentos Pu202 e *phoA* foram ligados e utilizados como molde para reação de PCR, o resultado desta reação encontra-se abaixo. (Figura 28).

O *amplicon* foi ligado à pGem T Easy e clonado em *E. coli* DH10B. Cinco colônias foram cultivadas, seus plasmídeos extraídos e submetidos à digestões para verificar a presença do inserto (Figura 29).

A colônia 4 apresentou o tamanho esperado para as digestões com *KpnI* (vetor linear,

Figura 26: Digestão dos plasmídeos pGem T Easy contendo os fragmentos clonados

Figura 27: Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos purificados a partir da digestão dos plasmídeos de clonagem. M, marcador 1 Kb Fermentas; 1, Pu 202 pb; 2, Pu 378 pb; 3, Pu 702 pb; 4, *phoA* (≈ 1500 pb); 5, *xyI/R* (≈ 2140 pb)

3700pb) e BamHI+HindIII (vetor vazio linear e fragmento clonado, 3000pb e 1700pb respectivamente). Tal colônia foi cultivada em meio líquido e congelada à -70°C .

Figura 28: Eletroforese da reação de PCR usando como molde a ligação de Pu202 e *phoA* e iniciadores Pu202(+) e *phoA*(-) com sítios para XhoI e BamHI. M-Marcador molecular 1Kb Fermentas; C-Controle da Reação; 1-Reação de PCR (Pu202+*phoA* = 1702 pb)

Figura 29: Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão do plasmídeo pGem T Easy(Pu202+*phoA*) oriundo de diferentes colônias. M, Marcador 1Kb Fermentas; Números correspondem às diferentes colônias; K, digestão por KpnI; HB, digestão por HindIII e BamHI. Colônia 4 apresentando o inserto, para K $\approx$ 4500 pb (vetor+[Pu+*phoA*]) e para HB $\approx$ 3000 pb e $\approx$ 1750 pb (vetor e Pu+*phoA* respectivamente)

Purificação do fragmento Pu202+*phoA* e sua inserção no plasmídeo pKK232-8

O plasmídeo pGem T Easy(Pu202+*phoA*) oriundo do cultivo da colônia 4 (Figura 29) foi digerido com BamHI e HindIII liberando Pu202+*phoA*, sendo este purificado a partir do gel (Figura 30).

Figura 30: Resultado da purificação de Pu202+*phoA* oriundo da digestão do plasmídeo pGem T Easy(Pu202-*phoA*). M, Marcador Fermentas 1Kb; 1, Purificação do fragmento digerido com *Hind*III e *Bam*HI de Pu202+*phoA* (≈ 1740 pb).

O fragmento Pu202+*phoA* purificado foi ligado ao plasmídeo pKK232-8 e clonado em *E. coli* DH10B. Uma colônia foi cultivada e teve seu plasmídeo extraído e digerido por diferentes enzimas de restrição para verificar a presença do inserto (Figura 31).

Figura 31: Eletroforese em gel de agarose 1% de digestões do plasmídeo pKK232-8(Pu202+*phoA*). M, marcador molecular 1 Kb Fermentas; XB, amostra digerida por *Xho*I e *Bam*HI ≈ 6700 pb para pKK232-8(Pu+*phoA*); HB, amostra digerida por *Hind*III e *Bam*HI ≈ 5000 pb para pKK232-8 e ≈ 1700 pb para Pu+*phoA*; HK, amostra digerida por *Hind*III e *Kpn*I ≈ 5500 pb para pKK232-8(+*phoA*) e 202 pb para Pu202 (não visível).

Ligação de *xylR* à pKK232-8(Pu202+*phoA*)

Após a digestão com XhoI e BamHI, o plasmídeo pKK232-8(Pu202+*phoA*) foi purificado e ligado à *xylR*, sendo o resultado dessa reação clonado em *E. coli* DH10B. Abaixo encontra-se o resultado da eletroforese da digestão dos plasmídeos extraídos de três colônias diferentes e digeridos com enzimas de restrição (Figura 32).

Figura 32: Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão do plasmídeo pKK232-8(Pu202+*phoA*+*xylR*) isolados de diferentes colônias. Os números correspondem às diferentes colônias; B, amostras digeridas por *Bam*HI; HB, amostras digeridas por *Hind*III e posteriormente por *Bam*HI; M, marcador molecular 1 Kb fermentas. Esperado para digestão *Hind*III e *Bam*HI do pKK232-8(Pu202+*phoA*+*xylR*) $\approx$ 3800 pb (inserto) e $\approx$ 5000 pb (vetor) e para digestão *Bam*HI $\approx$ 8800 pb (vetor+inserto).

De acordo com a eletroforese da digestão o clone 1, este apresenta o padrão de bandas esperado para o plasmídeo pKK232-8(Pu202+*phoA*+*xylR*), sendo esta cepa cultivada e tendo seu plasmídeo extraído. Tal plasmídeo foi utilizado para a transformação de *E. coli* Δ *phoA* sendo duas colônias separadas e cultivadas em LB suplementado com ampicilina. Os resultados de eletroforese e caracterização do plasmídeo estão sendo concluídos, não sendo esperados empecilhos para a continuidade do projeto e consequente teste dessa cultura para atividade de fosfatase alcalina na presença de efetores para *XylR*.

4.3.3 Montagem do plasmídeo pKK232-8(Pu396+*phoA*+*xylR*)

Houveram problemas na amplificação específica da ligação de Pu396 e *phoA*, com isso uma nova abordagem baseada na ligação direta desses fragmentos ao plasmídeo pKK232-8 foi executada (Figura 33).

Figura 33: Estratégia por clonagem direta dos fragmentos Pu e *phoA* no vetor pKK232-8: ligação dos componentes Pu e *phoA* ao plasmídeo pKK232-8 ao mesmo tempo, seguida pela inserção de *xyIR* à jusante de *phoA*. Sítios de restrição: , *Hind*III; , *Kpn*I; , *Xho*I; , *Bam*HI.

Ligação de Pu396 e *phoA* à pKK232-8

A ligação dos fragmentos foi executada a partir do plasmídeo pKK232-8 digerido com *Hind*III e *Bam*HI e dos fragmentos *phoA* e Pu396 digeridos com *Kpn*I e *Bam*HI e com *Hind*III e *Kpn*I respectivamente.

A baixo encontra-se a eletroforese da digestão de dois clones resultantes da transformação de *E. coli* DH10b pela ligação descrita à cima (Figura 34).

O clone 2 de pKK232-8(Pu396+*phoA*) indicou a presença do fragmento desejado, este foi então cultivado e estocado à -80 °C.

Ligação de *xyIR* à pKK232-8(Pu396+*phoA*)

Não houve tempo hábil para a ligação do fragmento *xyIR* ao plasmídeo pKK232-8 (Pu396+*phoA*).

4.3.4 Montagem do plasmídeo pKK232-8(Pu802+*phoA*)

Devido às dificuldades encontradas na amplificação do fragmento Pu802+*phoA* a partir de sua ligação, a dupla ligação dos fragmentos diretamente no plasmídeo pKK232-8 foi vista como uma alternativa viável para construção desse plasmídeos (Figura 33). Abaixo encontra-se o resultado de uma dessas tentativas (Figura 35).

Figura 34: Eletroforese em agarose 0,7% da digestão por *Bam*HI e *Hind*III de dois clones obtidos pela transformação da ligação pKK232-8(Pu396+*pho*A). M, marcador 1 Kb Fermentas; 3P, transformação da ligação de Pu396+*pho*A; números indicam os clones; (HB), digestão por *Hind*III e *Bam*HI. 3P2(HB) indica presença do incerto Pu396+*pho*A ($\approx$ 1900 pb) no plasmídeo pKK232-8 ($\approx$ 5000 pb).

Figura 35: Eletroforese em gel 1% da extração e posterior digestão dos plasmídeos oriundos da dupla ligação, pKK 232-8(Pu396+*pho*A) e pKK 232-8(Pu802+*pho*A). M- Marcador molecular 1 Kb Fermentas; 3P, pKK232-8(Pu396+*pho*A); 8P, pKK232-8(Pu802+*pho*A); 1 e 2, número das colônias; HB, digestão com *Hind*III e *Bam*HI; Esperado para digestão $\approx$ 1900 pb para pKK232-8(Pu396+*pho*A) e $\approx$ 2300 pb para pKK232-8(Pu802+*pho*A) para os respectivos insertos e 5000 pb para o vetor

Nenhum dos clones apresentou perfil de restrição compatível com os plasmídeos pKK232-8 (Pu802+*pho*A). Como foram originadas poucas colônias na placa de seleção, acredita-se que trata-se de uma contaminação oriunda de outro experimento executado no mesmo laboratório.

A troca do promotor Pu (Figura 36) foi outra estratégia utilizada para a obtenção do plas-

mídeo pKK232-8(Pu802+*phoA*). Abaixo encontra-se a purificação do fragmento pKK232-8 (+*phoA*), sem o promotor Pu (Figura 37).

Figura 36: Estratégia de troca do promotor Pu para obtenção do plasmídeo sensor pKK232-8(Pu802+*phoA*). A primeira etapa consiste na retirada do promotor Pu do plasmídeo pKK(Pu202+*phoA*) e purificação do fragmento pKK232-8(+*phoA*). Este é ligado ao promotor Pu802 gerando o plasmídeo pKK232-8(Pu802+*phoA*) que posteriormente recebe *xylR* à jusante de *phoA*. Sítios de restrição: , *HindIII*; , *KpnI*; , *XhoI*; , *BamHI*.

Figura 37: Purificação da digestão do plasmídeo pKK232-8(Pu202+*phoA*) para trocar o promotor Pu. M, marcador molecular 1 Kb Fermentas; 1, pKK232-8(+*phoA*) purificado (≈ 6500 pb)

Este fragmento foi utilizado na ligação com o promotor Pu802, o que originaria o plasmídeo pKK232-8(Pu802+*phoA*). Abaixo encontra-se o resultado da eletroforese da digestão de uma dessas tentativas de ligação e clonagem (Figura 38).

Houve o crescimento de colônias mesmo na amostra que não continha o promotor Pu, o que é pouco provável visto que, com a retirada do promotor Pu202, as pontas não eram coesivas (*HindIII* e *KpnI*). Isto demonstra uma baixa eficiência na digestão de pKK232-8(Pu202+*phoA*), o que é difícil de ser verificada pela eletroforese, pois o fragmento removido é de baixo peso

Figura 38: Eletroforese em ágar 1% dos plasmídeos de colônias resultantes da transformação da ligação entre pKK232-8(+*phoA*) e Pu802. C, colônia oriunda da reação controle (sem Pu); 3P, reação entre pKK232-8(+*phoA*) e Pu396; 8P, reação entre pKK232-8(+*phoA*); números, correspondem à diferentes colônias; (B), digestão por *Bam*HI ; (HB), digestão por *Hind*III e *Bam*HI. Esperado para digestão por *Bam*HI ≈ 6900 pb e ≈ 7300 pb para pKK232-8(Pu396+*phoA*) e pKK232-8(Pu802+*phoA*) respectivamente; Esperado para digestão por *Bam*HI e *Hind*III ≈ 1900 pb e ≈ 2300 pb para os respectivos insertos (Pu+*phoA*) de pKK232-8(Pu396+*phoA*) e pKK232-8(Pu802+*phoA*) e vetor ≈ 5000 pb.

molecular (202 pb) em comparação com o vetor (6500 pb) mudando muito pouco o padrão de corrida da amostra.

A reconstituição do plasmídeo pKK232-8(Pu200+*phoA*) refletiu diretamente no número de colônias analisadas que continham os insertos desejados, zero.

5 Conclusão

Todos os fragmentos foram amplificados e clonados em pGem T Easy e a metodologia de purificação e procedimentos de clonagem encontram-se já definidos. O sucesso na construção do biossensor Pu 202 mostrou que é também possível a obtenção dos demais plasmídeos sensores apesar das dificuldades encontradas.

O biossensor de 396 pb encontra-se em processo final de produção, faltando apenas à inserção do fragmento *xyIR* e a transformação em *E. coli* Δ *phoA*.

O biossensor de 802 pb ainda não foi construído e esbarra na amplificação por PCR do fragmento Pu802+*phoA*, no qual um dos iniciadores (Pu+) encontra-se em uma região de repetição dificultando à amplificação específica. Com isso, assim como em pKK232-8(Pu396+*phoA*), a dupla-ligação de Pu802 e *phoA* ao vetor de expressão pKK232-8 têm sido tentada, entretanto no número de clones obtidos é baixo e como não existem marcas para a seleção do incerto, muitas vezes as colônias são compostas por bactérias que carregam o vetor vazio reconstituído ou contaminações. Outra proposta é a troca do promotor Pu entretanto o fragmento removido é pequeno o que dificulta verificar se a digestão e purificação foram eficientes. A ineficiência da digestão gera ligações com demasiados clones constituídos pelo fechamento do próprio plasmídeo pKK232-8(Pu202+*phoA*).

As mutações encontradas em *xyIR* parecem não influenciar sua atividade, pois também estão presentes em um plasmídeo funcional construído para biossensoriamento¹³³. Segundo a tese de Janizelli¹²⁷ os primeiros 3 biossensores não foram funcionais justamente por essas mutações, contudo mesmo com a utilização desse gene oriundo de outra cepa o biossensor continuou não funcional. Dessa forma não há embasamento para que tais mutações sejam deletérias à atividade dessa proteína reguladora.

Com os componentes clonados e as metodologias de sua purificação já padronizadas, a construção dos biossensores que faltam (Pu396 e Pu802) torna-se mais simples. No caso de Pu802 onde ainda não foi possível a produção do plasmídeo pKK232-8(Pu802+*phoA*), os problemas encontrados estão sendo atacados por diferentes estratégias (clonagem direta, troca do promotor

Pu do plasmídeo pKK232-8(Pu+*phoA*) e além disso, a introdução de uma purificação prévia dos fragmentos ligados Pu+*phoA* anterior à clonagem ou amplificação por PCR também será tentada. Enquanto isso, serão executados os testes de indução do biossensor Pu202 para verificar se este segue o mesmo comportamento do biossensor criado por Janizelli¹²⁷.

*Referências**

- 1 HEATH, J. S.; KOBLIS, K.; SAGER, S. L. Review of chemical, physical, and toxicologic properties of components of total petroleum hydrocarbons. **Journal of Soil Contamination**, v. 2, n. 1, p. 1–25, 1993.
- 2 BURLAGE, R. S.; HOOPER, S. W.; SAYLER, G. S. The TOL (pww0) catabolic plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1323–1328, 1989.
- 3 WOSTENA, M. Eubacterial sigma-factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 127 – 150, 1998.
- 4 KIM, M. N. et al. Construction and comparison of Escherichia coli whole-cell biosensors capable of detecting aromatic compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, n. 2, p. 235–245, 2005.
- 5 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **O que significa o número de 727 áreas contaminadas identificadas?** São Paulo, 2008.
- 6 KALDALU, N. et al. Functional domains of the TOL plasmid transcription factor XylS. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 4, p. 1118–1126, 2000.
- 7 WILLARDSON, B. M. et al. Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, p. 1006–1012, 1998.
- 8 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução numero 397. **Diario Oficial da União**, Brasília, DF, v. 66, 2008.
- 9 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução numero 396. **Diario Oficial da União**, v. 66, 2008.
- 10 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução numero 393. **Diario Oficial da União**, v. 153, 2007.

- 11 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução numero 357. **Diario Oficial da União**, mar. 2005.
- 12 US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **A Review of Emerging Sensor Technologies for Facilitating Long-Term Ground Water Monitoring of Volatile Organic Compounds**. [S.l.].
- 13 REED, P. M.; MINSKER, B. S. Striking the balance: Long-term groundwater monitoring design for conflicting objectives. **Journal of Water Resources Plannig and Management**, v. 130, n. 2, p. 140–149, 2004.
- 14 HO, C. K. et al. **Review of chemical sensor for In-Situ monitoring of volatile contaminants**. Albuquerque, New Mexico 87185 and Livermore, California 94550, 2001.
- 15 D’SOUZA, S. F. Microbial biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 6, p. 337–353, 2001.
- 16 VAMVAKAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A. Pesticide detection with a liposome-based nano-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 2848–2853, 2007.
- 17 PAITAN, Y. et al. Monitoring aromatic hydrocarbons by whole cell electrochemical biosensors. **Analytical Biochemistry**, v. 335, n. 2, p. 175–183, 2004.
- 18 IKENO, S. et al. Detection of benzene derivatives by recombinant E. coli with Ps promoter and GFP as a reporter protein. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, n. 3, p. 193–197, 2002.
- 19 TAURIAINEN, S. et al. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, n. 9, p. 931–938, October 1998.
- 20 DOLLARD, M.-A.; BILLARD, P. Whole-cell bacterial sensors for the monitoring of phosphate bioavailability. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 1, p. 221–229, October 2003.
- 21 XU, G. et al. Cell-based biosensors based on light-addressable potentiometric sensors for single cell monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 9, p. 1757–1763, 2005.
- 22 O’SHAUGHNESSY, T. J.; GRAY, S. A.; PANCRAZIO, J. J. Cultured neuronal networks as environmental biosensors. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 5, p. 379 – 385, 2004.

- 23 ALONSO, S. et al. Construction of a bacterial biosensor for styrene. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 301–306, 2003.
- 24 CORBISIARA, P. et al. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 387, n. 3, p. 235–244, 1999.
- 25 HANSENA, L. H.; SORENSENA, S. J. Versatile biosensor vectors for detection and quantification of mercury. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, n. 1, p. 123 – 127, 2006.
- 26 PRASHER, D. C. et al. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. **Gene**, v. 111, n. 2, p. 229–233, 1992.
- 27 CEBOLLA, A.; VAZQUEZ, M. E.; PALOMARES, A. J. Expression vectors for the use of eukaryotic luciferases as bacterial markers with different colors of luminescence. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 2, p. 660–668, 1995.
- 28 MEIGHEN, E. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. **The FASEB Journal**, v. 7, p. 1016–1022, 1993.
- 29 WALLENFEIS, K.; WEIL, R. **Enzymes**. New York: Academic Press, 1972. 617-663. p.
- 30 PISANI, F. M. et al. Thermostable β -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* purification and properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 321 – 328, 1990.
- 31 MORACCI, M. et al. Expression of the thermostable beta-galactosidase gene from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of a new inducible promoter for heterologous expression. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 3, p. 873–882, 1992.
- 32 MAHAMY, M.; HORECKER, B. The localization of alkaline phosphatase in *E. coli* k12. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 5, p. 104–108., 1961.
- 33 LORENZO, V. de; PÉREZ-MARTÍN, J. Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 1177 – 1184, 1996.
- 34 BAGGI, G. et al. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 9, p. 2129–2132, 1987.

- 35 ADEBUSOYE, S. A. et al. Characterization of multiple novel aerobic polychlorinated biphenyl (pcb)-utilizing bacterial strains indigenous to contaminated tropical african soils. **Biodegradation**, v. 19, n. 1, p. 145–159, 2007.
- 36 WOOLFOLK, C. A. Metabolism of n-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. **J. Bacteriol.**, v. 123, n. 3, p. 1088–1106, 1975.
- 37 DAS, K.; MUKHERJEE, A. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 195–203(9), 2007.
- 38 RAVATN, R.; ZEHNDER, A. J. B.; MEER, J. R. van der. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 6, p. 2126–2132, 1998.
- 39 NISHI, A.; TOMINAGA, K.; FURUKAWA, K. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 1949–1955, 2000.
- 40 FRANCIS, A. J. et al. Metabolism of DDT analogues by a *Pseudomonas* sp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 32, n. 2, p. 213–216, 1976.
- 41 DUNN, N. W.; GUNSALUS, I. C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. **J. Bacteriol.**, v. 114, n. 3, p. 974–979, 1973.
- 42 CHAKRABARTY, A. M.; CHOU, G.; GUNSALUS, I. C. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in pseudomonas. **PNAS**, v. 70, n. 4, p. 1137–1140, 1973.
- 43 RHEINWALD, J. G.; CHAKRABARTY, A. M.; GUNSALUS, I. C. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. **PNAS**, v. 70, n. 3, p. 885–889, 1973.
- 44 WILLIAMS, P. A.; MURRAY, K. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) Mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. **J. Bacteriol.**, v. 120, n. 1, p. 416–423, 1974.
- 45 ROTHMEL, R. K. et al. Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida* catR: a positive regulator of the catBC operon is a member of the LysR family. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 2, p. 922–931, 1990.

- 46 SHINGLER, V. et al. Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 1083–1092, 1989.
- 47 AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **INTERACTION PROFILE FOR: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes - BTEX**. Washington, D.C., Maio 2004.
- 48 US ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. **Risk assessment guidance for Superfund, Volume I**. Washington, D.C., 1989.
- 49 VAN DER MEER, J. R. et al. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 56, n. 4, p. 677–694, 1992.
- 50 RAMOS, J.; MARQUÉS, S.; TIMMIS, K. Transcriptional control of the pseudomonas tol plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 51, p. 341–373, 1997.
- 51 GREATER, A. et al. Complete sequence of the incp-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. **Environmental microbiology**, v. 4, n. 12, p. 856–871, 2002.
- 52 ASSINDER, S. J.; WILLIAMS, P. A. Comparison of the meta pathway operons on NAH plasmid pWW60-22 and TOL plasmid pWW53-4 and its evolutionary significance. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 2769–2778, 1988.
- 53 SHINGLER, V.; POWLOWSKI, J.; MARKLUND, U. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. **Journal Bacteriology**, v. 174, n. 3, p. 711–724, 1992.
- 54 ALDRICH, T. et al. Cloning and complete nucleotide sequence determination of the catB gene encoding cis,cis-muconate lactonizing enzyme. **Gene**, v. 52, n. 2-3, p. 185–95, 1987.
- 55 HUGHES, E. J. et al. Cloning and expression of PCA genes from *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 2877–2887, 1988.
- 56 DOTEN, R. C. et al. Cloning and genetic organization of the PCA gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 7, p. 3168–3174, 1987.
- 57 CHATTERJEE, D. K.; CHAKRABARTY, A. M. Genetic homology between independently isolated chlorobenzoate-degradative plasmids. **Journal Bacteriology**, v. 153, n. 1, p. 532–534, 1983.

- 58 DON, R. H.; PEMBERTON, J. M. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. **Journal Bacteriology**, v. 145, n. 2, p. 681–686, 1981.
- 59 HAIGLER, B. E.; NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C. Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, n. 2, p. 294–301, 1988.
- 60 BENSON, S.; SHAPIRO, J. TOL is a broad-host-range plasmid. **J. Bacteriol.**, v. 135, n. 1, p. 278–280, 1978.
- 61 SARAND, I. et al. Effect of inoculation of a TOL plasmid containing mycorrhizosphere bacterium on development of scots pine seedlings, their mycorrhizosphere and the microbial flora in m-toluate-amended soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, n. 2, p. 127–141, 2006.
- 62 TSUDA, M.; IINO, T. Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL plasmid pWW0. **Molecular & General Genetics**, v. 210, n. 2, p. 270–276, 1987.
- 63 CLARKE, P. H.; LAVERACK, P. D. Growth characteristics of *Pseudomonas* strains carrying catabolic plasmids and their cured derivatives. **FEMS Microbiology Letters**, v. 24, n. 1, p. 109–112, 2006.
- 64 HAGEDORN, S. R.; MAXWELL, P. C. Microsial transformations of toluene to commodity chemicals. In: **Microbial Metabolism and the Carbon Cycle**. Newark, New Jersey: Harwood Academic Publishers, 1988.
- 65 HUGHES, E. J.; BAYLY, R. C.; SKURRAY, R. A. Evidence for isofunctional enzymes in the degradation of phenol, m- and p-toluate, and p-cresol via catechol meta-cleavage pathways in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal Bacteriology**, v. 158, n. 1, p. 79–83, 1984.
- 66 CRUDEN, D. L. et al. Physiological properties of a pseudomonas strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 9, p. 2723–2729, 1992.
- 67 BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. W. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 57–65, 2004.
- 68 TRAVERS, A. A.; BURGESS, R. R. Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. **Nature**, v. 222, p. 537–540, 1969.
- 69 RECORD, M. T. et al. **Escherichia coli and Salmonella**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1996.

- 70 HARLEY, C. B.; REYNOLDS, R. P. Analysis of E.coli pormoter sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 5, p. 2343–2361, 1987.
- 71 CASES, I.; LORENZO, V. de. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 105–118, 2005.
- 72 ESPINOSA-URGEL, M.; CHAMIZO, C.; TORMO, A. A consensus structure for sigma s-dependent promoters. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 657–659., 1996.
- 73 HELMANN, J. D. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 2875 – 2882, 1991.
- 74 GROSS, C. **Escherichia coli and Salmonella**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1996.
- 75 MERRICK, M. J. In a class of its own — the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 903 – 909, 1993.
- 76 MERRICK, M.; GIBBINS, J.; TOUKDARIAN, A. The nucleotide sequence of the sigma factor gene ntrA (rpoN) of Azotobacter vinelandii: Analysis of conserved sequences in NtrA. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 210, n. 2, p. 1432–1874, 1987.
- 77 SASSE-DWIGHT, S.; GRALIA, J. D. Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor sigma 54. **Cell**, v. 62, n. 5, p. 945–954, 1990.
- 78 MORETT, E.; SEGOVIA, L. The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 19, p. 6067–6074, 1993.
- 79 CASES, I.; LORENZO, V. de; PEREZ-MARTÍN, J. Involvement of sigma 54 in exponential silencing of the Pseudomonas putida TOL plasmid Pu promoter. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 7–17, 1996.
- 80 JURADO, P.; FERNANDEZ, L. A.; LORENZO, V. de. Sigma 54 levels and physiological control of the Pseudomonas putida Pu promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 11, p. 3379–3383, 2003.
- 81 LAURIE, A. D. et al. The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma n competition for core RNA polymerase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 3, p. 1494–1503, 2003.

- 82 CARMONA, M. et al. In vivo and in vitro effects of (p)ppGpp on the sigma 54 promoter Pu of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 4711–4718, 2000.
- 83 BOSE, D. et al. Dissecting the ATP hydrolysis pathway of bacterial enhancer-binding proteins. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 83–88, 2008.
- 84 PEREZ-MARTIN, J.; LORENZO, V. de. In vitro activities of an N-terminal truncated form of XylR, a sigma 54 dependent transcriptional activator of *Pseudomonas putida*. **Journal of Molecular Biology**, v. 258, n. 4, p. 575–587, 1996.
- 85 PEREZ-MARTIN, J.; LORENZO, V. de. ATP binding to the sigma 54 dependent activator XylR triggers a protein multimerization cycle catalyzed by UAS DNA. **Cell**, v. 86, n. 2, p. 331–339, 1996.
- 86 RAPPAS, M.; BOSEA, D.; ZHANGA, X. Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking σ^{54} -dependent gene transcription. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 1, p. 110–116, 2007.
- 87 RAPPAS, M. et al. Structural basis of the nucleotide driven conformational changes in the AAA+ domain of transcription activator PspF. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 2, p. 481–492, 2006.
- 88 BUCK, M.; CANNON, W. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter may involve DNA loop formation. **Molecular Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 243–249, 1987.
- 89 PEREZ-MARTIN, J.; LORENZO, V. de. The sigma 54-dependent promoter Ps of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* requires HU for transcriptional activation in vivo by XylR. **Journal Bacteriology**, v. 177, n. 13, p. 3758–3763, 1995.
- 90 SEONG, G. H. et al. Direct atomic force microscopy visualization of integration host factor-induced DNA bending structure of the promoter regulatory region on the *Pseudomonas* TOL plasmid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, n. 2, p. 361–366, 2002.
- 91 CARMONA, M.; LORENZO, V. de; BERTONI, G. Recruitment of RNA polymerase is a rate-limiting step for the activation of the sigma 54 promoter Pu of *Pseudomonas putida*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 47, p. 33790–33794, 1999.

- 92 HUO, Y.-X. et al. Protein-induced DNA bending clarifies the architectural organization of the sigma 54 dependent glnAp2 promoter. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 168–180, 2006.
- 93 SHINGLER, V. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 409–416, 2003.
- 94 DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of ntrC and nifA from *Klebsiella pneumoniae*: homologues to other regulatory proteins. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 2, p. 441–447, 1986.
- 95 NORTH, A. K. et al. Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 14, p. 4267–4273, 1993.
- 96 FERNANDEZ, S.; LORENZO, V. de; PEREZ-MARTIN, J. Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 205–213, 1995.
- 97 PEREZ-MARTIN, J.; LORENZO, V. D. The amino-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor. **PNAS**, v. 92, n. 20, p. 9392–9396, 1995.
- 98 SHINGLER, V.; MOORE, T. Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing *Pseudomonas* sp. strain CF600. **Journal Bacteriology**, v. 176, n. 6, p. 1555–1560, 1994.
- 99 BANTSCHIEFF, M.; WEISS, V.; GLOCKER, M. O. Identification of linker regions and domain borders of the transcription activator protein NtrC from *Escherichia coli* by limited proteolysis, in-gel digestion, and mass spectrometry. **Biochemistry**, v. 38, n. 34, p. 11012–11020, 1999.
- 100 GARMENDIA, J.; LORENZO, V. de. The role of the interdomain B linker in the activation of the XylR protein of *Pseudomonas putida*. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 401–410, 2000.
- 101 INOUE, S.; NAKAZAWA, A.; NAKAZAWA, T. Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene xylR for xyl operons on the tol plasmid. **Journal Bacteriology**, v. 163, n. 3, p. 863–869, 1985.

- 102 DUETZ, W. A. et al. Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control. **Journal Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2354–2361, 1994.
- 103 MARQUES, S. et al. Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* for metabolism of aromatics. **Journal Bacteriology**, v. 176, n. 9, p. 2517–2524, 1994.
- 104 DIXON, R. The xylABC promoter from the *Pseudomonas putida* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. **Molecular and General Genetics**, v. 203, p. 129–136, 1986.
- 105 INOUE, S. et al. Upstream regulatory sequence for transcriptional activator XylR in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid. **Journal of Molecular Biology**, v. 216, n. 2, p. 251–260, 1990.
- 106 INOUE, S.; NAKAZAWA, A.; NAKAZAWA, T. Expression of the regulatory gene xylS on the TOL plasmid is positively controlled by the xylR gene product. **PNAS**, v. 84, n. 15, p. 5182–5186, 1987.
- 107 BERTONI, G.; MARQUÉS, S.; LORENZO, V. de. Activation of the toluene-responsive regulator XylR causes a transcriptional switch between sigma 54 and sigma 70 promoters at the divergent Pr/Ps region of the TOL plasmid. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 651–659, 1998.
- 108 LORENZO, V. de et al. An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent Pu promoter of TOL plasmid. **EMBO**, v. 10, n. 5, p. 1159–1167, 1991.
- 109 HOLTEL, A. et al. Promoter-upstream activator sequences are required for expression of the xylS gene and upper-pathway operon on the *Pseudomonas* TOL plasmid. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1551–1556, 1990.
- 110 ABRIL, M. A.; BUCK, M.; RAMOS, J. L. Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 24, p. 15832–15838, 1991.
- 111 VALLS, M.; BUCKLE, M.; LORENZO, V. de. In vivo uv laser footprinting of the *Pseudomonas putida* sigma 54 Pu promoter reveals that integration host factor couples transcriptional activity to growth phase. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 3, p. 2169–2175, 2002.

- 112 VELAZQUEZ, F.; FERNANDEZ, S.; LORENZO, V. de. The upstream-activating sequences of the sigma-54 promoter Pu of *Pseudomonas putida* filter transcription readthrough from upstream genes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 17, p. 11940–11948, 2006.
- 113 RAMOS, J. L. et al. Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid xylS mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. **PNAS**, v. 83, n. 22, p. 8467–8471, 1986.
- 114 TOBES, R.; RAMOS, J. L. AraC-XylS database: a family of positive transcriptional regulators in bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 318–321, 2002.
- 115 RUIZ, R.; MARQUÉS, S.; RAMOS, J. L. Leucines 193 and 194 at the N-terminal domain of the XylS protein, the positive transcriptional regulator of the TOL meta-cleavage pathway, are involved in dimerization. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3036–3041, 2003.
- 116 HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. et al. Growth-phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0 catabolic genes. **Journal Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6651–6660, 1990.
- 117 LORENZO, V. de et al. Early and late responses of TOL promoters to pathway inducers: identification of postexponential promoters in *Pseudomonas putida* with lacZ-tet bicistronic reporters. **Journal Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6902–6907, 1993.
- 118 HOLTEL, A. et al. Carbon source-dependent inhibition of xyl operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. **Journal Bacteriology**, v. 176, n. 6, p. 1773–1776, 1994.
- 119 VELAZQUEZ, F.; BARTOLO, I. di; LORENZO, V. de. Genetic evidence that catabolites of the Entner-Doudoroff pathway signal C source repression of the sigma 54 Pu promoter of *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 24, p. 8267–8275, 2004.
- 120 DUETZ, W. A. et al. Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 601–606, 1996.
- 121 ARANDA-OLMEDO, I. et al. Role of the ptsN gene product in catabolite repression of the *Pseudomonas putida* TOL toluene degradation pathway in chemostat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7418–7421, 2006.

- 122 CASES, I.; PEREZ-MARTIN, J.; LORENZO, V. de. The IANtr (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma 54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 22, p. 15562–15568, 1999.
- 123 ROJO, F.; DINAMARCA, A. **Catabolic repression and physiological control**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004.
- 124 RESCALLI, E. et al. Novel physiological modulation of the Pu promoter of TOL plasmid: Negative regulatory role of the TurA protein of *Pseudomonas putida* in the response to suboptimal growth temperatures. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 9, p. 7777–7784, 2004.
- 125 SCHUPP, J. M.; KEIM., P. Resultados não publicados.
- 126 PARK, S. M. et al. A new variant activator involved in the degradation of phenolic compounds from a strain of *Pseudomonas putida*. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 227–236, 2003.
- 127 JANIZELLI, A. M. A. **Construção de biossensor para a detecção de hidrocarboneto aromático em água utilizando o gene repórter phoA**. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade - Universidade de São Paulo, 2006.
- 128 MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics**. Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press, 1992.
- 129 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- 130 TORRIANI, A. Influence of inorganic phosphate in formation of phosphatases by *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 38, p. 460–469, 1960.
- 131 LEDDY, M. B.; PHIPPS, D. W.; RIDGWAY, H. F. Catabolite-mediated mutations in alternate toluene degradative pathways in *Pseudomonas putida*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 16, p. 4713–4720, 1995.
- 132 PROMEGA. **pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042**. Madison, Wisconsin, 2009.
- 133 HUANG, W. E. et al. Characterizing the regulation of the Pu promoter in *Acinetobacter baylyi* ADP1. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1668–1680, 2008.

134 PROMEGA. **Catalog**. Madison, Wisconsin, 2008–2009.