FELIPE ALMEIDA DA SILVA

Avaliação da estabilidade genética conferida pelo lócus *parB* e força de expressão dos promotores deste sistema gênico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2013

FELIPE ALMEIDA DA SILVA

Avaliação da estabilidade genética conferida pelo lócus *parB* e força de expressão dos promotores deste sistema gênico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profª. Drª. Elisabete José Vicente

Co-orientador: Dr. Ronaldo Biondo

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Silva, Felipe Almeida da.
Avaliação da estabilidade genética conferida pelo lócus parB e força de expressão dos promotores deste sistema gênico / Felipe Almeida da Silva. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Elisabete Jose Vicente.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Estabilidade genética plasmidial e força de expressão de promotores.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the genetic stability conferred by the parB locus and the expression strength of the promoters from genic system.

1. *Cupriavidus metallidurans* 2. *Cupriavidus necator* 3. Citometria de fluxo 4. Microscopia de fluorescência 5. Força de promotor bacteriano 6. Estabilidade genética plasmidial I. Vicente, Profa. Dra. Elisabete Jose II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0190/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Felipe Almeida da Silva.

Título da Dissertação: Avaliação da estabilidade genética conferida pelo lócus parB e força de expressão dos promotores deste sistema gênico.

Orientador(a): Profa. Dra. Elisabete Jose Vicente.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: ……
Nome: ……
Instituição: ……

Examinador(a): Assinatura: ……
Nome: ……
Instituição: ……

Presidente: Assinatura: ……
Nome: ……
Instituição: ……

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **529/12** referente ao projeto intitulado: "*Avaliação da força de expressão dos promotores do sistema de estabilidade genética hok/sok e inserção em OGMs*" sob a responsabilidade de **Felipe Almeida da Silva,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 13 de junho de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, amigos e
namorada pela dedicação,
incentivo e apoio constante para
a minha formação.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Carlos Roberto Pereira da Silva e Wilma Aparecida de Almeida da Silva e irmão Bruno Almeida da Silva, pelo amor incondicional e apoio nos momentos mais difíceis.

À minha namorada, Pâmela Rodrigues Miranda, por estar sempre ao meu lado com palavras de incentivo, doçura e muito amor.

À todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, Bruno Oishi, Tais Kuniyoshi, Jéssica Fuentes, Karina Hornink, Bruno Moda, Raplh Gomes, Cecília Carvalho e Igor Peñarubia pelo apoio nos momentos de dificuldade, risadas (muitas), festas, almoços e jantares.

Aos demais amigos pós-graduandos que fizeram parte dessa jornada, Carla Montanari e Diogo Robl.

Às professoras Elisabete José Vicente e Ana Clara Guerrini Schenberg pelo exemplo de pessoas apaixonadas pela ciência e com espírito inovador.

À Ronaldo Biondo, pelo seu apoio, puxões de orelha e palavras de incentivo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

"Vigie seus pensamentos, eles tornam-se palavras;

Vigie suas palavras, elas tornam-se ações;

Vigie suas ações, elas tornam-se hábitos;

Vigie seus hábitos, eles formam seu caráter;

Vigie seu caráter, ele se torna seu destino."

Frank Outlaw

RESUMO

SILVA, F. A **Avaliação da estabilidade genética conferida pelo lócus *parB* e força de expressão dos promotores deste sistema.** 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Em processos biotecnológicos, a estabilização de construções genéticas em bactérias é de fundamental importância. Para tanto, no presente trabalho, se analisou o efeito de estabilização plasmidial promovido pelo lócus *parB (hok/sok*) nas bactérias *Escherichia coli*, *Cupriavidus metallidurans* e *Cupriavidus necator* portadoras dos plasmídeos pCM2, pBBR1MCS e seus respectivos derivados contendo o lócus *parB*, pCM3 e pBBPAR. As bactérias portadoras do plasmídeo pCM2 exibiram acentuada perda segregacional do plasmídeo após 50 gerações, enquanto que, as bactérias portadoras dos plasmídeos pCM3 e pBBPAR exibiram alta estabilidade segregacional, mesmo após 100 gerações. Também, foi avaliada a força de expressão da proteína verde fluorescente (*EGFP*) pelos dos promotores p*hok* e p*sok,* presentes no lócus *parB,*. Utilizando da técnica de microscopia de fluorescência, foi observado que os promotores p*sok* e p*hok* expressaram o gene *EGFP* em intensidades diferentes em cada bactéria avaliada. Por meio de citometria de fluxo, foi observado que o promotor p*hok* apresentou maior força de expressão do gene *EGFP* nas bactérias *E. coli e C. metalliduras* que o promotor p*sok,* e este mostrou ser o promotor mais forte em *C. necator*.

Palavras-chave: *Cupriavidus metallidurans*. *Cupriavidus necator*. Estabilidade genética plasmidial. Força de promotor bacteriano. Microscopia de flurescência. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

SILVA, F. A. **Evaluation of the genetic stability conferred by the *parB* locus and the expression strength of the promoters from this genic system.** 2013. 80 p. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

In biotechnological processes, stabilization of genetic constructs in bacteria is of fundamental importance. Therefore, in this study, we analyzed the effect of plasmid stabilization promoted by *parB (hok/sok)* locus in *Escherichia coli*, *Cupriavidus metallidurans* e *Cupriavidus necator* carrying the plasmids pBBR1MCS and pCM2 and their derivatives containing the *parB* locus, pBBPAR and pCM3. Bacteria carrying the plasmid pCM2 showed a marked segregational loss after 50 generations, while the bacteria carrying the plasmids pCM3 and pBBPAR exhibited high segregational stability even after 100 generations. Also, we evaluated the strength of expression of green fluorescent protein (EGFP) by the promoters p*hok* and p*sok* present in locus *parB*. Using the technique of fluorescence microscopy, it was observed that the promoters p*sok* and p*hok* expressed EGFP at different intensities in each bacterium evaluated. By means of flow cytometry, it was observed that the promoter p*hok* showed a higher strength of expression of EGFP gene in the bacteria *E. coli* and *C. metallidurans* than p*sok*, and the latter proved to be the strongest promoter in *C. necator*.

Keywords: *Cupriavidus metallidurans*. *Cupriavidus necator*. Genetic stability of plasmid. Bacterial promoter strength. Fluorescence microscopy. Flow cytometry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – SISTEMA TA DE TIPO I. 19
FIGURA 2 - SISTEMA TA DE TIPO II. 20
FIGURA 3 - SISTEMA TA DE TIPO III. 20
FIGURA 4 - SISTEMA TA DE TIPO IV. 21
FIGURA 5 - SISTEMAS TA DE TIPO V. 22
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FUNCIONAMENTO DO *LOCUS* HOK/SOK 23
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODO DE ATUAÇÃO DO SISTEMA *HOK/SOK*24
FIGURA 8 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PLASMÍDEO PBBR1MCS 32
FIGURA 9 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PLASMÍDEO PBBPAR 32
FIGURA 10 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PLASMÍDEO PCM2.....33
FIGURA 11 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PLASMÍDEOS PCM3 33
FIGURA 12 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PLASMÍDEO PBB-EGFP.....34
FIGURA 13 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PLASMÍDEOS PBB-LACEGFP 34
FIGURA 14 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PLASMÍDEO PGEM-T EASY 35
FIGURA 15 – MAPA DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO ESTUDO DE ESTABILIDADE PLASMIDIAL 44
FIGURA 16 - ESTABILIDADE PLASMIDIAL SEGREGACIONAL DOS TRANSFORMANTES DE *E. COLI* 46
FIGURA 17 - ESTABILIDADE PLASMIDIAL SEGREGACIONAL DOS TRANSFORMANTES DE *C. METALLIDURANS* 48
FIGURA 18 - ESTABILIDADE PLASMIDIAL SEGREGACIONAL DOS TRANSFORMANTES DE *C. NECATOR* 49
FIGURA 19 - SEQUÊNCIA DO LÓCUS *PARB* DO PLASMÍDEO R1 DE *E. COLI*.....50
FIGURA 20- PERFIL DE MIGRAÇÃO DO FRAGMENTO DE PCR DO PROMOTOR P*HOK* APÓS ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8 % CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO 51
FIGURA 21 - PERFIL DE MIGRAÇÃO DO FRAGMENTO DE PCR DO PROMOTOR P*SOK* APÓS ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8 % CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO 51
FIGURA 22 – ORGANIZAÇÃO GÊNICA DE *HOK/SOK* E ESTRATÉGIA DE AMPLIFICAÇÃO DOS PROMOTORES P*HOK* E P*SOK*.....51
FIGURA 23 - PERFIS DE MIGRAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA REFERENTES AOS PROMOTORES P*HOK* E P*SOK* AMPLIFICADOS POR PCR E CLONADOS NO VETOR PGEM-T

EASY APÓS ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8 % CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO 52
FIGURA 24 - PERFIL DE MIGRAÇÃO DO FRAGMENTO DE DNA LINEARIZADO DO PLASMÍDEO PGEMPHOK (A) E SEU MAPA (B) 53
FIGURA 25 - PERFIL DE MIGRAÇÃO DO FRAGMENTO DE DNA LINEARIZADO DO PLASMÍDEO PGEMPSOK (A) E SEU MAPA (B) 54
FIGURA 26 - ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PARA CONFIRMAÇÃO DA INTEGRIDADE DO PROMOTOR P*HOKP* 55
FIGURA 27 - ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PARA CONFIRMAÇÃO DA INTEGRIDADE DO PROMOTOR P*SOK* 56
FIGURA 28 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO PPHOKEGFP 58
FIGURA 29- PERFIL DE MIGRAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA CORRESPONDENTE AO PROMOTOR P*HOK* CLONADO NO VETOR PBBEGFP APÓS ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8 % CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO 59
FIGURA 30 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO PPSOKEGFP 60
FIGURA 31 – PERFIL DE MIGRAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA REFERENTES AO PROMOTOR P*SOK* CLONADO NO VETOR PBBEGFP APÓS ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8 % CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO 61
FIGURA 32 - VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *E. COLI* EM MICROSCÓPIO DE EPIFLUORÊSCENCIA COM AUMENTO DE 60 VEZES. 62
FIGURA 33 - VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *C. METALLIDURANS* EM MICROSCÓPIO DE EPIFLUORÊSCENCIA COM AUMENTO DE 60 VEZES 63
FIGURA 34- VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *C. NECATOR* EM MICROSCÓPIO DE EPIFLUORÊSCENCIA COM AUMENTO DE 60 VEZES 64
FIGURA 35 – ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS LINHAGENS RECOMBINANTES DE *E. COLI* 65
FIGURA 36 - INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DOS TRANSFORMANTES DE *C. METALLIDURANS* 66
FIGURA 37 - INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DOS TRANSFORMANTES DE *C. NECATOR* 67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS EXEMPLOS DOS DIFERENTES TIPOS DE SISTEMA TA.....18
TABELA 2 - PRINCÍPIOS E MÉTODOS DO ESTABELECIMENTO DA CONTENÇÃO BIOLÓGICA.....27
TABELA 3 - LINHAGENS BACTERIANAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO.....30
TABELA 4 - PLASMÍDEOS UTILIZADOS E CONSTRUÍDOS NESTE TRABALHO.....30
TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE PCR UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....31
TABELA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS PROMOTORAS DE *E. COLI* E PROMOTORES DO SISTEMA *HOK/SOK*.....68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Relevância do projeto 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
2.1 Estabilidade genética de plasmídeos procarióticos 16
2.2 Sistemas Toxina-Antitoxina (TA) 17
2.3 O sistema *hok/sok* 22
2.4 Sistemas TA cromossomais 24
2.5 Aplicações biotecnológicas do sistema TA 25
3 OBJETIVO 29
3.1 Objetivos específicos 29
4 MATERIAL E MÉTODOS 30
4.1 Linhagens bacterianas 30
4.2 Plasmídeos 30
4.3 Oligonucleotídeos Iniciadores da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 31
4.4 Descrição dos Plasmídeos 31
4.4.1 pBBR1MCS 32
4.4.2 pBBPAR 32
4.4.3 pCM2 33
4.4.4 pCM3 33
4.4.5 pBB-EGFP 34
4.4.6 pBB-lacEGFP 34
4.4.7 pGEM®-T Easy Vector System 35
4.5 Condição de cultivos das bactérias 35
4.6 Extração e purificação de plasmídeos 36
4.7 Mini-preparação 36
4.8 Máxi-preparação 37
4.9 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose e purificação de fragmentos 38
4.10 Preparação de células eletrocompetentes 38
4.11 Transformação de bactérias por eletroporação 39
4.12 Clivagem dos plasmídeos e fragmentos de DNA com enzimas de restrição 39

4.13 Amplificação dos promotores p*hok* e p*sok*.....39
4.14 Clonagem dos promotores p*hok* e p*sok*.....40
4.15 Subclonagem dos promotores p*hok* e p*sok*.....41
4.16 Microscopia de fluorescência.....41
4.17 Citometria de fluxo.....42
4.18 Estabilidade segregacional.....43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....44
5.1 Estabilidade genética plasmidial.....44
5.1.1 Estabilidade plasmidial em *E. coli*.....45
5.1.2 Estabilidade plasmidial em *C. metallidurans*.....47
5.1.3 Estabilidade plasmidial em *C. necator*.....48
5.2 Amplificação dos promotores p*hok* e p*sok*.....49
5.3 Clonagem dos promotores p*hok* e p*sok*.....52
5.4 Sequenciamento e análise dos insertos.....55
5.5 Clonagem dos promotores no plasmídeo de expressão da *EGFP*.....57
5.5.1 Construção do plasmídeo pPHOKEGFP.....57
5.5.2 Construção do plasmídeo pPSOKEGFP.....59
5.6 Microscopia de fluorescência.....61
5.6.1 Microscopia de fluorescência das linhagens de *E. coli*.....61
5.6.2 Microscopia de fluorescência das linhagens de *C. metallidurans*.....62
5.6.3 Microscopia de fluorescência das linhagens de *C. necator*.....63
5.7 Intensidade de fluorescência medida por citometria de fluxo nas linhagens de *E. coli*, *C. metallidurans* e *C. necator*.....64
5.7.1 Análise por citometria de fluxo das linhagens recombinantes derivadas de *E. coli*.....65
5.7.2 Análise por citometria de fluxo das linhagens recombinantes derivadas de *C. metallidurans*.....65
5.7.3 Análise por citometria de fluxo das linhagens recombinantes derivadas de *C. necator*.....66
5.8 Correlação entre a força de expressão dos promotores p*hok* e p*sok* e a estabilidade genética plasmidial conferida pelo sistema *hok/sok*.....67
6 CONCLUSÕES.....71
REFERÊNCIAS.....72
APÊNDICE A.....79
APÊNDICE B.....80

1 INTRODUÇÃO

O presente estudo surgiu da necessidade de se buscar uma ferramenta para a estabilização genética de plasmídeos portadores de construções genéticas capazes de expressar proteínas heterólogas com aplicação em biorremediação ambiental (BIONDO, 2008; BIONDO et al., 2012). Dentre as várias possibilidades de estabilizar a informação genética de interesse em bactérias, optou-se por se verificar a eficácia do sistema de estabilidade pós-segregacional conferida pelo sistema *hok/sok* (*parB*), integrado aos plasmídeos de expressão da proteína heteróloga, uma vez que, permitiria através desta abordagem manter as cópias de plasmídeos por célula da construção de interesse biotecnológico.

1.1 Relevância do projeto

Atualmente, o uso em larga escala de microrganismos geneticamente modificados (OGM) na indústria biotecnológica traz algumas preocupações quanto à eficiência e estabilidade destes OGMs. Desta maneira, a utilização de uma ferramenta que traga ao processo biotecnológico, que aplica tais microrganismos modificados, a característica de estabilidade genética, traz confiabilidade e segurança ao processo. Desta forma, o sistema *hok/sok* se apresenta como uma ferramenta científica interessante, uma vez que, permite a permanência do plasmídeo na célula hospedeira por um grande número de gerações, garantindo a presença da construção gênica de interesse no microrganismo utilizado no processo industrial, aumentando a produtividade comercial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estabilidade genética de plasmídeos procarióticos

O plasmídeo sendo um elemento genético extracromossomal circular com capacidade autorreplicativa independente do cromossomo, que apesar de não ser essencial para a célula, muitas vezes carrega uma série de genes que proporcionam uma rápida adaptação da bactéria portadora ao ambiente em que se encontra, no entanto, por vezes se torna um fardo metabólico (McLOUGHLIN, 1994; O'CONNELL et al., 2006; SENGUPTA; AUSTIN, 2011; SOBECKY et al., 1996; WOMBLE; ROWND, 1988).

A estabilidade ou instabilidade do plasmídeo e o seu efeito em um determinado microrganismo é determinante para o uso industrial em ambientes controlados ou para a sua aplicação no meio ambiente.

A instabilidade de culturas celulares representa um grande problema no momento de explorar sua potencialidade biotecnológica, sendo que esta instabilidade é influenciada não só pela natureza da célula hospedeira em que se encontra, como também pelas condições ambientais impostas (McLOUGHLIN, 1994; SUMMERS, 1991).

Técnicas biotecnológicas permitem o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados para serem utilizados pela indústria em processos fermentativos, de modo a favorecer características desejadas no microrganismo de interesse. Essas modificações genéticas podem diminuir a robustez ou estabilidade da cultura e até mesmo a capacidade de sobreviver devido à carga energética imposta à célula (ARANTES, 2003; McLOUGHLIN, 1994).

Diversos fatores podem influenciar na estabilidade genética e manutenção dos plasmídeos, dentre eles, um de grande importância é o número de cópias (EBERSBACH; GERDES, 2005; JOHNSON et al., 1996; MEACOCK; COHEN, 1980). Assim um plasmídeo de alto número de cópias pode ser estavelmente mantido na célula devido ao seu número. Estes plasmídeos, geralmente pequenos, são estavelmente mantidos supostamente devido à segregação randômica, uma vez que, não há provas conclusivas da partição ativa destes plasmídeos naturais e seus derivados (EBERSBACH; GERDES, 2005; JOHNSON et al., 1996; SUMMERS,

1991). Contudo, nem todos plasmídeos de alto número de cópias são estáveis, simplesmente por sua segregação e distribuição aleatória (EBERSBACH; GERDES, 2005).

Por outro lado, os plasmídeos de baixo número de cópias, em geral maiores, minimizam a carga metabólica à célula hospedeira. Como não podem depender de uma segregação e distribuição randômica para garantir chances iguais de estarem na célula filha, é inevitável que possuam sistemas gênicos de partição ativa e outros mecanismos que garantam uma hereditariedade estável, mesmo quando as bactérias são cultivadas em meios não seletivos (EBERSBACH; GERDES, 2005; JOHNSON et al., 1996; NORDSTRÖM; AUSTIN, 1989; SOBECKY et al., 1996; SUMMERS, 1991).

Desta forma, diversos sistemas genéticos de segregação genética foram descobertos e estão apresentados nos próximos tópicos.

2.2 Sistemas Toxina-Antitoxina (TA)

O sistema conhecido como Toxina-Antitoxina (TA) de morte pós-segregacional foi descoberto nos anos 80 por dois grupos distintos: (i) Ogura e Hiraga (1983), com o operon *ccd*, inicialmente proposto como componente na divisão celular e, subsequentemente, redefinido como sendo um sistema de estabilidade por Jaffé et al. (1985); e, (ii) Gerdes et al. (1986), com o estudo do sistema *hok/sok* do plasmídeo R1 de *Escherichia coli*.

Apesar das descobertas realizadas por Ogura e Hiraga (1983) e Gerdes et al. (1986) serem paradigmas no estudo do sistema TA, eles possuem componentes e mecanismos diferentes.

Gerdes, Rasmussen e Molin (1986) propuseram o termo morte pós-segregacional para descrever a diferença na estabilidade entre os componentes da toxina, estável, e sua antitoxina, menos estável. Sendo assim, aquelas células livres de plasmídeos atuam degradando rapidamente a antitoxina, permitindo a ação da toxina, a qual provoca a morte de células que perderam o plasmídeo após a divisão celular.

Atualmente são definidos cinco tipos de sistemas TA: tipo I, II, III, IV e V (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais exemplos dos diferentes tipos de sistema TA

	Toxina	Antitoxina	Descrição	Referência
Tipo I	Hok	Sok	Paradigma no estudo do sistema TA tipo I, que estabiliza plasmídeos em bactérias Gram-negativas	Gerdes 1988
	Fst	RNAII	O primeiro sistema TA tipo I identificado em Gram-positivas	Greenfield et al. 2000
	TisB	IstR	Resposta a danos do DNA	Vogel et al., 2004
	LdrD	RdlD	Sistema cromossomal em Enterobacteriaceae	Kawano et al., 2002
	FlmA	FlmB	Homologo de hok/sok e que também estabiliza o plasmídeos F	Loh et al., 1988
	Ibs	Sib	Descoberta na região intergênica de *E. coli*, originalmente nomeado QUAD RNA	Fozo et al., 2008
	TxpA/BrnT	RatA	Assegura que *Bacillus subtilis* herde o elemento *skin* durante a esporulação	Silvaggi et al., 2005
	SymE	SymR	Sistema cromossomal induzido como uma resposta SOS	Gerdes e Wagner 2007
	XCV2162	ptaRNA1	Sistema identificado em *Xanthomonas campestris* com distribuição filogenética errática	Findeiss et al., 2010
Tipo II	CcdB	CcdA	Encontrado no plasmídeo F de *Escherichia coli*	Bernard e Couturier 1992
	ParE	ParD	Encontrado em múltiplas cópias de *Culobacter crescentus*	Fiebig et al., 2010
	MazF	MazE	Encontrado em *E. coli* e no cromossoma de outras bactérias	Hazan e Engelberg-Kulka 2004
	YafO	yafN	Sistema induzido como resposta SOS a danos no DNA em *E. coli*	Singletary et al., 2009
	HicB	HicA	Encontrado em arechea e bactérias, ainda não esta claro qual componente é a toxina e qual é a antitoxina	Makarova et al., 2009
	RelE	RelB	Encontrado no cromossoma de *E.coli*	Christensen et al., 2003
	Kid	Kis	Estabiliza o plasmídeos R1 e é relacionado com o sistema CcdBA	Diago-Navarro et al., 2010
Tipo III	ToxN	ToxI	Encontrado no plasmídeos de *Erwinia caratovora* como um sistema para limitar a infecção por bacteriófago promovendo a morte celular	Fineran et al., 2009
	CptN	CptI	Encontrado em *Coprococcus catus* GD/7	Blower et al., 2012
	TenpN	TenpI	Encontrado no genoma de *Photorhabdus luminescens*	Blower et al., 2012
Tipo IV	CbtA (YeeV)	YeeU	Funciona antagonicamente a toxicidade de CbtA	Masuda et al., 2012
Tipo V	GhoT	GhoS	GhoS degrada os RNAm do gene *ghoT*	Wang et al., 2012

O Tipo I (Figura 1) foi descoberto primeiramente em bactérias Gram-negativas por Gerdes et al. (1986) com o sistema *hok/sok*. Este sistema está também presente

em bactérias Gram-positivas como no caso do plasmídeo pAD1 em *Enterococcus faecalis.* Este sistema consiste basicamente em dois genes: (i) um que codifica uma pequena proteína menor que 60 aminoácidos, hidrofóbica, que causa danos à membrana celular; e, (ii) o outro produz um RNA antisenso que se sobrepõe ao mRNA da proteína tóxica alterando a sua estabilidade e/ou tradução, ou um sRNA regulando a transcrição da proteína. Estes genes podem atuar em *cis*, como no caso do sistema *hok/sok,* ou em *trans*, como no sistema *shoB/OhsC* (BRANDTL, 2012; DURAND et al., 2012; FOZO, HEMM e STORZ, 2008, FOZO, 2012).

Figura 1 – Sistema TA de tipo I.

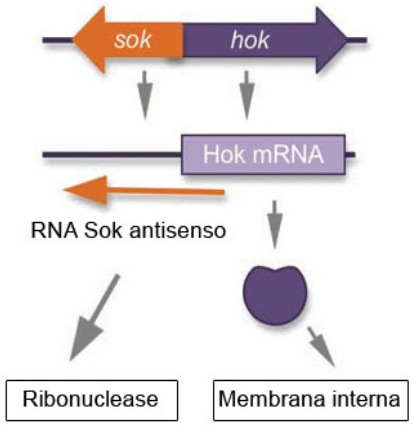


Figura representativa do lócus *parB* paradigma do sistema TA tipo I onde o gene *hok* codifica uma proteína tóxica que desestrutura a membrana interna da célula e o gene *sok* que codifica um RNA antissenso que interage com o mRNA da proteína Hok e sinaliza para a ribonuclease III degradar a dupla fita de RNA.
Fonte: Modificada de Hayes e Melderen (2011).

No sistema de tipo II (Figura 2) a proteína tóxica (e.g., CcdB) interage com a subunidade catalítica GyrA da DNA girase aprisionando o complexo de clivagem entre a enzima e o DNA e, deste modo, impede a replicação. Diferentemente dos sistemas de tipo I, a antitoxina dos sistemas de tipo II também é uma proteína (e. g., CcdA) que interage com a toxina após a sua tradução, formando um complexo protéico que inibe a atividade tóxica da proteína (BRANDTL, 2012; DURAND et al., 2012).

Figura 2 - Sistema TA de tipo II.

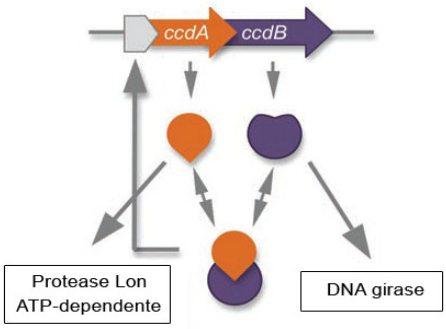


Figura representativa dos genes *ccdAB,* paradigma no sistema TA de tipo II onde o gene *ccdA*, antitoxina, codifica uma proteína que interage com a proteína do gene *ccdB*, toxina, para inibir a sua toxicidade.
Fonte: Modificada de Hayes e Melderen (2011).

O sistema TA de tipo III é um híbrido dos dois tipos anteriores (Figura 3), conforme descrito por Fineran et al., (2009). A toxina (e. g., ToxN) possui atividade ribonucleotídica, como algumas das proteínas presentes em sistemas TA tipo II, mas sua antitoxina é um RNA, a exemplo do tipo I. Neste caso o RNA se liga a toxina de forma a neutralizá-la (BRANDTL, 2012; DURAND et al., 2012).

Figura 3 - Sistema TA de tipo III.

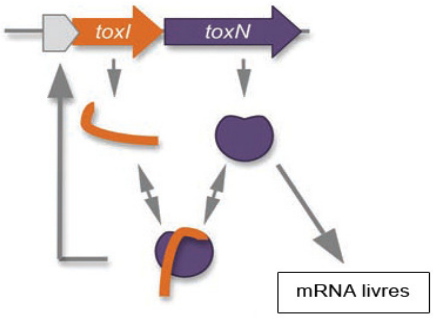


Figura representativa do gene *toxIN*, paradigma do sistema TA de tipo III onde a proteína tóxica ToxN é inibida pela ligação do mRNA de ToxI. Este complexo regula negativamente o operon.
Fonte: Modificada de Hayes e Melderen (2011).

Recentemente, outros dois tipos de sistemas TA vêm sendo propostos (tipos IV e V). No sistema de tipo IV (Figura 4) assim como no tipo II, a antitoxina também é uma proteína (e. g., YeeU), contudo a sua forma de atuação é diferente. Nos

sistemas TA tipo IV a antitoxina interfere na ligação da toxina com o seu alvo antagonicamente, ao invés da direta interferência formando um complexo toxina-antitoxina (MASUDA et al., 2012).

Figura 4 - Sistema TA de tipo IV.

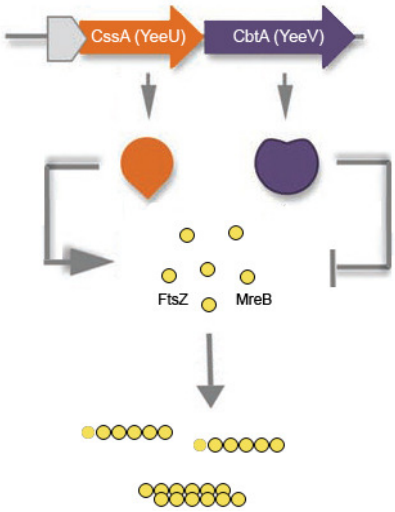


Figura representando a forma de atuação do sistema TA de tipo IV, em que a antitoxina CssA (YeeU) atua antagonicamente no sítio de ligação da toxina CbtA (YeeV), nas proteínas MreBe, FtsZ permitindo a polimerização destas para a formação do citoesqueleto.
Fonte: Baseada em Masuda et al. (2012).

No sistema de tipo V descrito por Wang et al. (2012, 2013) (Figura 5) a antitoxina é uma RNase específica (e. g., GhoS) que degrada o mRNA da toxina (e.g., GhoT) antes de ser traduzido. Assim, como já descrito para a proteína Hok, a proteína GhoT funciona presumidamente como uma toxina para a membrana, dando um aspecto de célula fantasma, porém em grandes quantidades pode levar a lise celular.

Figura 5 - Sistemas TA de tipo V.

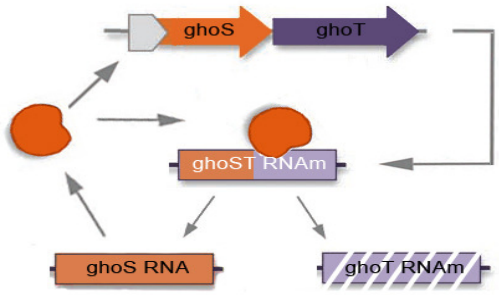


Figura representando a forma de atuação dos sistemas TA de tipo V, onde a antitoxina GhoS cliva especificamente o mRNA ghoST na região de ghoT impedindo assim a expressão da proteína tóxica. **Fonte:** baseada em Wang et al. (2013).

2.3 O sistema *hok/sok*

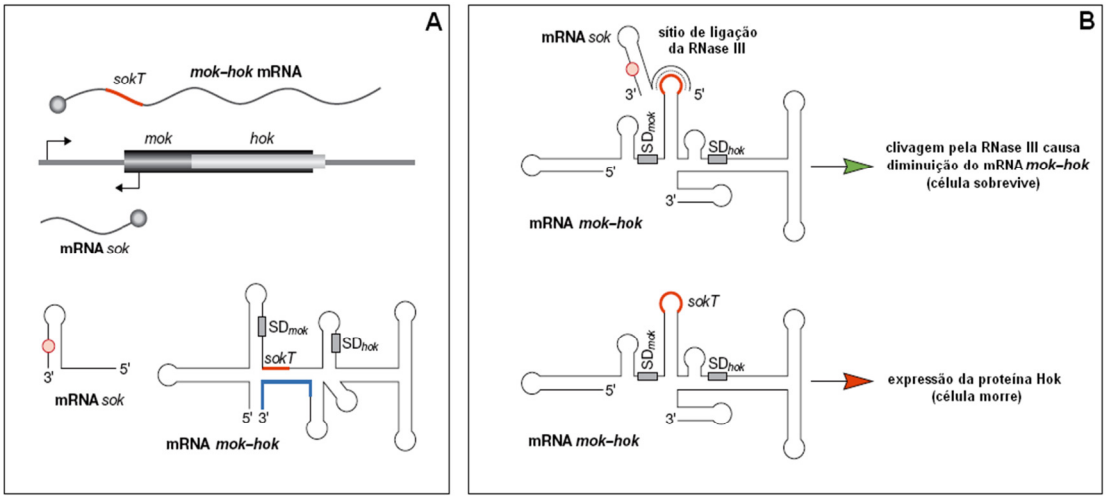
Durante os estudos de segregação do plasmídeo R1 de *E. coli*, encontrou-se um *lócus* correlacionado a estabilidade plasmidial da célula cultivada na ausência de pressão seletiva. Este *lócus* codifica um pequeno polipeptídeo altamente tóxico para a célula (MOLIN et al., 1993).

Tal *lócus* denominado de *parB* ou *hok/sok*, considerado um paradigma para o sistema TA de tipo I, codifica três genes: (i) *hok* ("*host of killing*"): codifica uma toxina letal que danifica a membrana celular (Hok); (ii) *mok* ("*modulation of killing*"): apresenta fase de leitura sobreposta à da sequência *hok*, sendo necessário para a expressão e tradução de *hok;* e, (iii) *sok* ("*suppression of killing*"): codifica um pequeno RNA, anti-senso ao mRNA de *hok*, que bloqueia a tradução da proteína Hok (Figura 6) (FARIDANI et al., 2006; GERDES; WAGNER, 2007).

A tradução de Hok é simultânea à tradução de Mok na fita do mRNA *mok-hok* (Figura 6A). O enovelamento deste RNA *mok-hok* oculta a sequência "Shine-Dalgarno" de *mok* (SDmok), impedindo o acesso dos ribossomos e, consequentemente, a tradução de ambos os genes. Um processamento parcial da região 3' do mRNA *mok-hok* induz um re-enovelamento da molécula, causando a exposição de SDmok, ocasionando o início da tradução de Mok e da toxina Hok, o que leva à morte celular (Figura 6B). Contudo, isto não ocorre na célula que possui a expressão de *sok* um RNA antissenso, complementar a sokT, uma sequência a montante de SDhok. A interação entre a região sokT e o RNA antissenso sok forma

uma estrutura secundária que é rapidamente clivada pela RNase III, levando a uma rápida diminuição nos níveis de mRNA *mok-hok*, evitando a síntese de Hok e a morte celular (FARIDANI et al., 2006; GERDES, 1988; GERDES et al., 1997; GERDES; WAGNER, 2007).

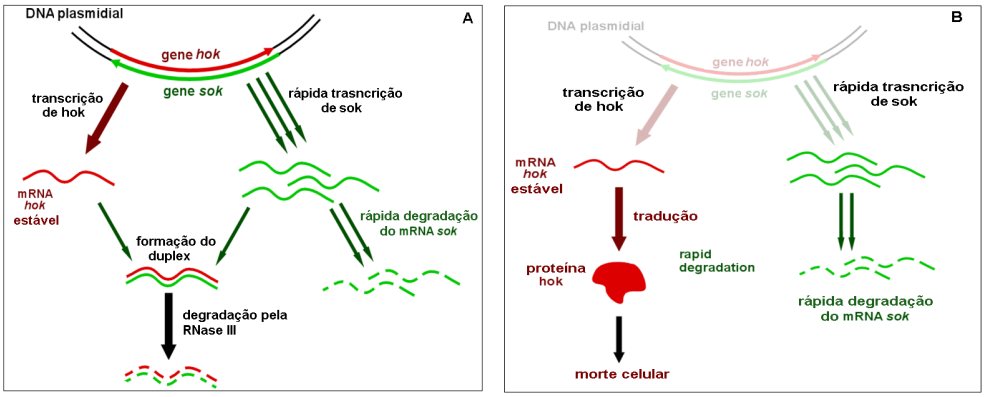
Figura 6 – Representação esquemática do funcionamento do *locus* hok/sok



(**A**) O *lócus par*B codifica um mRNA codificador da toxina Hok (*mok-hok*) e o RNA antisenso *sok*. O enovelamento do mRNA *mok-hok* impede a produção da toxina e "mascara" a seqüência sokT (vermelho) em uma estrutura de RNA dupla fita. Parcial processamento da região 3' (azul) do mRNA mok-sok induz re-enovelamento. (**B**) O mRNA *mok-sok* re-enovelado pode produzir a proteína Hok, expondo a região sokT em um *loop* de RNA de fita simples . Em células contendo sok, ocorre o pareamento de sok-sokT, o que induz a rápida degradação do mRNA *mok-hok* pela RNase III. Em células que perderam o plasmídeo, a proteína Hok é expressa, causando a morte da célula. SD- Shine-Dalgarno.
Fonte: Baseado em Cueva-Mendez e Pimentel (2007).

O RNA anti-senso *sok* é pouco estável na célula (meia vida de 30 s). Por outro lado, o mRNA *hok* é mais estável (meia vida de 20 min) e acessível à tradução apenas quando a porção 3' do RNA é processada. Quando o plasmídeo é perdido pela célula ou ocorre falha durante a segregação, ocorre rápida degradação do RNA anti-senso *sok*, ocasionando a tradução do mRNA *mok-hok* e a produção da toxina Hok o que provoca a morte celular (Figura 7). Portanto, o sistema *hok/sok* proporciona estabilidade plasmidial resultante da morte pós-segregacional das células que perderam o plasmídeo portador do lócus *parB* (FARIDANI et al., 2006; GERDES; WAGNER 2007).

Figura 7 – Representação esquemática do modo de atuação do sistema *hok/sok.*



(**A**) Na célula portadora do plasmídeo codificante do *locus par*B, ocorre a expressão do mRNA *hok* e do RNA antisenso *sok*, evitando a expressão da toxina letal Hok. (**B**) Na célula onde o plasmídeo é perdido, ocorre a tradução do mRNA *mok-hok* devido à falta da fita antisenso, ocorrendo a expressão da toxina letal.
Fonte: anônima.

2.4 Sistemas TA cromossomais

Alguns autores propõe a existência de sistemas análogos ao TA que estão presentes em cromossomas bacterianos.

Uma das proposições mais simples é que eles estariam voltados na prevenção da deleção de grandes áreas do genoma bacteriano, que seriam fatais para as células filhas. O *lócus* m*azEF*, por exemplo, encontrado em *E. coli* e outras bactérias, induz a morte celular programada em resposta a falta de nutrientes, em especial a falta de aminoácidos (AIZENMAN; ENGELBERG-KULKA; GLASER, 1996).

Outro exemplo, de acordo com Diago-Navarro et al. (2010), é que este sistema é desenhado para ser bacteriostático ao invés de bactericida. Assim, como proposto por Christensen et al. (2001), a proteína RelE, funciona como inibidora da tradução durante o estresse de nutrientes, assim a sua expressão reduz as necessidades nutricionais da célula, evitando sua morte por falta destes.

Ainda, Magnuson (2007) descreve nove funções possíveis para a existência de sistemas TA cromossomais, apesar de não haverem provas que reforcem tais propostas e de serem hipóteses individuais, a possibilidade da convergência múltiplas destas hipóteses não pode ser descartada, quais sejam:

(i) Lixo: Foram adquiridos de plasmídeos e retidos devido a sua natureza “viciante”;

(ii) Estabilização de genomas parasitários: Remanescentes cromossomais de transposons e bacteriófagos;

(iii) Alelos egoístas: Alelos não dependentes não possuem a capacidade de substituir alelos “viciantes” durante a recombinação enquanto o inverso é possível;

(iv) Regulação gênica: algumas toxinas atuam como repressores da expressão gênica, enquanto outras são mais específicas;

(v) Controle do crescimento: Algumas toxinas restringem o crescimento ao invés de matar a célula hospedeira;

(vi) Persistentes: Algumas populações bacterianas possuem uma sub-população de “persistentes” controlados pelo sistema TA, de crescimento lento e resistentes, que potencialmente asseguram a sobrevivência da população contra perdas catastróficas;

(vii) Dormência celular programada e preservação de outros da espécie: Exemplo citado pelo *MazEF* , que coloca a célula num estado de necessidades nutricionais menor que o normal para evitar a morte;

(viii) Morte celular programada: Similar a hipótese anterior, exceto que requer uma resposta heterogenia ao estresse, uma vez que nenhuma célula seria beneficiada se todas morressem;

(ix) Mecanismo antibacteriófago: Quando o bacteriófago interrompe a transcrição ou tradução da célula hospedeira, o sistema TA pode ser ativado para limitar a replicação do fago.

2.5 Aplicações biotecnológicas do sistema TA

Dentre as diversas formas de utilização de sistemas TA, a manutenção plasmidial em culturas celulares em pequena e larga escala, como descrito por Bernard et al. (1994), Gerdes (1988), Pimenta et al. (1992) e Torres (2003), são exemplos de aplicação biotecnológica. Em processos fermentativos de larga escala, células descendentes não portadoras de plasmídeos de interesse no processo se tornam fortes competidoras daquelas que hospedam o plasmídeo. Desta forma, o

sistema TA torna-se uma ótima ferramenta para a manutenção de plasmídeos que contenham a construção gênica de interesse no microrganismo utilizado e para eficiência em processos industriais (PECOTA et al., 1997; STIEBER et al., 2008).

Outra possibilidade é o uso deste sistema como alvo para antibióticos. A indução da morte celular de organismos patogênicos pode ajudar a combater o crescente problema do surgimento das superbactérias multirresistente a antibióticos. Alguns antibióticos vêem sendo desenvolvidos com o intuito de levar a morte celular através da inibição da transcrição e da tradução da antitoxina MazE do *lócus mazEF*, permitindo que a toxina MazE fique ativa (GERDES et al., 2005).

O sistema TA pode ser utilizado para assegurar positivamente a seleção das células portadoras de plasmídeo com o inserto codificador do gene de interesse, problema comum enfrentado durante a clonagem de DNA e, desta forma, descartando aquelas células isentas da construção de interesse. Um exemplo desta aplicação é o uso da toxina *CcdB*, que é incorporada a um vetor de clonagem (e. g., pKIL18/19) (BERNARD et al., 1994). O gene de interesse é direcionado a recombinar com o *lócus ccdB*, inativando a transcrição da proteína tóxica. Assim as células que possuem o plasmídeo, mas não o inserto, morrem devido ao efeito tóxico da proteína CcdB, porém aquelas que tiveram o inserto incorporado sobrevivem (STIEBER et al., 2008).

Outro exemplo de sistema de estabilização genética foi demonstrado por Biondo et al. (2012) que construíram o plasmídeo pCM3 portador do *lócus parB* e que inserido em várias bactérias confere a estas uma capacidade biorremediadora de metais pesados adicional pela expressão de uma proteína quelante de metais pesados (EC20) e apresenta grande estabilidade segregacional nestas células recombinantes.

Dentre as possibilidades de uso, a contenção de organismos geneticamente modificados é também uma área de aplicação desta técnica, pois pode levar a morte daquelas células que enfrentarem condições diferentes daquelas impostas num ambiente controlado, como apresentado na Tabela 2 (TORRES et al., 2003).

Tabela 2 - Princípios e métodos do estabelecimento da contenção biológica

Princípio	Método	Exemplo(s)
Atenuação	Modificação natural ou genética da deleção de genes de virulência	Vacina de virus Ankara modificada, vetores de herpevirus *E. coli* K-12, mutante de *Salmonella aro* , mutante de Vibrio ctx , mutante de *Lactococcus lactis thyA*
Restrição da variedade de hospedeiros	Viroses de restrição natural ao hospedeiro	Virus Canarypox, fowlpox virus, baculovirus
Alteração da variedade de hospedeiros	Linhagem celulares ecotropicas, pseudotipagem	Vetores retrovirais
Uso de vetores defeituosos em replicação	Deleção e provisão de genes essenciais produtos "in *trans*"	Vetores de Herpesvirus, Vetores de alphavirus, vetores retrovirais, vetores de adenovirus, vetores de vírus adeno associados,vírus sincítos respiratórios, vetores de lentivirus,mutantes de *Salmonella aro* , *E. coli* K-12
Prevenção na transferência de genes	Expressão de funções suicidas	*E. coli relF*

Fonte: Baseado em Kimman et al. (2008)

Muitos sistemas de contenção biológica foram desenvolvidos ao longo do tempo, um dos exemplos foi a criação de um mutante estável de *Bacillus licheniformis*, uma cepa utilizada industrialmente, que foi obtida pela deleção do gene *rec* e/ou do gene de esporulação (*spoIV*). Contudo estas cepas possuem uma debilidade no reparo de DNA, assim como uma hipersensibilidade aos raios Ultra Violeta (UV) (NAHRSTEDT et al., 2005).

Outro sistema desenvolvido foi a modificação genética de *Lactococcus lactis* onde foi substituído o gene da timidina sintase *thyA* pelo gene sintético humano da interleucina-10 (IL-10). Uma vez desprovida de timidina ou timina a viabilidade do microrganismo cai consideravelmente, impedindo a sua sobrevivência no meio ambiente (STEIDLER et al., 2003).

Dentre os sistemas de contenção biológica, alguns com funções suicidas foram criados para promover biossegurança de sistemas (NAHRSTEDT et al., 2005; SCHWEDER et al., 1992). Estes sistemas suicidas são baseados em genes letais que agem em condições pré-programadas, contudo tais sistemas parecem diferir entre eles em relação a sua letalidade. Um eficiente sistema utilizado é baseado no gene letal *relF* de *E. coli*, que impede a transferência de plasmídeo para bactérias selvagens (KNUDSEN et al., 1995).

Knudsen et al. (1995) desenvolveram um sistema de contenção biológica com a criação do plasmídeo suicida pSK360 que possui duas cópias do gene suicida *relF* de *E. coli*. Outro exemplo foi demonstrado por Balan e Schenberg (2005), no qual foi desenvolvido um sistema suicida para levedura, utilizando um vetor com o gene da nuclease de *Serratia marcescens*, *nucA*, desprovido de seu peptídeo sinal,

com o objetivo de destruir o material genética da célula hospedeira quando na ausência de glicose.

Desta forma, fica claro que os sistemas TA têm grande potencial biotecnológico para aplicação em desenvolvimento de linhagens microbianas recombinantes geneticamente estáveis ou ainda em contenção biológica destas cepas. Assim, o presente trabalho aborda o uso de um destes sistemas TA para avaliar seu potencial na estabilização genética plasmidial de cepas bacterianas recombinantes.

3 OBJETIVO

Avaliar a estabilidade genética plasmidial conferida pelo sistema *hok/sok* de morte pós-segregacional em bactérias de interesse biotecnológico, correlacionar o grau de estabilidade à força de expressão de cada um dos promotores envolvidos neste sistema, bem como avaliar a força de expressão gênica dos promotores p*hok* e p*sok* nestas bactérias.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade de plasmídeos portadores do sistema *hok/sok* nas bactérias *Escherichia coli*, *Cupriavidus metallidurans* e *Cupriavidus necator*;
- Obter as sequências dos promotores do sistema *hok/sok*, por PCR, e cloná-los no vetor pBB-EGFP, de forma a coloca-los no comando da expressão do gene codificador da proteína verde-fluorecente *EGFP*;
- Avaliar a força de expressão dos promotores p*hok* e p*sok* comandando a expressão da proteína EGFP nas três bactérias Gram-negativas objeto de estudo neste trabalho;
- Correlacionar à estabilidade genética dos plasmídeos recombinantes construídos com a força de expressão dos promotores do sistema *hok/sok* em cada sistema biológico avaliado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 3, abaixo:

Tabela 3 - Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho

Linhagem	Genótipo	Referência
Escherichia coli DH5α	F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), λ–	Meselson e Yuan (1968);
Cupriavidus metallidurans CH34 (ATCC 43123)	Selvagem, pMOL28, pMOL30,	Mergeay et al. (1985)
Cupriavidus necator (DSMZ 545)	PHB^+, Glc^+, Sac^-, Fru^+	Makkar e Casida (1987)

4.2 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho estão descritos na Tabela 4 :

Tabela 4 - Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho

Plasmídeos	Características	Referência
pBBR1MCS	Vetor de Amplo espectro em Gram-negativas, Cm^r, Mob^+, múltiplo sítio de clonagem	Kovach et al. (1994)
pBBPAR	Vetor de amplo espectro em Gram-negativas, Cm^r, Mob^-, $ParB^+$	Biondo et al. (2012)
pCM2	Cassete de expressão e ancoragem da EC20sp, Cm^r, Mob^+	Biondo (2008)
pCM3	Cassete de expressão e ancoragem da EC20sp, Cmr, Mob^-, $ParB^+$	Biondo et al. (2012)

Plasmídeos	Características	Referência
pBBEGFP	Gene EGFP clonado no vetor pBBR1MCS	Quadros (2007)
pBB-LacEGFP	Vetro de expressão da EGFP sob o comando do promotor p*lac*	Ribeiro-dos-Santos et al., 2010
pGEM®-T Easy	Vetor de clonagem comercial, Ap^r, lacZ	Promega
pGEM-PHOK	Promotor hok clonado em pGEM® easy	Este trabalho
pGEM-PSOK	Promotor sok clonado em pGEM® Easy	Este trabalho
pPHOKEGFP	Promotor hok clonado em pBBEGFP	Este trabalho
pPSOKEGFP	Promotor sok clonado em PBBEGFP	Este trabalho

4.3 Oligonucleotídeos Iniciadores da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Tabela 5 - Oligonucleotídeos iniciadores de PCR utilizados neste trabalho

Nome	Sequencia	Anelamento (ºC)	Finalidade
phokf2	5'-GAGCTCTGGTCAGCGTGCAGGTATATGGGCTATGATGTGCCCGGCGCT-3'	65	Amplificação do promotor hok; conservação da região Shine Dalgarno (SD) e alteração do promotor sok.
phok-rev2	5'-CATATGCTCCTTGCGCAAAGCGCGGTAAGAGGCCAGCTTGATGTGGACTA-3'		
psokf	5'-GAGCTCTTGCGCAAAGCGCGGTAAGAGGCTATCCTGATG-3'	59	Amplificação do promotor sok; criação da região Shine Dalgarno (SD) e alteração do promotor hok.
psok-rev2	5'-CATATGGATTATTTTCAGGGAAAGTGACTCCTTTCAGCGTGCAGGTATAT-3'		
Universal M13 Forward (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	55	Sequenciamento da região promotora e EGFP
Universal M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	55	Sequenciamento da EGFP e região promotora

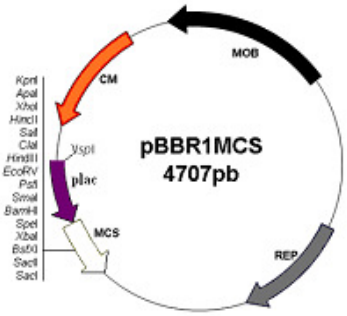
4.4 Descrição dos Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho para a análise de estabilidade genética, clonagem de fragmentos de PCR e expressão protéica estão descritos abaixo.

4.4.1 pBBR1MCS

O plasmídeo pBBR1MCS foi construído por Kovach et al. (1994), através da subclonagem do múltiplo sítio de clonagem do vetor pBluescript ® II KS (Stratagene), no vetor pBBR1CM isolado de *Bordetella bronchiseptica* (Figura 8). Trata-se de um plasmídeo de médio número de cópias e de amplo espectro de hospedeiras para bactérias Gram-negativas (Antoine e Locht, 1992; Kovach et al., 1994; Schneider et al. 2000).

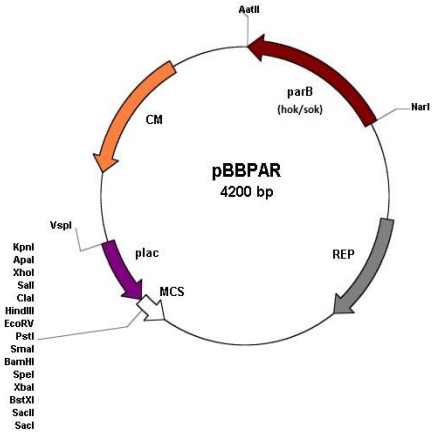
Figura 8 - Esquema representativo do plasmídeo pBBR1MCS



4.4.2 pBBPAR

O plasmídeo pBBPAR foi construído por Biondo et al. (2012) a partir do plasmídeo pBBR1MCS com a substituição do gene de mobilização “MOB” pelo gene de estabilidades pós-segragacional “*parB*” (Figura 9).

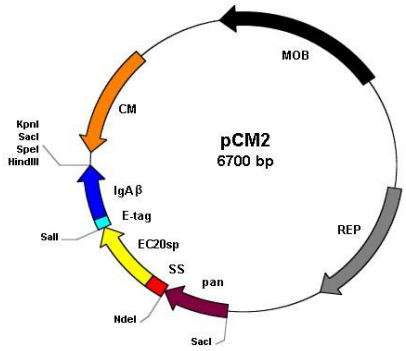
Figura 9 - Esquema representativo do plasmídeo pBBPAR



4.4.3 pCM2

O plasmídeo pCM2 foi construído por Biondo (2008), através da subclonagem do cassete de expressão-ancoragem da EC20sp localizado em pTOPOANC para o plasmídeo pBB-p*an*EGFP, contendo o gene de moblização “MOB” (Figura 10).

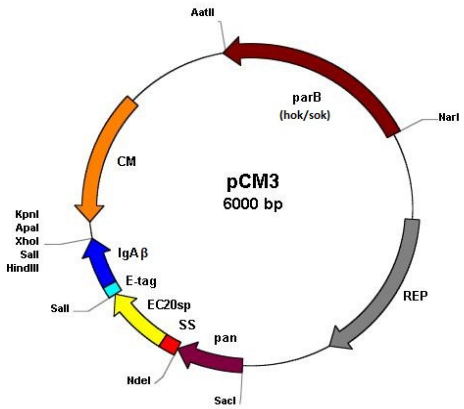
Figura 10 - Esquema representativo do plasmídeo pCM2



4.4.4 pCM3

O plasmídeo pCM3 foi construído por Biondo et al. (2012) a partir do plasmídeo pCM2 através da substituição do gene de mobilização “MOB” pelo gene de estabilidades pós-segregacional “*parB*” (Figura 11).

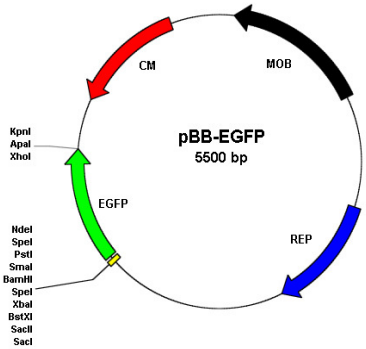
Figura 11 - Esquema representativo do plasmídeos pCM3



4.4.5 pBB-EGFP

O plasmídeo pBB-EGFP foi construído por Quadros (2007) através da subclonagem do gene da EGFP no vetor pBBR1MCS. Este vetor permite analisar a expressão da EGFP sob o controle de sequências promotoras variadas, permitindo a quantificação da proteína repórter e a subsequente avaliação da força relativa de expressão dos promotores (Figura 12).

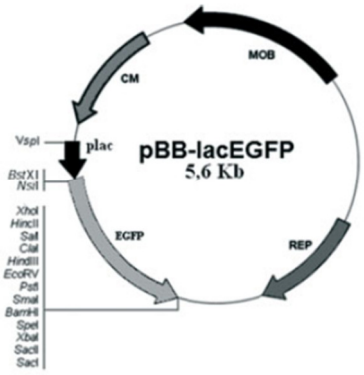
Figura 12 - Esquema representativo do plasmídeo pBB-EGFP



4.4.6 pBB-lacEGFP

O plasmídeo pBB-lacEGFP foi construído por Ribeiro-dos-Santos et al. (2010), através da subclonagem do gene da EGFP sob o controle do promotor p*lac* a partir do plasmídeo pGEMEGFP (Ribeiro-dos-Santos et al., 2010) e clonados no plasmídeos pBBR1MCS (Figura 13).

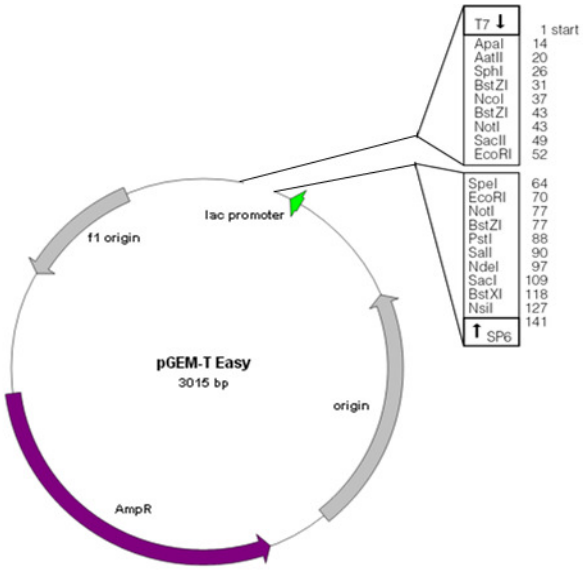
Figura 13 – Esquema representativo do plasmídeos pBB-lacEGFP



4.4.7 pGEM®-T Easy Vector System

O vetor comercial pGEM®-T Easy Vector System (Promega) (Figura 14) é um sistema conveniente para clonagem de produtos de PCR, apresentando alto número de cópias, múltiplos sítios de clonagem e permite a rápida seleção de recombinantes clonados na região codificante do α-peptideo da enzima β-galactosidase. O fragmento inserido inativa a expressão do α-peptídeo permite uma direta identificação de clones pela diferença de cor entre as colônias presentes nas placas que contém 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosideo (X-Gal) e o isopropil-β-D-thiogalactopiranosideo (IPTG).

Figura 14 - Esquema representativo do plasmídeo pGEM-T Easy



4.5 Condição de cultivos das bactérias

A linhagem bacteriana *C. metallidurans* CH34 foi cultivada sob condições aeróbias em caldo nutriente (CN) a 28 ºC, sob 180 rpm de agitação, conforme especificado pela coleção de culturas.

A linhagem *C. necator* foi cultivada sob condições aeróbias em meio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) a 28 ºC, sob 180 RPM de agitação.

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas sob condições aeróbias em meio LB a 37 ºC, sob 180 rpm de agitação.

A seleção de transformantes foi realizada em meios de cultura sólido contendo cloranfenicol a 25 µg/mL, 50 µg/mL e 230 µg/mL para as seguintes bactérias respectivamente, *E. coli*, *C. necator* e *C. metallidurans* para pBBR1MCS e seus derivados, e 100 µg/mL de ampicilina para a seleção de transformantes portadores do plasmídeo pGEM-T Easy e seus derivados.

Todos os meios sólidos continham 2% de ágar e foram esterilizados por autoclavagem a 121 ºC, 1 atm por 15 min.

4.6 Extração e purificação de plasmídeos

A extração e a purificação de plasmídeos foram realizadas de acordo com Sambrook e Russell (2001). Para o isolamento e análise de DNA em pequena escala, foi utilizado o protocolo de mini-preparação. Para o isolamento de grandes quantidades de DNA para manipulação genética, foi utilizado o protocolo de máxi-preparação.

4.7 Mini-preparação

Um inóculo bacteriano foi realizado em 5 mL de meio de cultura com uma colônia isolada do transformante, contendo o antibiótico desejado na concentração adequada, incubado por 16 horas a 180 rpm, sob as temperaturas específicas para cada uma das bactérias utilizadas. Um volume de 3 mL dessa cultura foi centrifugado por 2 minutos a 8000 g e o meio de cultura completamente removido. O precipitado foi ressuspenso em 300 µL da Solução 1 (EDTA 0,5 M pH 8.0; Tris-HCl 0,5 M pH 8.0 e dextrose 0,5 M) e em seguida 300 µL da Solução 2 (NaOH 1,0 M; SDS 1 %) foram adicionados, e a mistura foi mantida por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se então, 300 µL da Solução 3 (11,5 % de ácido acético glacial e 60 % acetato de potássio 5 M), agitando levemente e mantendo por 10 minutos no gelo. O material foi centrifugado por 15 minutos a 4 ºC e 10000 g. O sobrenadante foi recuperado e o precipitado descartado. Adicionaram-se 10 µL de RNAse (10 mg/mL) e incubou-se por 30 minutos a 37 ºC. Em seguida 750 µL de

clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) foi adicionado e novamente centrifugado por 2 minutos, a 4°C e 10.000 g. A fase aquosa superior foi recuperada e adicionaram-se 600 µL de isopropanol incubando por 30 minutos à temperatura ambiente e então centrifugado por 15 minutos, a 4°C e 10000 g. O precipitado foi lavado com 100 µL de etanol (70%) e em seguida ressuspenso em água ultra pura Milli-Q.

4.8 Máxi-preparação

Um pré-inóculo bacteriano foi realizado em 5 mL de meio de cultura com uma colônia isolada do transformante, contendo o antibiótico desejado na concentração adequada, foi incubado por 16 horas, a 180 rpm, sob as temperaturas específicas para cada uma das bactérias utilizadas, em seguida 2 mL do cultivo foi inoculado em 200 mL do mesmo meio e cultivado nas mesmas condições do pré-inóculo. A cultura foi centrifugada por 10 minutos, a 4 °C e 6000 g. O precipitado foi ressuspenso em 4 mL da Solução 1 (EDTA 0,5 M pH 8.0, Tris-HCl 0,5 M pH 8.0,dextrose 0,5 M) e mantido por 15 minutos, em gelo. Em seguida 8,0 mL da Solução 2 (NaOH 1,0 M, SDS 1 %) foram adicionados, e a mistura foi mantida por 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se então, 6,0 mL da Solução 3 (11,5 % de ácido acético glacial, 60 % acetato de potássio 5 M), agitando levemente e mantendo por 10 minutos, no gelo. O material foi centrifugado por 15 minutos, a 4 °C e 8000 g. O sobrenadante foi recuperado e o precipitado descartado. Adicionaram-se 12 mL de isopropanol, e manteve-se a solução por 10 minutos, à temperatura ambiente. Novamente, o material foi centrifugado por 15 minutos, a 4 °C e 8000 g. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de água Milli-Q e tratado com 10 µL de RNAse (10 mg/mL), por 30 minutos a 37 °C. Adicionaram-se em seguida 500 µL de fenol tamponado e centrifugou-se por 5 minutos, a 4 °C e 10000 g. Transferiu-se a porção superior aquosa para outro tubo e adicionaram-se 500 µL de fenol:clorofórmio (24:1, v/v) e novamente centrifugou-se por 5 minutos, a 4 °C e 10000 g. Porções de 500 µL da fase superior foram transferidas para novos tubos e o DNA da amostra foi precipitado adicionando-se 50 µL de acetato de amônia e 1 mL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram mantidos por 1 h, a 4 °C e, então, centrifugados por 10 minutos, a 4 °C e 10000 g. O precipitado foi recuperado e lavado com 200 µL de etanol (70 %) e, em seguida, ressuspenso em água ultra-pura Milli-Q.

4.9 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose e purificação de fragmentos

A separação dos fragmentos de DNA foram realizadas em géis de agarose 0,8 % contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Sigma), submetido a 80 V por 2 horas em tampão de corrida TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM pH 8,0). A análise dos fragmentos nas amostras aplicados no gel contendo tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5 %; glicerol 50 % e EDTA 100 mM, pH 8,0) foi realizada por comparação na intensidade da fluorescência da amostra com aquela exibida pelo λDNA de concentração conhecida e o marcador molecular DNA Ladder 100 pb e 1000 pb (Fermentas®, Pittsburgh PA, United States). Posteriormente, o gel foi analisado por visualização das bandas em transluminador com luz ultravioleta (UV) a 365 nm e fotodocumentado em sistema GelDoc-It® Imager (UVP, Upland, CA, USA).

Para isolar um fragmento de DNA a partir do gel de agarose, após a eletroforese cortou-se diretamente desse gel a banda referente ao fragmento alvo sob visualização em luz UV e o DNA foi isolado conforme as recomendações do fabricante do Kit de eluição PCR clean-up and Gel extraction (Macherey-Nagel, Neumann-Neander-Straße 6-8, Düren, Germany).

4.10 Preparação de células eletrocompetentes

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α foram preparadas conforme Sambrook e Russell (2001). Células de *E.coli* DH5α foram cultivadas por 16 horas, a 37 ºC e 180 rpm em 5 mL de meio LB. Em seguida a cultura foi vertida em 500 mL de meio LB e cultivada a 37 ºC a 180 rpm até atingir a D.O. 600 nm de 0,5 de absorbância. As células então foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com água Milli-Q gelada contendo 10% (v/v) de glicerol. Em seguida as células foram concentradas em 1 mL de água Milli-Q gelada com 10% de glicerol (v/v), aliquotadas em 40 µL e estocadas a -80 ºC.

Células eletrocompetentes de *C. metallidurans* CH34 e *C. necator* foram preparadas baseado em Taghavi et al. (1994) com modificações. Células de *C. metallidurans* CH34 e *C. necator* foram cultivadas por 16 horas, a 28 ºC e 180 rpm

em 5mL de CN quando *C. metallidurans* e LB quando *C. necator* . Em seguida essa cultura foi vertida em 500 mL do mesmo meio de cultura utilizado no passo anterior para cada uma das culturas e cultivadas a 28 ºC, a 180 rpm até atingir Absorbância a600 nm de 0,8. As células foram então coletadas e lavadas duas vezes com água ultra-pura Milli-Q gelada contendo 10 % (v/v) de glicerol. Em seguida as células foram concentradas em 1 mL de água Milli-Q gelada com 10% de glicerol (v/v), aliquotadas em 40 µL e estocadas a -80 ºC.

4.11 Transformação de bactérias por eletroporação

A eletroporação das linhagens de *E. coli*, *C. metallidurans* CH34 e *C. necator* foram realizadas utilizando Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) com os seguintes ajustes: voltagem de 2500 V, 2000 ohms de resistência e 25 µF de capacitância.

Foram utilizados 100 ηg de vetor ou 2 µL de cada mistura de ligação adicionados aos 40 µL da preparação de células eletrocompetentes. Após este procedimento, a mistura foi transferida para cubeta de eletroporação a 4 ºC e submetida ao pulso elétrico. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1mL de meio CN para *C. metallidurans* e LB quando *C. necator* e *E. coli*, incubadas por 1 h, 180 rpm a 28 ºC, se *C. metallidurans* CH34 e *C. necator* e a 37 ºC, se *E. coli*. Em seguida as células foram semeadas em meios seletivos, que permitissem a identificação dos clones transformantes.

4.12 Clivagem dos plasmídeos e fragmentos de DNA com enzimas de restrição

As digestões dos plasmídeos e dos fragmentos de DNA com enzimas de restrição foram realizadas seguindo-se as instruções do fabricante. Todas as enzimas de restrição utilizadas foram da marca Fermentas®.

4.13 Amplificação dos promotores p*hok* e p*sok*

A amplificação por PCR do promotor p*hok* foi realizada utilizando os oligonucleotídeos phokf2 e phok-rev2 a partir do plasmídeo pBBPAR como molde. A

amplificação do promotor p*sok* foi realizada utilizando os oligonucleotídeos psokf e psok-rev2 também utilizando como DNA molde o plasmídeo pBBPAR.

As reações de PCR para amplificação de ambos promotores foram realizadas contendo 1µL de DNA molde (50 ng/µL) do plasmídeo pBBPAR, 1 µL de oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso, (10 mM) cada, 0,5 µL de dNTP (200 mM), 3,0 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 2,5 µL de tampão Taq, 1,25 u de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas®) e 11,5 µL de água Milli-Q para um volume de 20 µL.

O ciclo da reação constituiu nos sete passos seguintes: 1 – 95 ºC por 120 seg,; 2 – 95 ºC por 60 seg.; 3 – 65 e 59 ºC para os oligonucleotídeos dos promotores sok e hok respectivamente por 90 seg.; 4 – 72 ºC por 90 seg.; 5 – repetição dos passos 2, 3 e 4 por 30 vezes; 6 – 72 ºC por 600 seg. e 7 – 4 ºC por tempo indeterminado.

4.14 Clonagem dos promotores p*hok* e p*sok*

Os fragmentos de PCR referentes à amplificação dos promotores p*hok* e p*sok* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 % e quantificados pela comparação na intensidade de fluorescência com o marcador 100 pb (Fermentas®) e λ DNA (100 ng). Esses fragmentos foram clonados no vetor de clonagem comercial pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) conforme especificado no catálogo do produto, com o objetivo de obter os novos vetores pGEMPHOK e pGEMPSOK. Nas reações de ligação foram utilizadas 11,5 ng de inserto, 50 ng de vetor de clonagem (pGEM®-T Easy) na proporção de 3:1 (inserto:vetor), 1U da enzima T4 DNA Ligase (Promega) e seu respectivo tampão 1X. Cada uma das misturas de ligação foi incubada por 12 h a 4 ºC, posteriormente 1 µL das respectivas ligações foram utilizadas para transformar células eletrocompetentes de *E.coli* DH5α.

Os transformantes foram selecionados em placas contendo meio LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 0,2 mg/mL de X-Gal e 0,08 mg/mL de IPTG, após semeadura e incubação por 24 h em estufa a 37 ºC. Dentre os transformantes 3 colônias positivas de cada uma das transformações foram selecionadas e o DNA plasmidial foi isolado e em seguida submetido a análise de restrição utilizando as enzimas *Sac*I e *Nde*I. Pposteriormente, o DNA clivado enzimaticamente foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%.

4.15 Subclonagem dos promotores p*hok* e p*sok*

Os transformantes *E.coli*/pGEMPHOK e *E.coli*/pGEMPSOK tiveram os seus DNAs plasmidiais extraídos por meio de maxi preparação segundo Sambrook e Russell (2001), assim como *E. coli* portadora do plasmídeo pBB-EGFP.

Os plasmídeos extraídos foram submetidos a uma digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *Sac*I e *Nde*I, visando o isolamentodos promotores p*hok* e p*sok* provenientes dos plasmídeos pGEMPHOK e pGEMPSOK, respectivamente, e linearizando o vetor pBBEGFP deixando-o com as extremidades coesivas e complementares as extremidades dos promotores. Em seguida, os DNAs digeridos foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8 % e os fragmentos referentes aos promotores e ao vetor foram isolados do gel através do Kit de eluição PCR clean-up and Gel extraction (Macherey-Nagel).

Duas misturas de ligação foram elaboradas de acordo com as instrução do fabricante da T4 DNA Ligase (Invitrogen™, Grand Island, NY, USA): (1) 150 ng do vetor (pBBEGFP), 20 ng do inserto (promotor hok) , 4 µL do Tampão 5X, 0,1 U de T4 DNA Ligase e água Milli-Q para o volume final de 20 µL; (2) - 150 ng do vetor (pBBEGFP), 20 ng do inserto (promotor sok) , 4 µL do Tampão 5X, 0,1 U de T4 DNA Ligase e água Milli-Q para o volume final de 20 µL. Ambas reações de ligação foram incubadas a 24 ℃ por 1 h, em seguida o conteúdo foi diluído 5 vezes. Células eletrocompetentes de *E. coli* foram submetidas a eletroporação com 2 µL da mistura de ligação e semeadas em meio de cultura seletivo.

Duas colônias resistentes a cloranfenicol de cada uma das transformações foram selecionadas, seu DNA plasmidial foi extraído através de mini-preparação de acordo com Sambrook e Russell (2001) e em seguida submetidos a uma dupla digestão enzimática utilizando *Sac*I e *Nde*I e, então, a uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8 %.

4.16 Microscopia de fluorescência

As linhagens recombinantes de *E. coli*, *C. necator e C. metallidurans* foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura rico, LB quando *E. coli* e *C. necator* e CN quando *C. metallidurans*, contendo antibiótico cloranfenicol na concentração

adequada, quando necessário. As culturas foram incubadas sob agitação de 180 rpm, a 28 ºC para *C. metallidurans* e *C. necator*, e 37 ºC quando *E. coli*, até atingirem uma de densidade óptica (DO $_{600nm}$) igual a 1.0. Um volume de 3 mL de cultura foi centrifugado a 10000 g, a 4 ºC, por 5 min, em centrífuga refrigerada de bancada (Jouan MR 18 22). O sedimento foi lavado três vezes com tampão PBS (NaCl 2,5 M, Na_2HPO_4 10 mM, NaH_2PO_4 0,1 M, pH 7,6). As células foram ressuspensas em 50 µL de PBS e a mistura foi fixada em lâmina pela adição de solução de formaldeído 2 % (Merck) em quantidade suficiente para cobrir a lâmina.

As lâminas geradas foram levadas ao microscópio de fluorescência EVOS® FL Digital Fluorescence Microscope (EMS) e fotografadas eletrônicamente.

4.17 Citometria de fluxo

As linhagens transformadas *E. coli*/pHOKEGFP, *E. coli*/pSOKEGFP, *E. coli*/pBBEGFP, *C. metallidurans*/pHOKGFP, *C. metallidurans*/pSOKGFP, *C. metallidurans*/pBBEGFP, *C. necator*/pHOKEGFP, *C. necator*/pSOKEGFP e *C. necator*/pBBEGFP foram cultivadas em 5 mL de meio LB quando *E. coli* e *C. necator,* e em CN quando *C. metallidurans,* sob agitação de 180 rpm de a 28 ºC e 37 ºC para *C. metallidurans*, *C. necator* e *E. coli*, respectivamente, até atingirem $DO_{600\ nm}$ igual a 1.0, diluídas em solução salina (NaCl) 0,9 % a uma concentração de 500 células/µL como especificado pelo equipamento e analisados. A emissão da fluorescência verde em 509 nm foi detectada pelo Guava EasyCyte™ (Millipore) pela excitação das células com laser azul de 488 nm de comprimento de onda. A intensidade relativa de fluorescência foi estimada pela mediana dos dados obtidos como resultado.

A fluorescência basal da célula foi medida utilizando as células portadoras do plasmídeo pBBEGFP, que contém o gene repórter da proteína verde fluorescente sem a regulação de qualquer promotor. Os valores de intensidade média relativa de florescência foram analisados subtraindo o valores da fluorescência basal de cada célula.

O experimento foi realizado em triplicata.

4.18 Estabilidade segregacional

A estabilidade segregacional dos plasmídeos pBBR1MCS, pBBPAR, pCM2 e pCM3 presentes nas linhagens de *E.coli*, *C. metallidurans* e *C. necator* foi examinada de acordo com Menart et al. (2003) com algumas modificações. Meios de cultura sólidos LB, CN, LB e CN cloranfenicol 25 µg/mL e LB cloranfenicol 50 µg/mL foram preparados para o experimento.

Culturas de *E.coli*/pBBR1MCS, *E.coli*/pBBPAR, *E.coli*/pCM2, *E.coli*/pCM3, *C. metallidurans*/pBBR1MCS, *C. metallidurans*/pBBPAR, *C. metallidurans*/pCM2, *C. metallidurans*/pCM3, *C. necator*/PBBR1MCS, *C. necator*/pBBPAR, *C. necator*/pCM2 e *C. necator*/pCM3 foram utilizadas no experimento.

Os pré-inóculos foram devidamente incubados por 16 h, 180 rpm, a 28 ºC quando *C. metallidurans* e *C. necator* e à 37 ºC quando *E. coli*, em meio de cultura contendo cloranfenicol na concentração adequada para seleção de transformantes. Quando as culturas atingiram a fase estacionária de crescimento, uma alíquota foi transferida para um novo meio de cultura sem antibiótico. Este procedimento foi repetido dez vezes. A cada nova transferência de meio, uma alíquota foi submetida a uma diluição seriada, cujas alíquotas foram utilizadas para semeadura em meio de cultura contendo ou não antibiótico.

A estabilidade segregacional foi determinada pela razão entre as unidades formadoras de colônia (UFC) das placas de meio de cultura com antibiótico e aquelas sem a adição de antibiótico em forma de porcentagem das células que ainda portavam os plasmídeos.

O experimento foi realizado em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

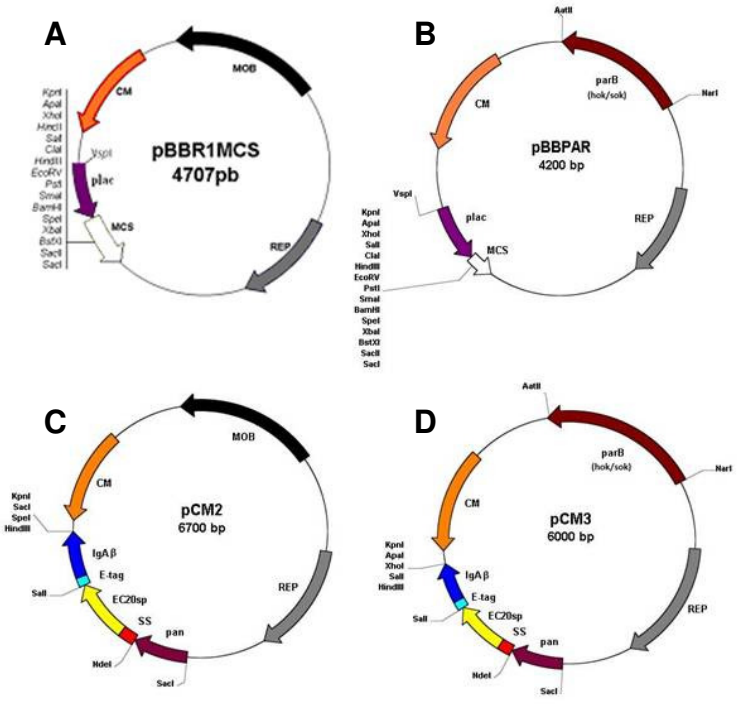
5.1 Estabilidade genética plasmidial

A estabilização da informação genética de linhagens recombinantes é de extrema importância para que se possa empregar a linhagem recombinante em escala industrial.

Buscando vencer estas limitações, utilizou-se o sistema de estabilidade segregacional *hok/sok*, uma vez que esta estratégia apresentou resultados positivos na estabilização plasmidial em *Xanthomonas campestris* (PIMENTA et al., 1992), *E. coli* (KIM; KANG, 1996; MOERLOOZE et al., 1992), *Pseudomonas putida* e *Serratia marcescens* (GERDES, 1988).

Com o objetivo de avaliar a influência do sistema *hok/sok* na estabilidade segregacional, foram realizados estudos nas linhagens de *E. coli, C. metallidurans e C. necator* portadoras dos plasmídeos pBBR1MCS, pBBPAR, pCM2 e pCM3 (Figura 15).

Figura 15 – Mapa dos plasmídeos utilizados no estudo de estabilidade plasmidial



Mapa dos plasmídeos utilizados no experimento de estabilidade segregacional: (A) pBBR1MCS; (B) pBBPAR; (C) pCM2 e (D) pCM3.

O plasmídeo pBBPAR diferencia-se do plasmídeo pBBR1MCS devido à substituição do fragmento de DNA codificador do gene de mobilização (MOB) pelo fragmento de DNA codificador do sistema de estabilidade segregacional *hok/sok*. Da mesma forma, esta diferença existe entre os plasmídeos pCM2 e pCM3.

Assim, foi possível avaliar a influência do sistema *hok/sok* na preservação plasmidial durante a segregação das linhagens. Cabe ressaltar que o plasmídeo pBBR1MCS é um plasmídeo de amplo espectro de hospedagem para bactérias Gram-negativas e que o plasmídeo pCM2 foi construído pela clonagem de um fragmento codificador do sistema de expressão e ancoragem na superfície bacteriana de uma proteína quelante de metais fusionado ao plasmídeo pBBR1MCS, o qual foi construído para aplicação ambiental de recuperação de metais (BIONDO, 2008; BIONDO et al., 2012). Desta forma, tornou-se possível avaliar a influência do sistema *hok/sok* em diferentes linhagens bacterianas, de modo a buscar uma ferramenta biotecnológica para aplicação em linhagens transgênicas visando segurança segregacional e, portanto, que assegure o desempenho da cepa microbiana melhorada geneticamente. Para tanto, as linhagens bacterianas foram cultivadas em meio sem adição de antibióticos e semeadas em meio suplementado ou não com antibiótico. A estabilidade final foi calculada pela razão do número de colônias que sobrevivem em meio sem antibiótico pelo número de colônias crescidas em meio contendo antibiótico.

5.1.1 Estabilidade plasmidial em *E. coli*

Os resultados de estabilidade nas linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho estão apresentados na Figura 15. A linhagem recombinante de *E. coli*/pCM2, mostrou uma acentuada queda na estabilidade após a 48ª geração, sendo que o plasmídeo pCM2 foi perdido pela linhagem após 120 gerações (Figura 16).

As linhagens de *E. coli* portadoras dos plasmídeos pBBPAR e pBBR1MCS atingiram uma estabilidade de 100 % e 78 %, respectivamente, em 120 gerações (Figura 16).

As células portadoras do plasmídeo pCM3 totalmente estáveis ao longo de todo o experimento, mantendo-se em 100 % até 120 gerações. Gerdes (1988)

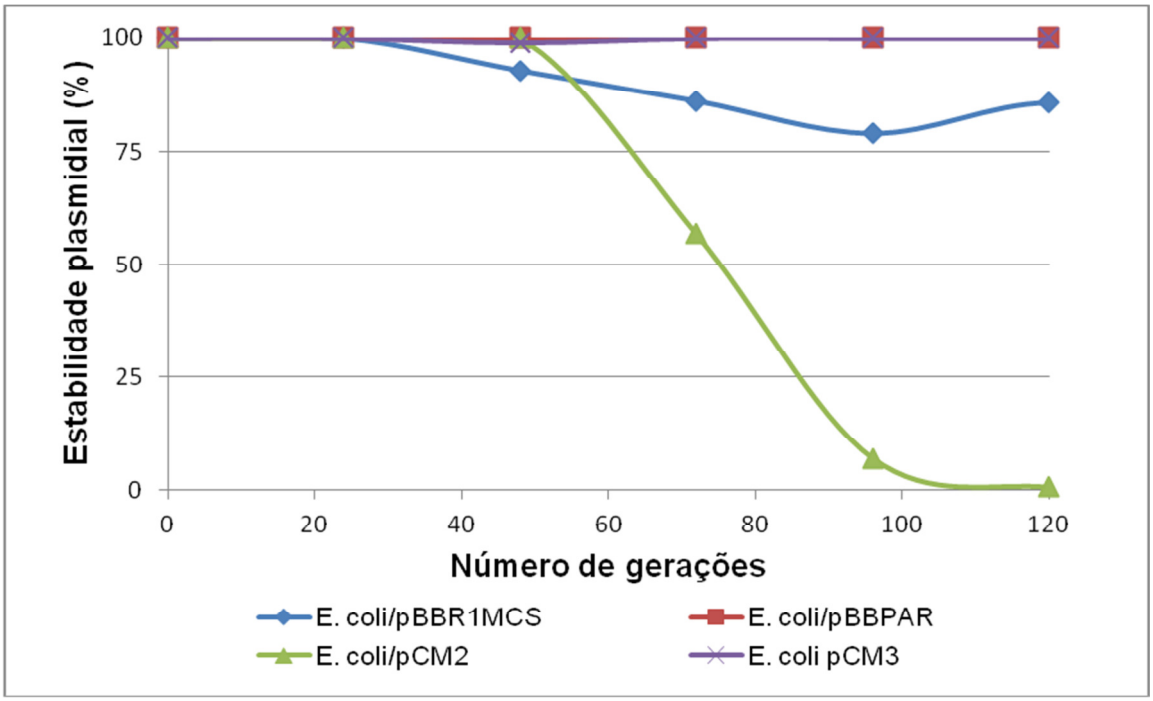
verificou que houve um aumento na estabilidade da informação genética nas culturas portadoras do sistema *hok/sok*, tanto em *Pseudomonas putida,* quanto em *S. marsescens*, concordando com os resultados aqui obtidos.

O fato da linhagem portadora do plasmídeo pCM2 sofrer uma queda brusca na estabilidade segregacional em relação às outras linhagens deva ser causada pela exigência metabólica da célula para a expressão da proteína heteróloga aliado à falta de "pressão seletiva" que garanta a presença do plasmídeo na célula.

Em relação ao plasmídeo pBBR1MCS, Elzer et al. (1995) utilizaram este plasmídeo para transformar a bactéria Gram-negativa *Brucella* sp. e mesmo após 10 dias de cultivo sem pressão seletiva, as células mantiveram o plasmídeo, mostrando elevada estabilidade, resultados estes que reafirmam os resultados obtidos neste trabalho.

Desta forma, os resultados mostraram que a presença do sistema *hok/sok* influenciou positivamente nas linhagens de *E. coli*, trazendo uma grande estabilização segregacional mesmo aos plasmídeos portadores de construções genéticas que exigem das células grande esforço energético, como é o caso do plasmídeo pCM3.

Figura 16 - Estabilidade plasmidial segregacional dos transformantes de *E. coli*



5.1.2 Estabilidade plasmidial em *C. metallidurans*

Assim como para *E. coli*, a linhagem de *C. metallidurans* portadora do plasmídeo pCM2 apresentou uma queda acentuada em sua estabilidade. Neste caso, a queda de estabilidade foi verificada a partir da 25ª geração bacteriana, atingindo 62 % em 150 gerações. Cabe ressaltar, que apenas 12 % de estabilidade foi verificado após 250 gerações (dados não apresentados).

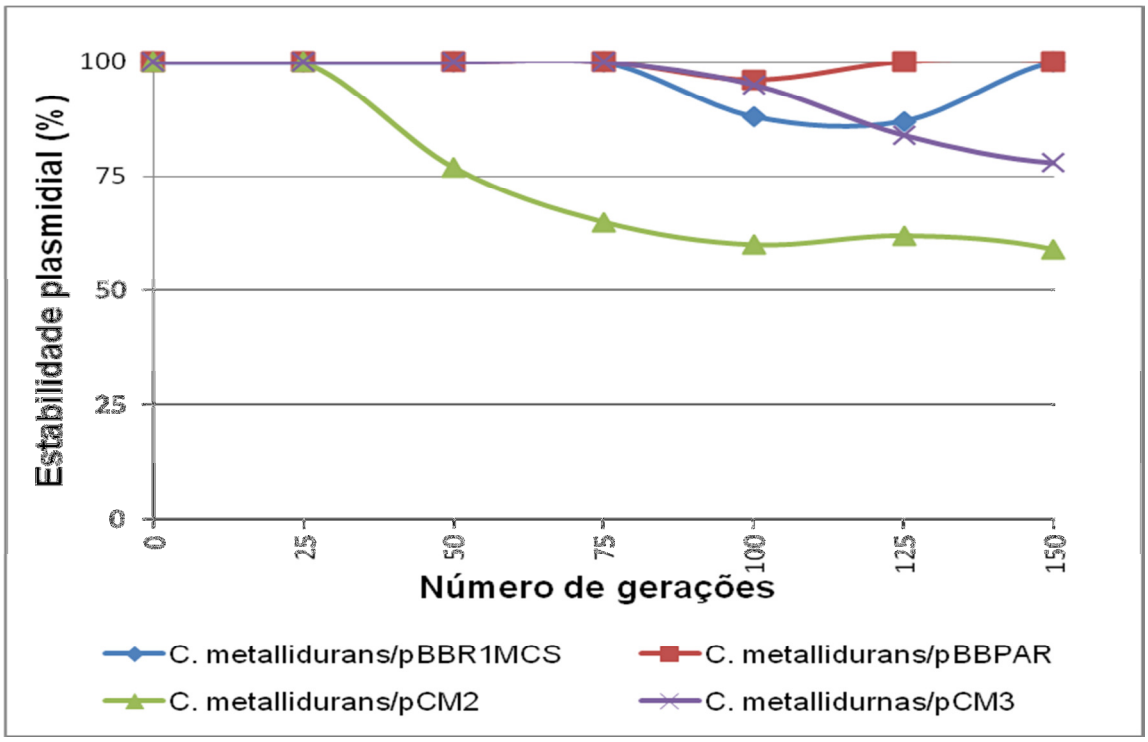
O fator de estabilização plasmidial apresentado pelo plasmídeo pBBPAR se mostrou alto durante todo o experimento, provando que o sistema *hok/sok* funciona como uma excelente ferramenta para estabilização genética com grande potencial biotecnológico para aplicação em linhagens de interesse industrial visando preservar as informações genéticas codificadas em plasmídeos.

A linhagem de *C. metallidurans* portadora do plasmídeo pBBR1MCS também apresentou uma alta taxa de estabilidade, com média de 98 % até a 150 gerações. Porém este plasmídeo possui o fragmento gênico MOB que possibilita a transferência de material genético para outros microrganismos e não é adequado quando quer se evitar a transferência da informação genética de que é portador.

Comparando-se a linhagem *C. metallidurans*/pCM3 à linhagem *C. metallidurans*/pCM2, ambas expressando uma proteína recombinante, o sistema de estabilidade pós-segregacional *hok/sok* aumenta em 26 % a estabilidade genética de *C. metallidurans*/pCM3, pois em 150 gerações 84 % das células portavam o plasmídeo de interesse, enquanto 62 % foi observado para o plasmídeo pCM2 (Figura 17).

Cabe ressaltar que, após 250 gerações, a diferença na porcentagem de estabilidade entre as linhagens de *C. metallidurans* portadoras de pCM2 e pCM3 é de 6 vezes, sendo que, apenas 12 % das células portavam o plasmídeo pCM2, enquanto que 76 % das células portavam o plasmídeo pCM3. Os resultados indicam que a queda da estabilidade segregacional dos plasmídeos em *C. metallidurans* foi muito mais lenta quando comparada à queda em *E. coli,* indicando que a primeira linhagem talvez tenha uma maior similaridade com os elementos genéticos envolvidos na estabilização genética de plasmídeos, tal como a origem de replicação, sistema de partição, etc.

Figura 17 - Estabilidade plasmidial segregacional dos transformantes de *C. metallidurans*

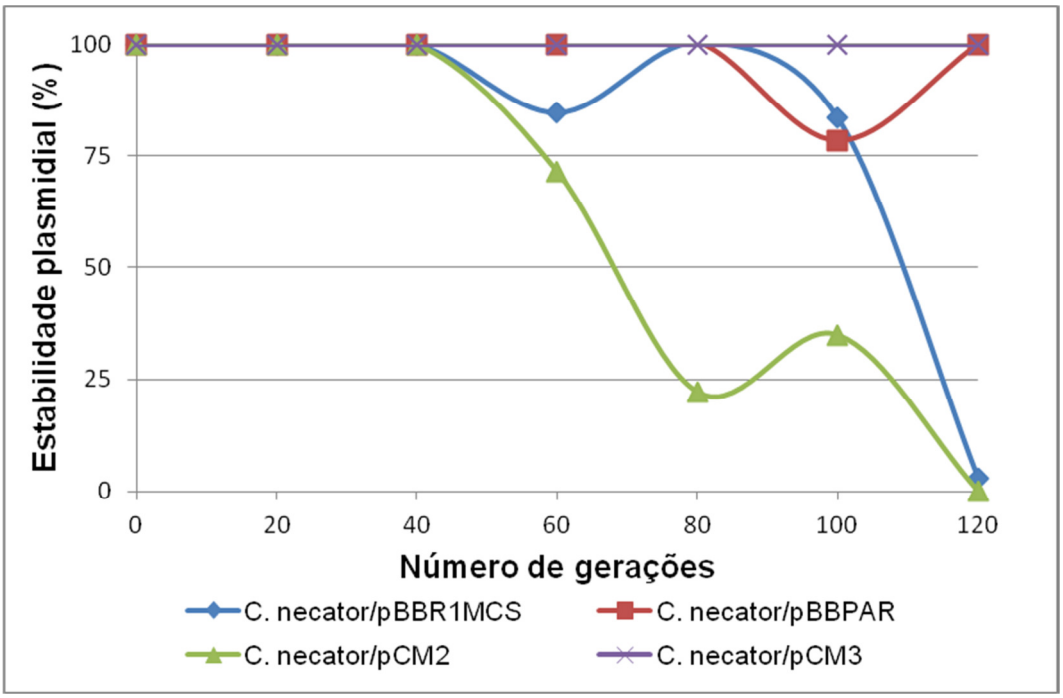


5.1.3 Estabilidade plasmidial em *C. necator*

No caso de células de *C. necator*, portadoras do plasmídeo pCM2, se observou uma queda acentuada a partir da 40ª geração, levando à perda total do plasmídeo em 120 gerações. Diferente dos resultados observados com as outras bactérias testadas, as células de *C. necator*/pBBR1MCS também apresentaram uma queda abrupta do plasmídeo, chegando ao final do experimento em apenas 3 % das células portando este plasmídeo, em discordância do observado por Elzer et al. (1995) quando testado em *Brucella sp*.

Assim como nas outras células testadas, ambos plasmídeos pBBPAR e pCM3 se apresentaram bastante estáveis durante todo o experimento, merecendo especial atenção ao plasmídeo pCM3 que se manteve totalmente estável durante todos os testes biológicos (Figura 18).

Figura 18 - Estabilidade plasmidial segregacional dos transformantes de *C. necator*

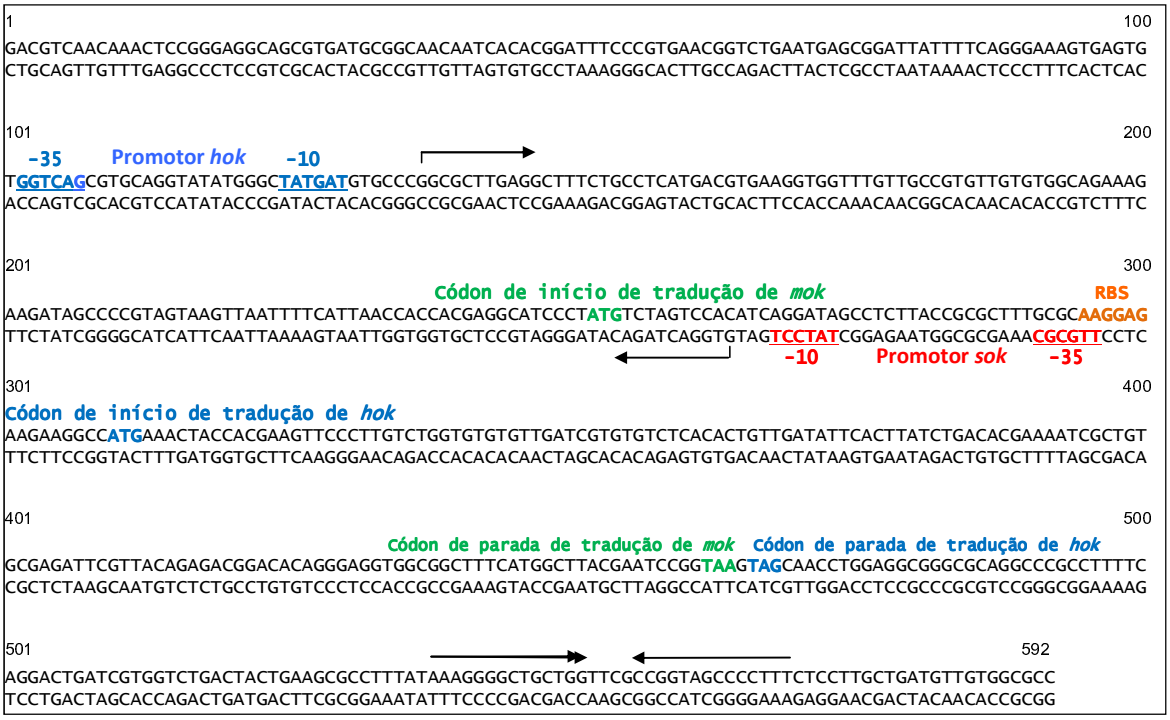


Em suma, neste trabalho foi verificado que a presença do sistema *hok/sok* resultou em grande aumento da estabilidade segregacional dos plasmídeos avaliados. No entanto, algumas diferenças foram detectadas nas diferentes bactérias testadas. Buscando compreender como é o padrão de expressão gênica dos genes *hok* e *sok* nas diferentes bactérias utilizadas no presente trabalho, os promotores de cada gene foram clonados e suas forças de expressão foram avaliadas, visando correlacionar o padrão de estabilidade segregacional com a força da expressão do próprio sistema em cada sistema biológico avaliado.

5.2 Amplificação dos promotores p*hok* e p*sok*

O lócus *parB* presente no plasmídeo R1 de *E. coli* possui região gênica funcional de aproximadamente 580 pb (Figura 19) (GERDES, 1988). O promotor do gene *hok* possui uma distância de 164 nucleotídeos até a sequência de ligação do ribossomo (RBS – ribossome binding site) que fica sobreposto à região -35 do promotor do gene *sok*.

Figura 19 - Sequência do lócus *parB* do plasmídeo R1 de *E. coli*



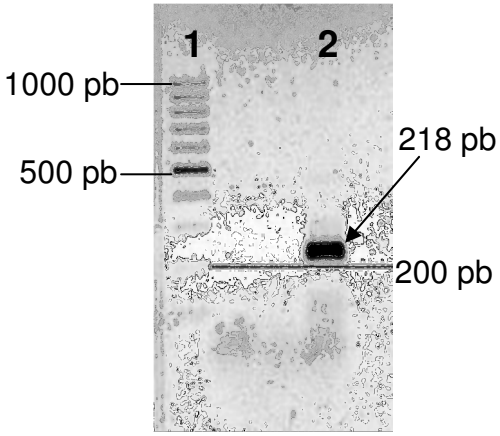
Sequência baseada em Gerdes et al. (1988)

O gene *sok* possui sua fase de leitura na fita complementar à do gene *hok* e não possui RBS e, portanto, o RNA não traduz nenhuma proteína, mas sim interage com o mRNA *mok-hok* na região *sokT*, fato que desencadeia a degradação da dupla fita de RNA (Figura 6B e 7A).

O fragmento de DNA correspondente à região promotora e o RBS do gene *hok* foi amplificado por PCR (Figura 20). Este fragmento de DNA foi amplificado com as extremidades coesivas dos sítios de restrição das enzimas *SacI* e *NdeI*. Este fragmento de DNA que contém 218 pb preserva a distância de 164 nucleotídeos entre sua região promotora e o RBS e modificação da região -10 de p*sok* (Figura 22 B).

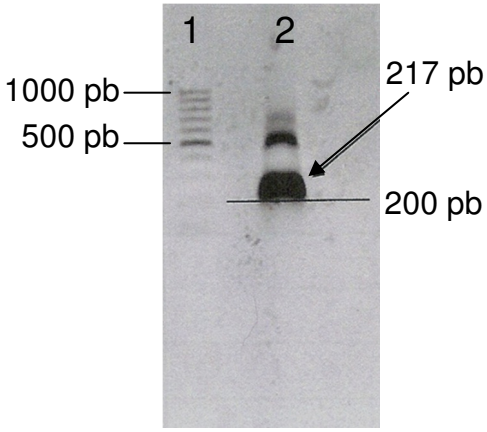
A amplificação da região promotora do gene *sok* foi realizada por PCR, (Figura 21). Neste caso, foi necessária a criação de uma região gênica codificadora de um RBS, similar ao do gene *hok*, preservando a distância de 164 nucleotídeos do promotor e a modificação da região -35 de p*hok* (Figura 22 C).

Figura 20- Perfil de migração do fragmento de PCR do promotor p*hok* após eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio



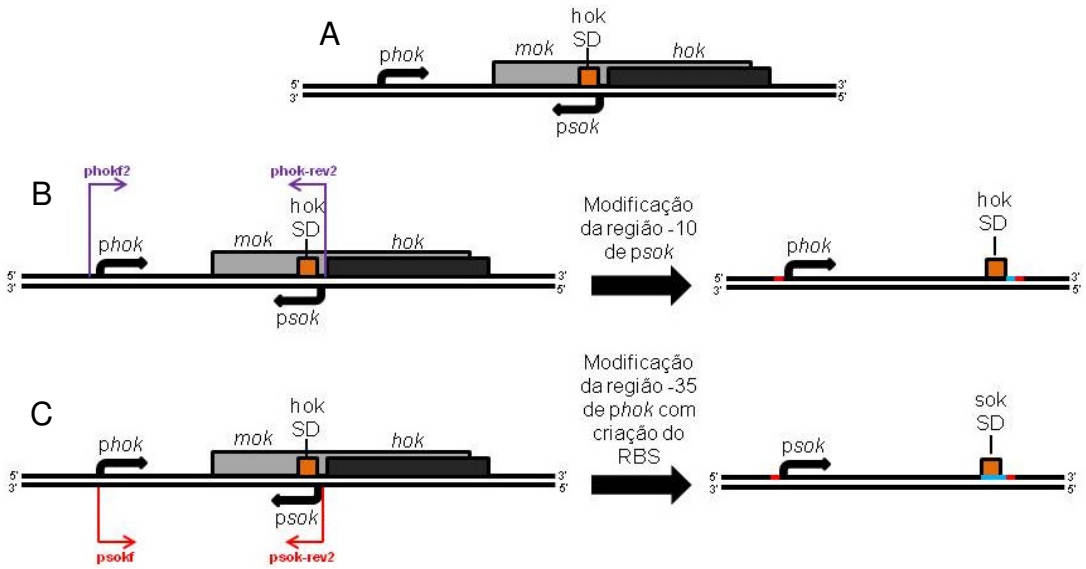
1 – GeneRuler™ 100pb DNA ladder 50 ηg; 2 –PCR do promotor p*hok*.

Figura 21 - Perfil de migração do fragmento de PCR do promotor p*sok* após eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio



1 – GeneRuler™ 100pb DNA ladder 50 ηg; 2 – PCR do promotor p*sok*.

Figura 22 – Organização gênica de *hok/sok* e estratégia de amplificação dos promotores p*hok* e p*sok*



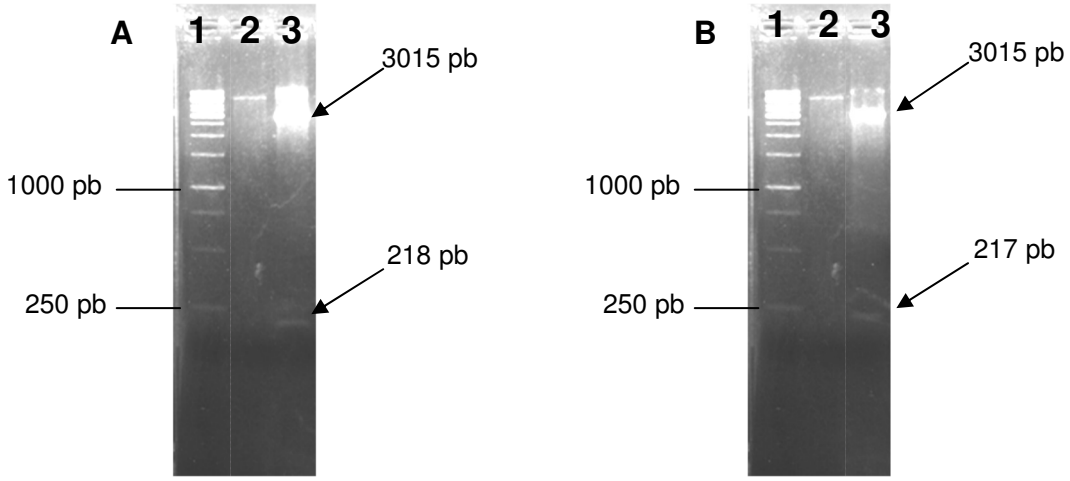
A – Organização gênica do sistema *hok/sok*, a seta preta para a direita indica o promotor *hok*, a seta para a esquerda indica o promotor *sok*, o retângulo cinza indica a região *mok*, a caixa laranja indica a sequência SD de *hok*, o retângulo negro indica a região *hok*;
B – As setas em roxo indicam o local de anelamento dos oligonucleotídeos, o modelo à direita da seta preta apresenta um segmento em azul claro indicando a região modificada da região -10 de p*sok* e os segmentos em vermelho indicam os sítios de restrição para *SacI* antes do promotor e *NdeI* após a sequência SD;
C - As setas em vermelho indicam o local de anelamento dos oligonucleotídeos, o modelo à direita da seta preta apresenta um segmento em azul claro indicando a região modificada da região -35 de p*hok* junto com a caixa laranja acima, indicando a criação da sequência SD e os segmentos em vermelho indicam os sítios de restrição para *SacI* antes do promotor e *NdeI* após a sequência SD criada;

5.3 Clonagem dos promotores p*hok* e p*sok*

Os produtos de PCR correspondentes às regiões promotoras p*hok* e p*sok* foram purificados e clonados no vetor de clonagem pGEM-T-Easy (Promega). As misturas de ligações de cada promotor e vetor foram empregadas na eletroporação de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α e semeadas em meio sólido seletivo.

Foram obtidos 14 transformantes/mL da transformação pGEM-T-Easy + p*hok* e 10 transformantes/mL da transformação pGEM-T-Easy + p*sok*. Foram analisados 3 clones de cada transformação. Após a extração do DNA plasmidial de cada clone, foi realizada uma análise eletroforética após restrição enzimática com as enzimas *SacI* e *NdeI*. Os resultados apresentaram os seguintes perfis nas corridas eletroforéticas: (i) 3015 pb, correspondente ao tamanho do vetor pGEM-T-Easy e outro de 218 pb correspondente ao tamanho da região promotora do gene *hok* (Figura 23 A). O novo plasmídeo foi chamado pGEMPHOK; (ii) 3015 pb correspondente ao vetor pGEM-T-Easy e outro de 217 pb relativo ao tamanho da região promotora p*sok* (Figura 23 B). O novo plasmídeo foi nomeado pGEMPSOK confirmando a clonagem em ambos os casos.

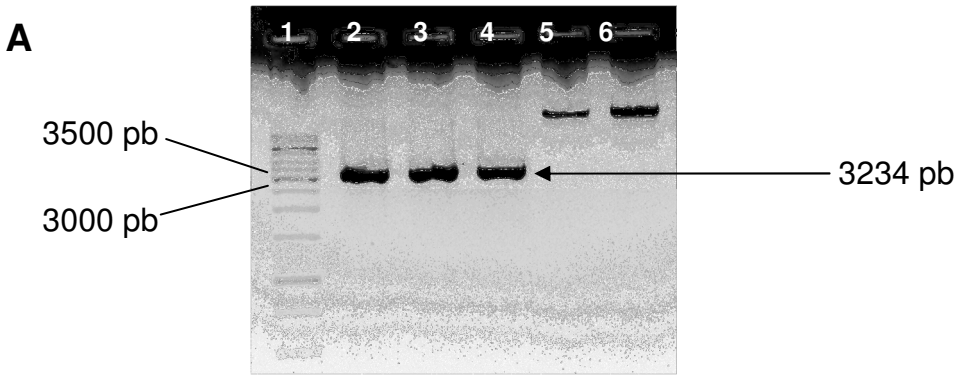
Figura 23 - Perfis de migração de fragmentos de DNA referentes aos promotores p*hok* e p*sok* amplificados por PCR e clonados no vetor pGEM-T Easy após eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio



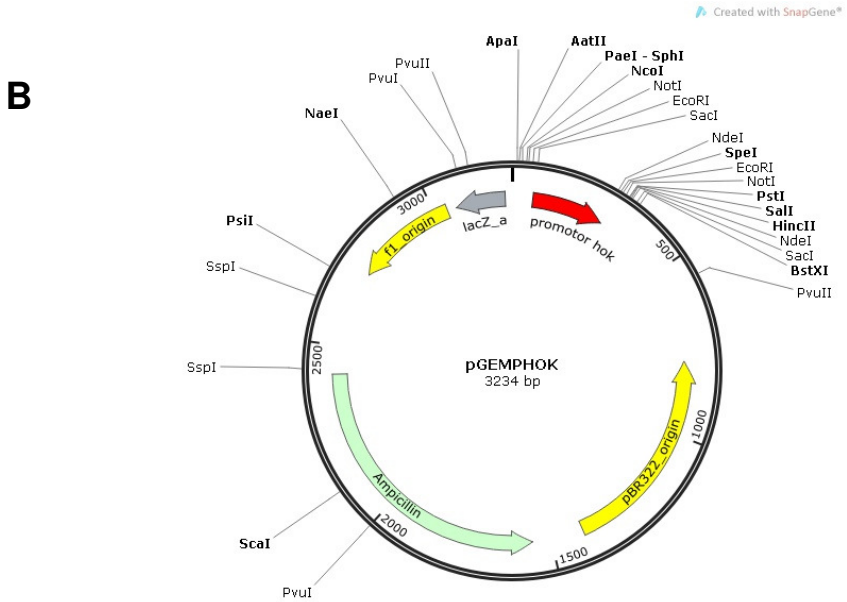
(**A**) 1 - GeneRuler™ 1kb DNA ladder; 2 - pBB-EGFP; 3 – Vetor (3015 pb) e promotor p*hok* (218 pb) (pGEMPHOK); (**B**) 1 - GeneRuler™ 1kb DNA ladder; 2 - pBB-EGFP; 3 – Vetor (3015 pb) e promotor p*sok* (217 pb) (pGEMPSOK). Todos os plasmídeos construídos foram digeridos com *SacI* e *NdeI*.

Uma segunda análise foi realizada com os transformantes. Os clones foram cultivados em meio LB suplementado com o antibiótico requerido e submetido à extração de DNA plasmidial e analisados por restrição enzimática utilizando a enzima *NcoI*, que visou a linearização dos plasmídeos pGEMPHOK (Figura 24) e pGEMPSOK (Figura 25), uma vez que os plasmídeos apresentam sítio único de *NcoI*.

Figura 24 - Perfil de migração do fragmento de DNA linearizado do plasmídeo pGEMPHOK (A) e seu mapa (B)

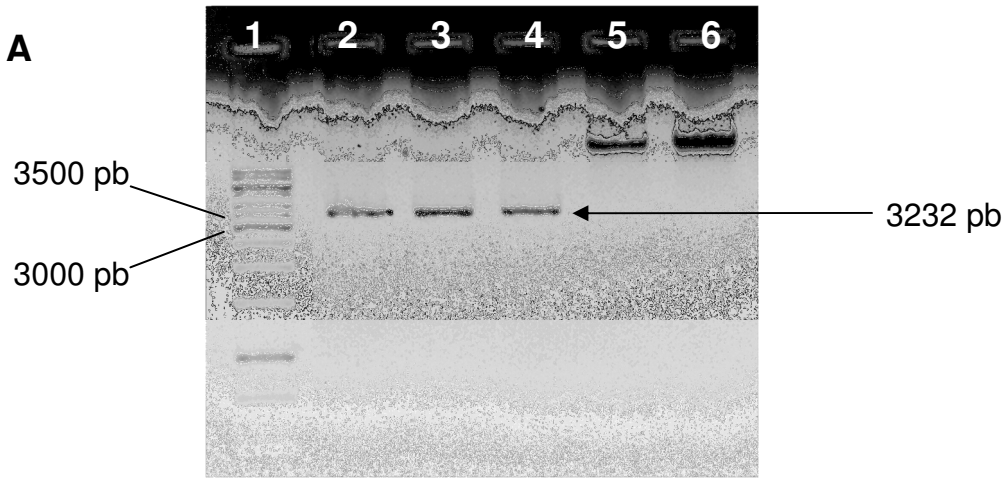


(**A**) 1 - GeneRuler™ 1kb DNA ladder; 2 , 3 e 4 – Extração de DNA plasmidial de pGEMPHOK; 5 – λ DNA 50 ηg e 6 - λ DNA 100 ηg. Todos os plasmídeos foram digeridos com *NcoI*.

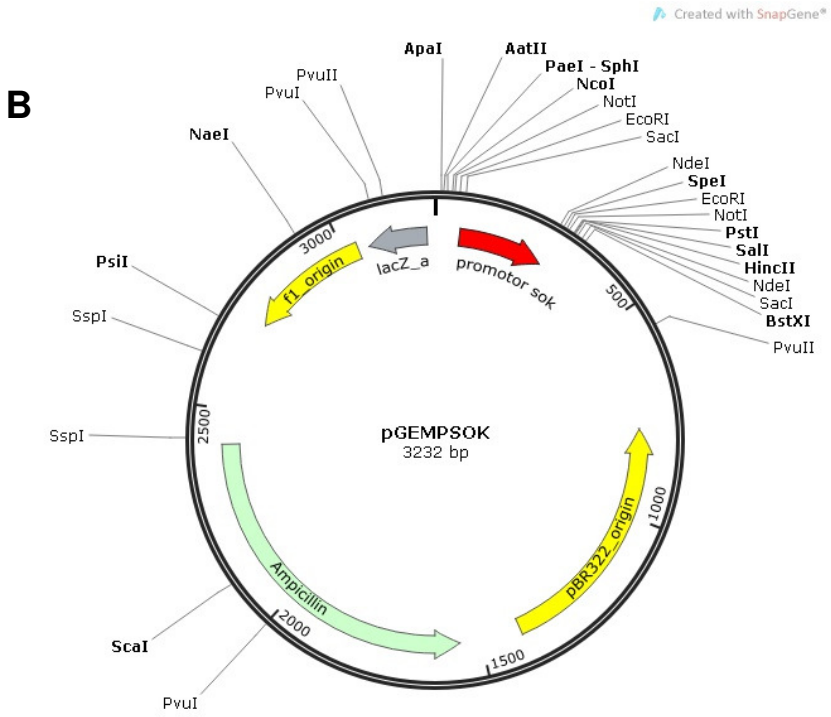


(**B**) mapa representativo do plasmídeo pGEMPHOK.

Figura 25 - Perfil de migração do fragmento de DNA linearizado do plasmídeo pGEMPSOK (A) e seu mapa (B)



(**A**) 1 - GeneRuler™ 1kb DNA ladder; 2 , 3 e 4 – Extração de DNA plasmidial de pGEMPSOK; 5 – λ DNA 50 ηg e 6 - λ DNA 100 ηg. Todos os plasmídeos foram digeridos com *NcoI*.



(**B**) mapa representativo do plasmídeo pGEMPSOK.

As análises de restrição As análises restrição mostraram que os plasmídeos pGEMPHOK (3234 pb) e pGEMPSOK (3232 pb), foram construídos com sucesso.

5.4 Sequenciamento e análise dos insertos

Após a análise de restrição enzimática, a confirmação das corretas sequências clonadas foi realizada por meio de sequenciamento dos fragmentos de DNA p*hok* (218 pb) e p*sok* (217 pb). Os resultados do sequenciamento foram analisados por alinhamento múltiplo, utilizando a ferramenta ClustalW2, com as sequências das regiões promotoras descrita na literatura (GERDES et al., 1988) (Figura 26). Os resultados confirmaram a integridade das sequências dos promotores p*hok* e p*sok* clonadas.

Figura 26 - Alinhamento de sequências para confirmação da integridade do promotor p*hok*

Sequencia parcial do plasmídeo pGEMPHOK alinhada com a sequência descrita da região promotora *hok*.

Conforme mencionado, a região -35 do promotor *sok* se encontra sobreposta a região RBS de *hok*. Este fato impediu então a modificação de sua sequencia de DNA e, assim, houve a necessidade de alterar a porção -10 do promotor p*sok* para que não houvesse a interferência deste na regulação da região promotora p*hok* na expressão da *EGFP* nos estudos futuros.

As bases que foram modificas propositalmente foram confirmadas, nas posições 242, 244 e 246 do alinhamento e estão realçadas em azul (Figura 26).

Assim, como já descrito anteriormente para o promotor p*hok*, os dados do sequenciamento de *sok* foi analisado por alinhamento múltiplo, utilizando a ferramenta ClustalW2, com as sequências das regiões promotoras descrita na literatura (GERDES et al., 1988) (Figura 27). Os sítios de restrição das enzimas *SacI* e *NdeI* estão destacados em vermelho e serviram como sítios de restrição para o isolamento da sequência do promotor e para subclonagens no vetor pBBEGFP, visando verificar sua força de expressão pela medição em citometria de fluxo o produto do gene repórter *da proteína verde-fluorescente EGFP* e comparar ao promotor p*hok*. Também neste casso, foi necessário alterar bases nitrogenadas da posição 265-283 da sequência o que foi confirmado com sucesso. Tais modificações são devidas ao fato de que foi necessária a criação de um RBS, uma vez que o gene *sok* não o possui. Esta construção foi realizada de modo a preservar os 164 nucleotídeos de distância entre o promotor e o RBS que existe para *hok* e agora criada para *sok*, podendo assim analisar com maior precisão a diferença na força de expressão entre os promotores p*hok* e p*sok*.

Figura 27 - Alinhamento de sequências para confirmação da integridade do promotor p*sok*

Sequência parcial do plasmídeo pGEMPSOK alinhada com a sequência descrita da região promotora *sok*.

5.5 Clonagem dos promotores no plasmídeo de expressão da *EGFP*

5.5.1 Construção do plasmídeo pPHOKEGFP

A construção do plasmídeo pPHOKEGFP foi realizada pela subclonagem do promotor p*hok* a montante do gene EGFP (Figura 28). Para tanto foi realizada uma digestão enzimática do vetor pBBEGFP, portador do gene repórter da EGFP, utilizando as enzimas de restrição *SacI* e *NdeI*. As mesmas enzimas foram empregadas na digestão do plasmídeo pGEMPHOK, cuja digestão libera o fragmento de DNA referente à sequência gênica do promotor p*hok*.

Após a digestão enzimática, o vetor linearizado pBBEGFP e a sequência gênica referente ao promotor p*hok* foram isolados, purificados e fusionado. A mistura de ligação foi utilizada eletroporar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α.

Após a seleção de transformantes, o DNA plasmidial foi isolado e analisado. Para tanto, a confirmação da construção do vetor pPHOKEGFP foi primeiramente realizada por digestão com as enzimas *SacI* e *NdeI*, seguida de análise eletroforética dos fragmentos. O resultado mostrou um fragmento de 5492 pb, referente ao vetor pBBEGFP e outro de 209 pb, referente ao promotor p*hok* (Figura 29). Em seguida foi realizado o sequenciamento da sequência gênica referente à fusão p*hok*EGFP.

O resultado do sequenciamento foi utilizado para um alinhamento múltiplo de sequências de DNA e os resultados confirmaram a integridade das sequências do promotor p*hok* fusionado no comando do gene da *EGFP* (Apêndice A).

Figura 28 - Esquema de construção do vetor de expressão pPHOKEGFP

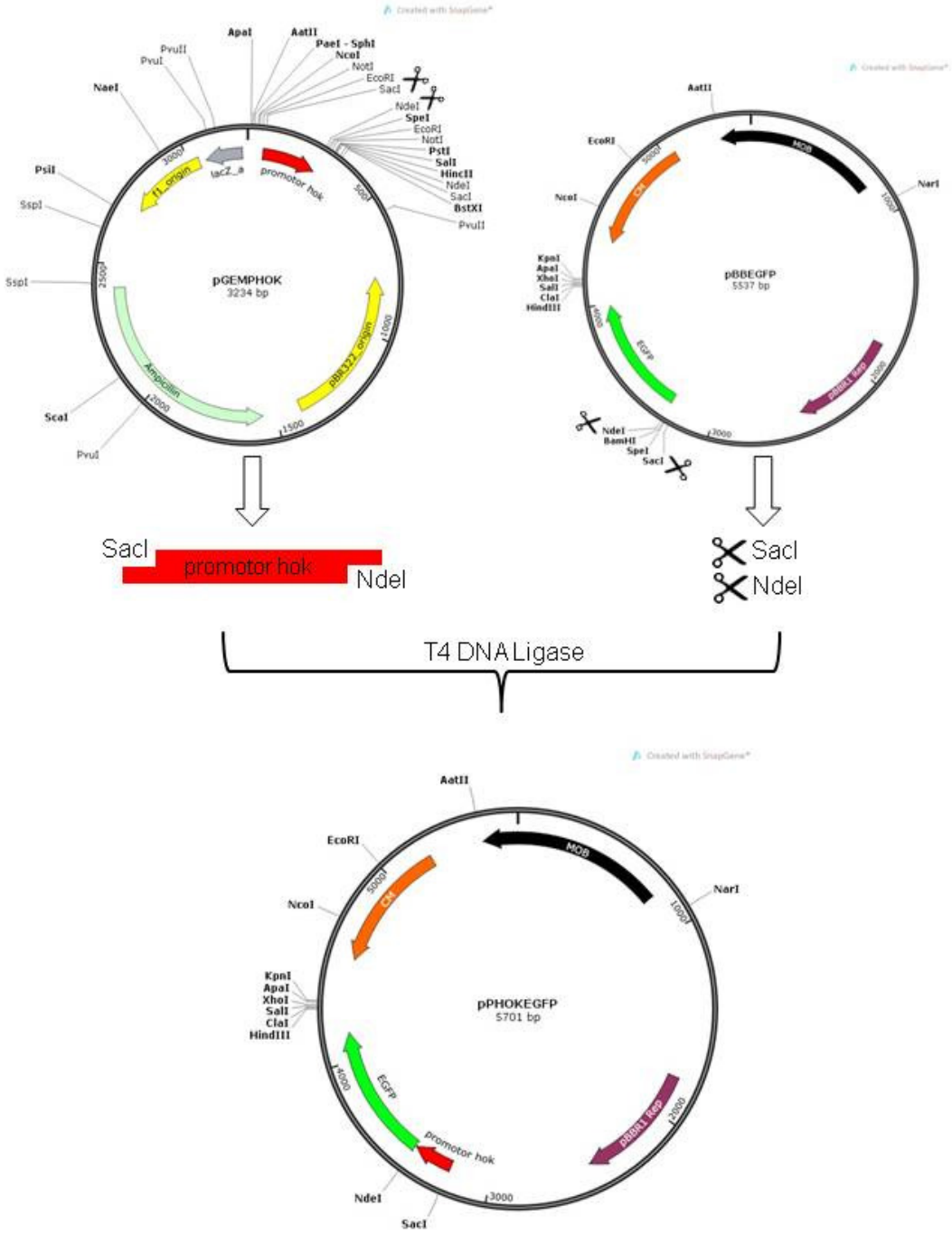
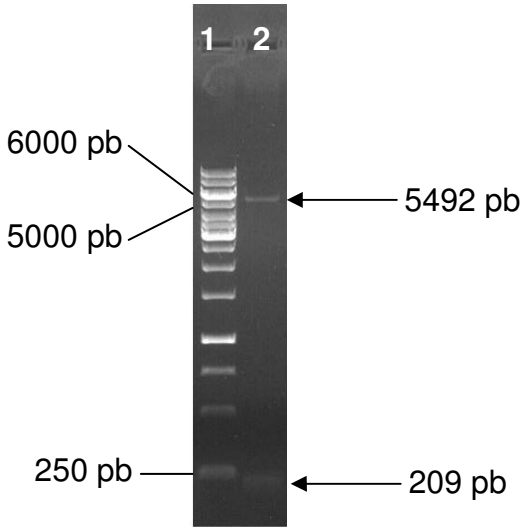


Figura 29- Perfil de migração de fragmentos de DNA correspondente ao promotor p*hok* clonado no vetor pBBEGFP após eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio



1 - GeneRuler™ 1kb DNA ladder; 2 – Vetor (5492 pb) e promotor p*hok* (209 pb) (pPHOKEGFP). O plasmídeo foi digerido com *SacI* e *NdeI*

5.5.2 Construção do plasmídeo pPSOKEGFP

A construção do plasmídeo pPSOKEGFP foi realizada pela subclonagem do promotor p*sok* a montante do gene *EGFP* (Figura 30). Para tanto foi realizada uma digestão enzimática do vetor pBBEGFP, portador do gene repórter da *EGFP*, utilizando as enzimas de restrição *SacI* e *NdeI*. As mesmas enzimas foram empregadas na digestão do plasmídeo pGEMPSOK, cuja digestão libera o fragmento de DNA referente à sequência gênica do promotor p*sok*.

Após a digestão enzimática, o vetor linearizado pBBEGFP e a sequência promotora p*sok*, foram isolados, purificados e fusionados. A mistura de ligação foi utilizada para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α.

Após a seleção de transformantes, o DNA plasmidial destes foi isolado e analisado. Para tanto, a confirmação da construção do vetor pPSOKEGFP foi primeiramente realizada com a digestão dupla utilizando as enzimas *SacI* e *NdeI* e análise eletroforética dos fragmentos. O resultado mostrou um fragmento de 5492 pb, referente ao vetor pBBEGFP e outro de 208 pb, referente ao promotor p*sok*

(Figura 31). Em seguida foi realizado o sequenciamento da sequência gênica referente à fusão p*sok*EGFP.

O resultado do sequenciamento foi utilizado para um alinhamento múltiplo de sequências de DNA e os resultados confirmaram a integridade das sequências do promotor *sok* fusionado no comando da *EGFP* (Apêndice B).

Figura 30 - Esquema de construção do vetor de expressão pPSOKEGFP

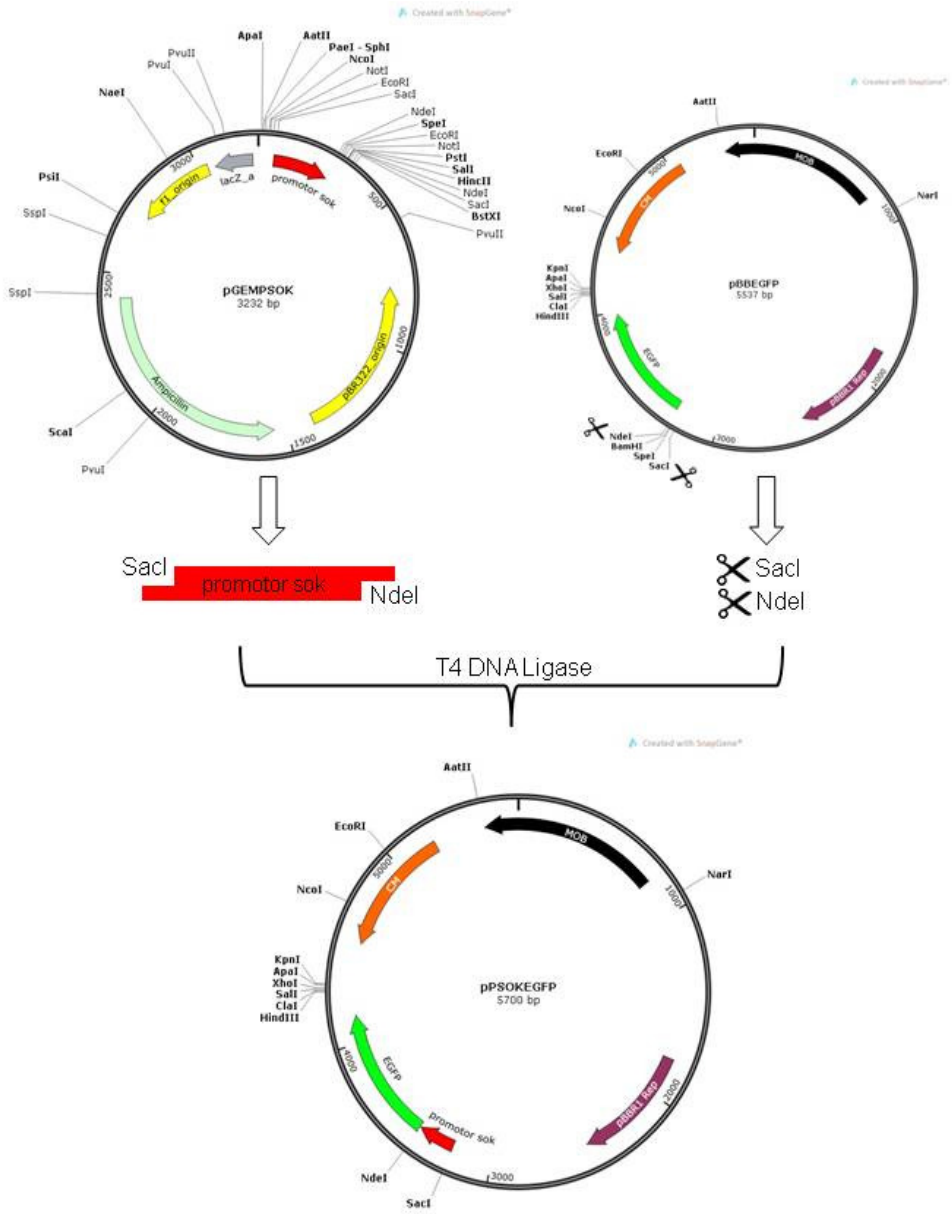
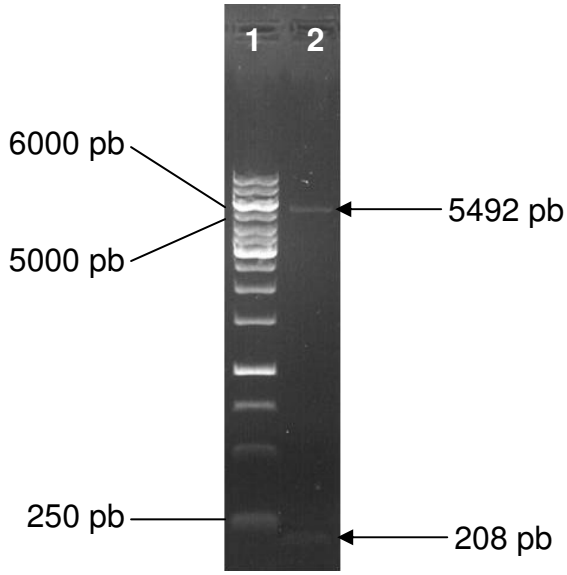


Figura 31 – Perfil de migração de fragmentos de DNA referentes ao promotor p*sok* clonado no vetor pBBEGFP após eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio



5.6 Microscopia de fluorescência

Com o objetivo de avaliar a força da expressão da proteína *EGFP* sob o comando dos promotores p*hok* e p*sok* nas diferentes bactérias utilizadas no presente trabalho, se utilizou a microscopia de fluorescência buscando avaliar qualitativamente a força de cada promotor.

Então a título de comparação visual foram utilizados outros dois plasmídeos, o plasmídeo pBBEGFP, que não apresenta fluorescência, como controle negativo e o plasmídeo pBB-lacEGFP, que possui a expressão da *EGFP* sob o comando do promotor *lac*, como controle positivo.

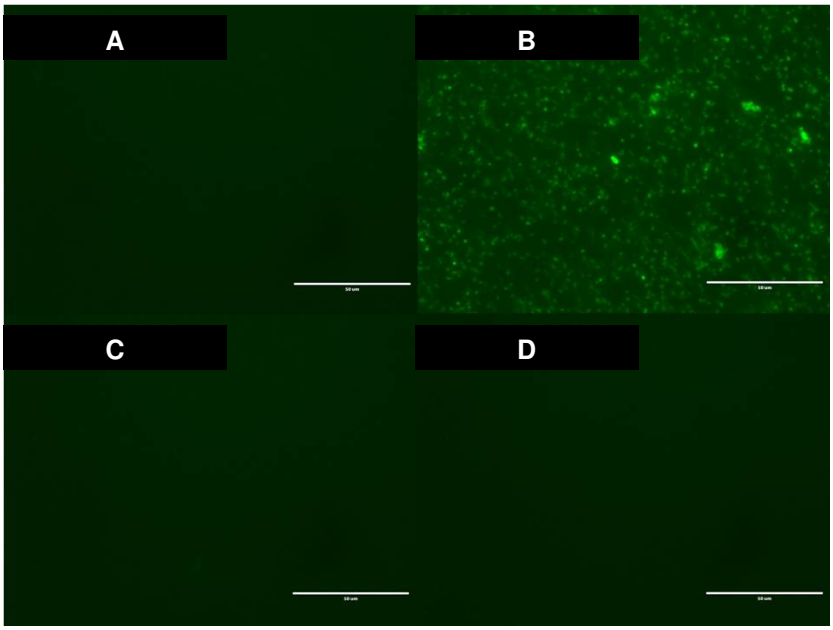
5.6.1 Microscopia de fluorescência das linhagens de *E. coli*

Células de *E. coli* portadoras dos plasmídeos pPHOKEGFP e pPSOKEGFP foram cultivadas e a expressão da proteína repórter EGFP, em cada construção, foi analisada. Para tanto, se utilizou como padrão uma linhagem de *E. coli* portadora da construção pBB-lacEGFP, na qual o gene EGFP está sob o comando do promotor p*lac* do operon de lactose. Como pode se observar a análise qualitativa não permitiu

detectar a expressão visual em microscópio nas cepas de *E. coli* portando os plasmídeos pPHOKEGFP e pPSOKEGFP e somente a linhagem portando o plasmídeo pBB-lacEGFP mostrou fluorescência (Figura 32).

Segundo Patterson et al. (1997), pelo menos 10.000 moléculas de *EGFP* são necessárias no citoplasma da célula para detecção por microscopia de fluorescência e, consequentemente, sua detecção e quantificação devem ser realizadas por métodos mais sensíveis, como a citometria de fluxo, que permite detectar fluorescência abaixo dos limites da microscopia.

Figura 32 - Visualização de células de *E. coli* em microscópio de epifluorêscencia com aumento de 60 vezes.



Fotografia da microscopia de fluorescência dos transformantes de *E. coli* com os plasmídeos: A – pBBEGFP; B – pBB-lacEGFP; C – pPHOKEGFP e D – pPSOKEGFP.

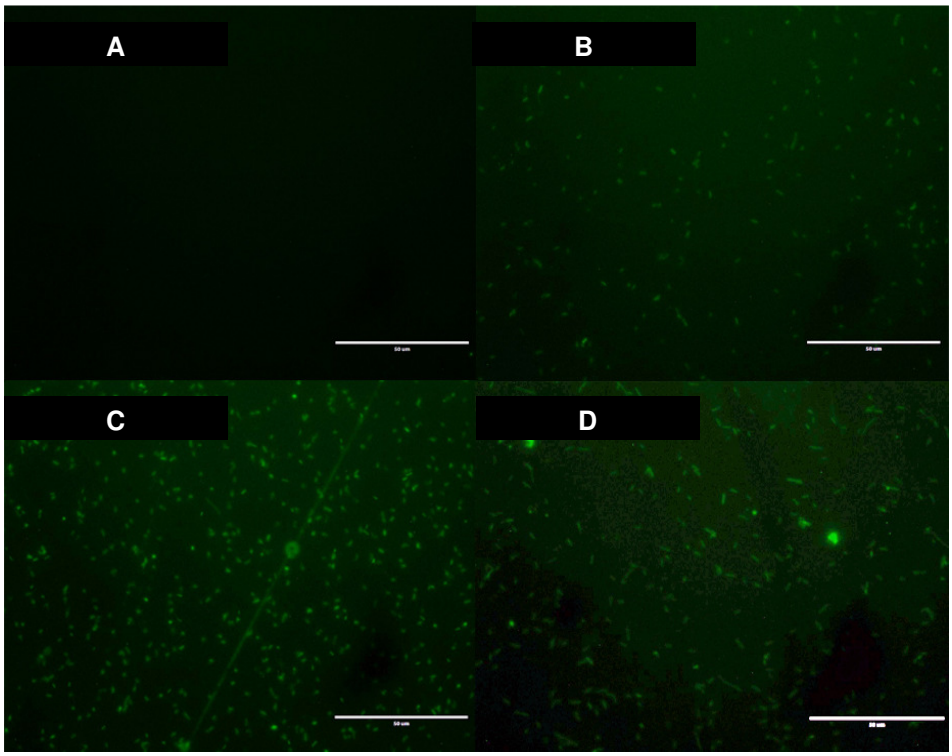
5.6.2 Microscopia de fluorescência das linhagens de *C. metallidurans*

Na Figura 33, são apresentadas células de *C. metallidurans* portadoras dos plasmídeos pBBEGFP; pBB-LacEGFP e com os plasmídeos pPHOKEGFP e pPSOKEGFP visualizadas por microscopia.

Os resultados mostraram que houve expressão significativa da EGFP que permitiu visualização qualitativa nas linhagens portadoras dos plasmídeos

pPHOKEGFP e pPSOKEGFP e daquelas portadoras de pBB-lacEGFP. Posteriormente, a expressão foi quantificada por citometria de fluxo. Este resultado biológico confirmou que os promotores foram clonados adequadamente e que estão funcionais.

Figura 33 - Visualização de células de *C. metallidurans* em microscópio de epifluorêscencia com aumento de 60 vezes



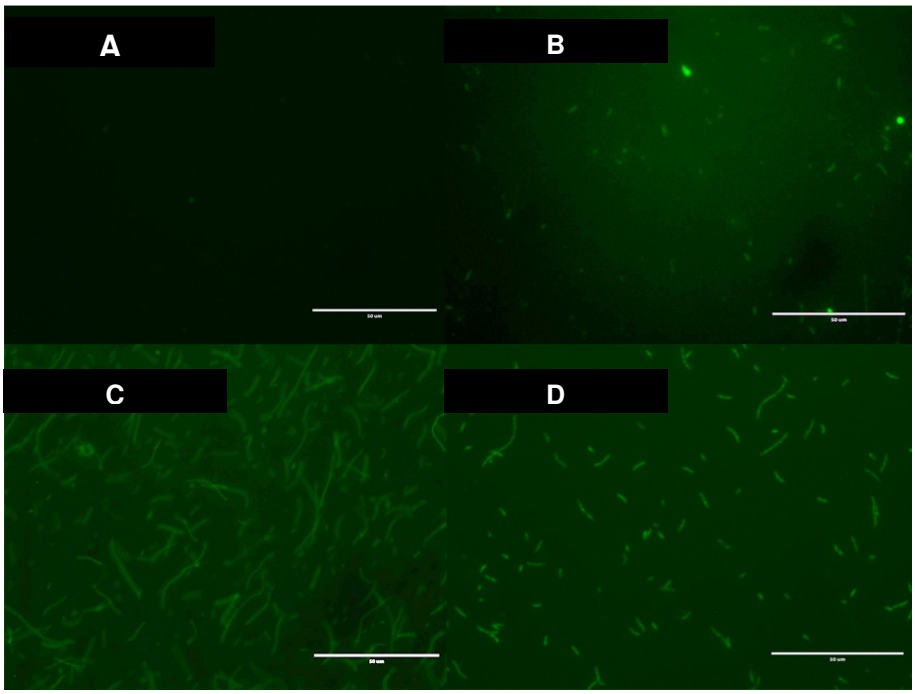
Fotografia da microscopia de fluorescência dos transformantes de *C. metallidurans* com os plasmídeos: A – pBBEGFP; B – pBB-lacEGFP; C – pPHOKEGFP e D – pPSOKEGFP.

5.6.3 Microscopia de fluorescência das linhagens de *C. necator*

A Figura 34 mostra os resultados da visualização microscópica das células de *C. necator* transformadas com os plasmídeos pBBEGFP (controle negativo); pBB-LacEGFP (controle positivo), e os plasmídeos pPHOKEGFP e pPSOKEGFP.

Assim como para os transformantes de *C. metallidurans*, os transformantes de *C. necator* apresentaram expressão da EGFP nas construções sob o comando dos promotores p*hok*, p*sok* e p*lac* comprovando a funcionalidade dos promotores clonados.

Figura 34- Visualização de células de *C. necator* em microscópio de epifluorêscencia com aumento de 60 vezes



Fotografia da microscopia de fluorescência dos transformantes de *C. necator* com os plasmídeos: A – pBBEGFP; B – pBB-lacEGFP; C – pPHOKEGFP e D – pPSOKEGFP.

5.7 Intensidade de fluorescência medida por citometria de fluxo nas linhagens de *E. coli*, *C. metallidurans* e *C. necator*

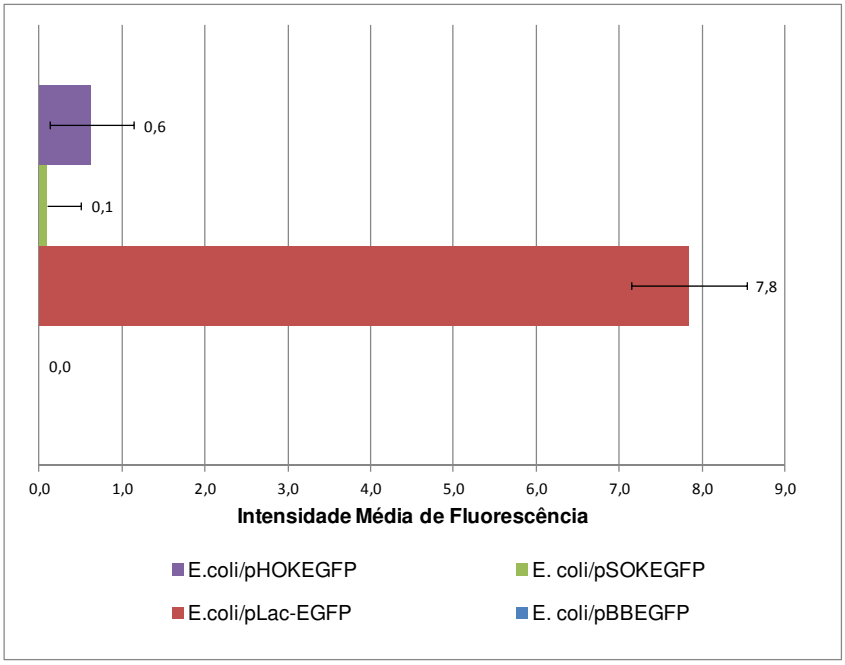
A citometria de fluxo é uma técnica que mede e analisa simultânea e individualmente, as múltiplas características de uma partícula ou células suspensas, nas quais incide um foco de luz (laser), permitindo a detecção das suas características através de um leitor óptico ligado a um computador. Dentre os parâmetros possíveis de serem medidos por citometria de fluxo, estão o tamanho, a granulosidade, complexidade interna, e a fluorescência das células (RIESEBERG et al., 2001).

Devido à necessidade de quantificar e comparar os níveis de fluorescência nas diferentes construções, todas as linhagens foram analisadas por essa técnica, *E. coli, C. metallidurans* e *C. necator*. A intensidade de fluorescência relativa permitiu analisar a capacidade de cada promotor em expressar o gene repórter.

5.7.1 Análise por citometria de fluxo das linhagens recombinantes derivadas de *E. coli*

Os resultados de expressão de *EGFP* obtidos com os clones recombinantes de *E. coli* mostraram que o promotor p*hok* promoveu 6 vezes mais a expressão da EGFP quando comparado ao promotor p*sok*. Em relação ao promotor p*lac*, a expressão de p*hok* e p*sok* foi 13 e 78 vezes menor, respectivamente. Tal resultado ajuda a explicar a ausência de fluorescência no experimento de visualização microscópica, uma vez que, a técnica de citometria é mais sensível no aspecto da detecção da fluorescência (Figura 35).

Figura 35 – Análise por citometria de fluxo das linhagens recombinantes de *E. coli*

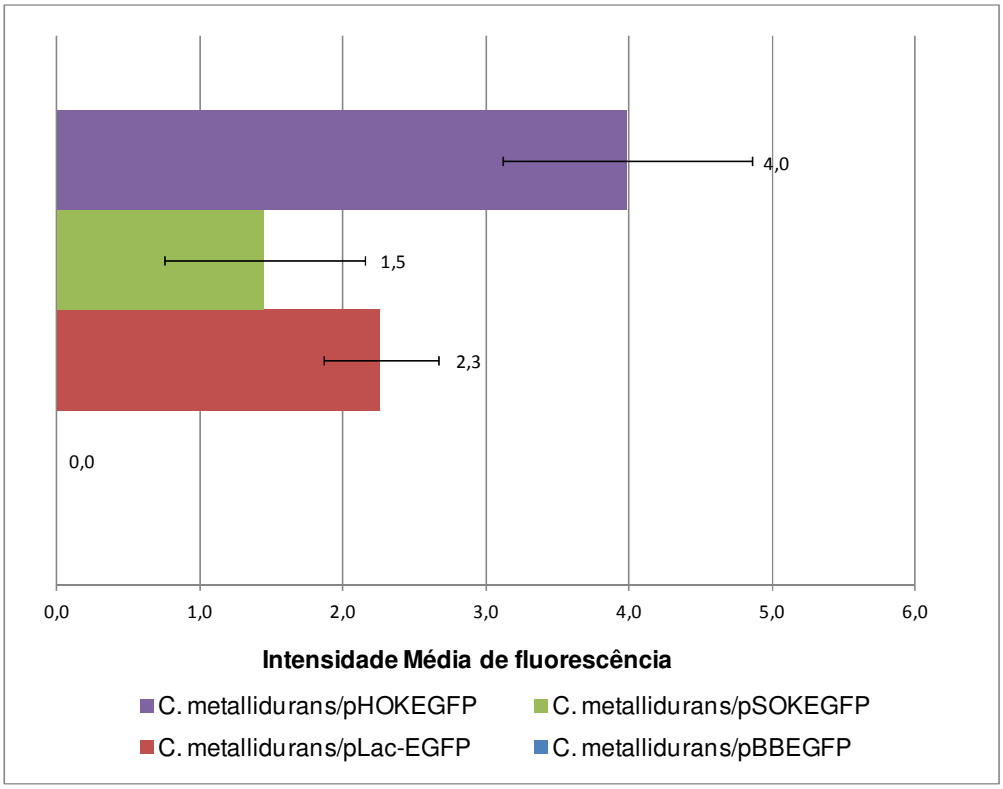


5.7.2 Análise por citometria de fluxo das linhagens recombinantes derivadas de *C. metallidurans*

Os resultados em *C. metallidurans*, mostraram que promotor p*hok* expressou 0,57 vezes mais a *EGFP* quando comparado ao promotor *lac* e 2,88 vezes mais que o promotor p*sok*. Contudo se compararmos as diferenças nos níveis de expressão da *EGFP* pelos promotores p*lac*, p*hok* e p*sok* entre as bactérias *E. coli* e *C. metallidurans* podemos observar uma grande mudança. Enquanto em *E. coli* os

níveis de expressão foram baixos para os promotores p*hok* e p*sok* um panorama diferente foi observado em *C. metallidurans* (Figura 36).

Figura 36 - Intensidade média de fluorescência dos transformantes de *C. metallidurans*

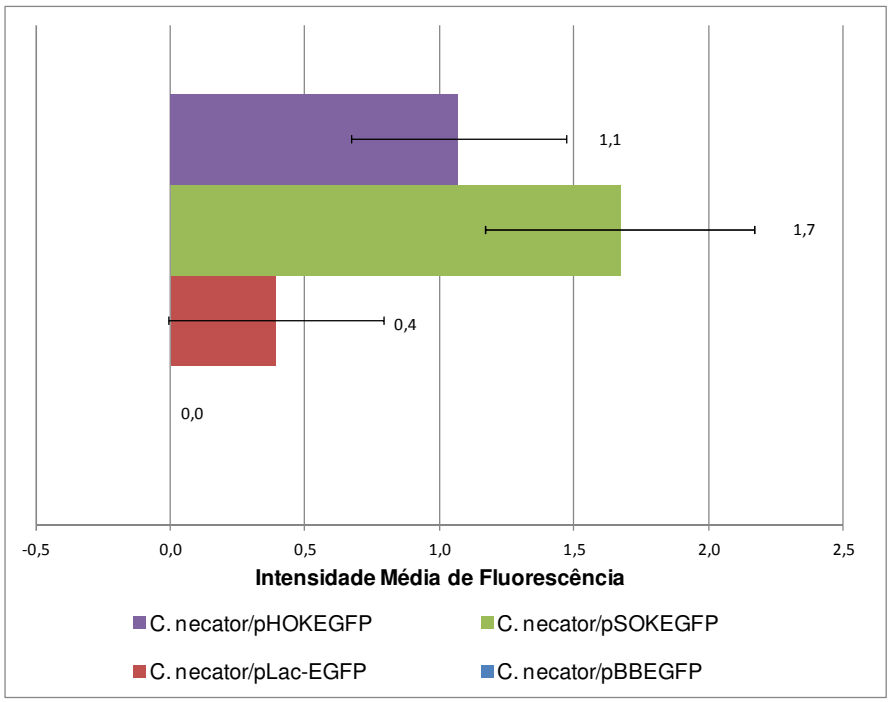


5.7.3 Análise por citometria de fluxo das linhagens recombinantes derivadas de *C. necator*

Observando os resultados obtidos para as linhagens recombinantes de *C. necator*, podemos constatar que o promotor p*sok* expressou a EGFP 0,65 vezes mais que o promotor p*hok* e 4,25 vezes mais que nível de expressão promovido pelo pelo promotor p*lac* (Figura 37).

O mesmo fenômeno foi observado no presente trabalho com as linhagens de *C. metallidurans* onde o nível de expressão da EGFP sob o comando do promotor *lac* foi menor do que em *E. coli*.

Figura 37 - Intensidade média de fluorescência dos transformantes de *C. necator*



5.8 Correlação entre a força de expressão dos promotores p*hok* e p*sok* e a estabilidade genética plasmidial conferida pelo sistema *hok/sok*

O arcabouço genético e metabólico difere para cada linhagem bacteriana e, de fato, acarreta em diferentes níveis de expressão genética levando, consequentemente, a respostas fisiológicas variadas.

Neste contexto, os resultados apresentados no presente trabalho, mostram que apesar de diferentes níveis de expressão da *EGFP* pelas bactérias avaliadas, houve uma grande estabilização segregacional.

Em *E. coli*, os plasmídeos portadores do sistema *hok/sok* se mostraram totalmente estáveis, enquanto aqueles que não possuíam este sistema foram perdidos pela bactéria. Com o objetivo de se correlacionar a estabilidade aos níveis de expressão dos promotores presentes neste sistema, avaliou-se a força de expressão da *EGFP* dos promotores p*hok* e p*sok*.

Na bactéria *E. coli*, os resultados mostraram que os promotores expressaram a *EGFP* em diferentes níveis, sendo que a expressão promovida por p*hok* foi superior à expressão promovida por p*sok*. Segundo Gerdes et al. (1988), o promotor p*sok* é um promotor forte e tem sua atividade maior que o promotor p*hok* em *E. coli*.

Apesar disso, os resultados aqui apresentados mostraram que na linhagem de *E. coli* utilizada provavelmente a tradução do mRNA codificador de Hok foi inibido pelo RNA antisenso *sok*, mesmo este último expresso em menor nível. Cabe ressaltar também que o RNA de sok é uma molécula pequena em comparação ao mRNA de *mok-hok*, e que a expressão de *sok* seja suficiente para produzir o nível de moléculas antisenso suficientes para inibir a tradução de Hok.

Além disso, a expressão gênica é resultado de um complexo de fatores que desencadeiam tanto mecanismos de transcrição quanto mecanismos de tradução Meng et al. (2013). Um desses fatores é a região codificadora de um promotor de expressão (e.g., a região -10/-35 e o RBS) é de fundamental importância e tem sido intensamente estudado (BEREZHNOY; SHCKORBATOV, 2005).

Na Tabela 6, a sequência promotora consenso de *E. coli* e comparada com os promotores do sistema *hok/sok* e outros três promotores conhecidos: *recA*, *araBAD* e p*lac*.

Tabela 6 - Comparação entre as sequências promotoras de *E. coli* e promotores do sistema *hok/sok*

	-35	**espaçamento (pb)**	**-10**
Consenso	TTGACA	-------- 17±1 --------	TATAAT
Promotor *hok*	TGGTCA	--------- 18 --------	TATGAT
Promotor *sok*	TTGCGC	--------- 17 --------	TATCCT
Promotor *recA*	TTGATA	---------- 16 ---------	TATAAT
Promotor *araBAD*	CTGACG	---------- 18 ---------	TACTGT
Promtor *lac*	TTTACA	---------- 18 ---------	TATGTT

Conforme observado na Tabela 6, as bases nitrogenadas destacadas em vermelho mostram as diferenças entre as regiões -10/-35 dos promotores em relação à sequência consenso típica de fator sigma 70 (σ^{70}) de *E. coli*. Podemos verificar que o promotor *recA*, considerado um promotor forte, apresenta uma única base de diferença em comparação com a sequência consenso. Por outro lado, o promotor *araBAD*, considerado um promotor fraco, apresenta o maior número de diferenças de bases ao consenso. O promotor p*hok* difere em três bases do promotor consenso, enquanto que o promotor p*sok* difere em cinco bases. O promotor p*lac* difere em três bases também, e é considerado um promotor fraco.

Além disso, o espaçamento entre as regiões -10 e -35 interfere diretamente na força de expressão (JENSEN e HAMMER, 1998). Desta forma, as diferenças entre as estruturas de cada promotor interferem na força de expressão de um gene e podem estar relacionadas a vários outros mecanismos envolvidos na expressão como por exemplo os "*up elements*", e a afinidade das subunidades da RNA polimerase dos diferentes organismos em se ligar a região promotora, Gourse et al. (2002) e Ross et al., (1998), neste trabalho representado pelos promotores p*hok* e p*sok*.

No caso da bactéria *C. metallidurans*, observou-se o mesmo comportamento que o observado em *E. coli*. Os plasmídeos portadores do sistema *hok/sok* apresentaram maior estabilidade segregacional em relação aos plasmídeos isentos deste sistema. Nesta bactéria, o promotor p*hok* mostrou maior força de expressão que o promotor p*sok*. No entanto, o RNA de *sok* foi suficiente para estabilizar a linhagem, inibindo a expressão da proteína Hok.

Cabe ressaltar que o promotor p*hok* mostrou maior força de expressão que o promotor p*lac*, que é considerado constitutivo em *C. metallidurans*. Neste contexto, o promotor p*hok* mostra-se como uma ferramenta de potencial biotecnológico para expressão de genes de interesse, uma vez que, é mais forte que p*lac*, geralmente utilizado para expressão de genes de interesse, e também constitutivo.

Para a bactéria *C. necator*, os resultados de estabilidade mostraram também grande influência positiva do sistema *hok/sok* na estabilização. Quando se analisou a expressão dos promotores, verificou-se que diferentemente de *E. coli* e *C. metallidurans*, a força de expressão gênica de p*sok* foi maior que a de p*hok*, em concordância com os resultados observados por Gerdes (1988). Baseado nestes resultados espera-se que em *C.necator* este sistema provoque grande estabilidade plasmidial, pois há grande quantidade de RNA de *sok* disponível para inibir a tradução do mRNA de *mok-hok*. Ressalta-se que linhagens desta bactéria modificadas geneticamente ou não, tem grande potencial de aplicação para a produção de polihidroxibutirato (PHB) e que, a maioria dos plasmídeos utilizados em biotecnologia não possui um sistema de estabilização genética. Desta forma, o sistema *hok/sok* apresenta-se como uma excelente ferramenta genética para estabilização de cepas recombinantes de *C. necator*.

Utilizando o sistema *hok/sok* codificado pelo lócus *parB*, Gerdes (1988) conseguiu um fator de estabilização plasmidial superior a 30.000 vezes em

Pseudomonas putida e superior a 5.000 vezes em *Serratia marcescens*. Da mesma forma, PIMENTA et al. (1992) demonstraram que a presença do lócus *parB* diminuiu significativamente a perda de plasmídeo em *Xanthomonas campestres*, corroborando com os resultados neste trabalho apresentados.

Frente aos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o sistema de estabilização genética *parB* (*hok/sok*), mostrou ser adequado para garantir a estabilidade segregacional nas bactérias avaliadas no presente trabalho, mostrando grande potencial biotecnológico para aplicação em processos industriais que se utilizem de cepas recombinantes portadoras de construções gênicas codificadas em plasmídeos.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O sistema *hok/sok* (*parB*) aumentou a estabilidade segregacional de diferentes plasmídeos nas bactérias Gram-negativas, *C. metallidurans*, *C. necator* e *E. coli*;
- ✓ A utilização do sistema *hok/sok* se mostra uma interessante ferramenta biotecnológica para estabilização de plasmídeos em bactérias Gram-negativas de interesse biotecnológico;
- ✓ Os promotores p*hok* e p*sok* apresentaram diferentes intensidades de expressão da proteína EGFP nas bactérias *C. metallidurans*, *C. necator* e *E. coli*;
- ✓ Adicionalmente, os promotores p*hok* e p*sok* se mostraram interessantes ferramentas biotecnológicas para expressão gênica em bactérias Gram-negativas.

REFERÊNCIAS*

AIZENMAN, E.; ENGELBERG-KULKA, H.; GLASER, G. An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 93, n. 12, p. 6059-6063, 1996.

ANTOINE, R.; LOCHT, C. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms. **Mol. Microbiol**., v. 6, n. 13, p. 1785-1799, 1992.

ARANTES, O. M. N. **O que é preciso saber sobre clonagem e transgênicos.** São Paulo: Loyola, 2003. 97 p.

BALAN, A.; SCHENBERG, A. C. G. A conditional suicide system for *Saccharomyces cerevisiae* relying on the intracellular production of the Serratia marcescens nuclease. **Yeast**, v. 22, n. 3, p. 203-212, 2005.

BEREZHNOY, A. Y.; SHCKORBATOV, Y. G. Dependence of the *E. coli* promoter strength and physical parameters upon the nucleotide sequence. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.**, v. 6, n. 11, p. 1063–1068, 2005.

BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. **J. Mol. Biol**., v. 226, n. 3, p. 735–745, 1992.

BERNARD, P.; GABANT, P.; BAHASSI, E. M.; COUTURIER, M. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. **Gene**, v. 148, n. 1, p. 71-74, 1994.

BIONDO, R. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para biorremediação de efluentes contendo metais pesados.** 2008. 170 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/FMVZ/IPT/IB/ICB/Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BIONDO, R.; SILVA, F. A.; VICENTE, E. J.; SARKIS, E. S.; SCHENBERG, A. C. G. Synthetic Phytochelatin Surface Display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for Enhanced Metals Bioremediation. **Environ. Sci. Technol**., v. 46, n. 15, p. 8325-8332, 2012.

BLOWER, T. R.; SHORT, F. L.; RAO, F.; MIZUGUCHI, K.; PEI, X. Y.; FINERAN, P. C.; LUISI, B. F.; SALMOND, G. P. C. Identification and classification of bacterial Type III toxin–antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. **Nucleic Acids Res**., v. 40, n. 13, p. 6158–6173, 2012.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002.

BRANTL, S. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. **RNA Biol**., v. 9, n. 12, p. 1488-1490, 2012.

CHRISTENSEN, S. K.; GERDES, K. RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. **Mol. Microbiol**., v. 48, n. 5, p. 1389–1400, 2003.

CHRISTENSEN, S. K.; MIKKELSEN, M.; PEDERSEN, K.; GERDES, K. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 98, n. 25, p. 14328-14333, 2001.

CUEVA-MENDÉZ, G.; PIMENTEL, B. Gene and cell survival: lessons from prokaryotic plasmid R1. **EMBO Reports**, v. 8, n. 5, p. 458-464, 2007.

DIAGO-NAVARRO, E.; HERNANDEZ-ARRIAGA, A. M.; LÓPEZ-VILLAREJO, J.; MUÑOZ-GÓMEZ, A. J.; KAMPHUIS, M. B.; BOELENS, R.; LEMONNIER, M.; DÍAZ-OREJAS, R. parD toxin-antitoxin system of plasmid R1--basic contributions, biotechnological applications and relationships with closely-related toxin-antitoxin systems. **FEBS. J**., v. 277, n. 15, p. 3097-3117, 2010.

DURAND, S.; JAHN, N.; CONDON, C.; BRANTL, S. Type I toxin-antitoxin systems in Bacillus subtilis. **RNA Biol**., v. 9, n. 12, p. 1491-1497, 2012.

EBERSBACH, G.; GERDES, K. Plasmid segregation mechanisms. **Annu. Rev. Genet**., v. 39, p. 453-479, 2005.

ELZER, P. H.; KOVACH, M. E.; PHILLIPS, R. W.; ROBERTSON, G. T.; PETERSON, K. M.; ROOP, R. M. 2ND. *In vivo* and *in vitro* stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species. **Plasmid**, v. 33, n. 1, p. 51-57, 1995.

FARIDANI, O. R.; NIKRAVESH, A.; PANDEY, D. P.; GERDES, K.; GOOD, L. Competitive inhibition of natural antisense Sok-RNA interactions activates Hok-mediated cell killing in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. 20, p. 5915-5922, 2006.

FIEBIG, A.; ROJAS, C. M. C.; SIEGAL-GASKINS, D.; CROSSON, S. Interaction specificity, toxicity, and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. **Mol. Microbiol**., v. 77, n. 1, p. 236–51, 2010.

FINDEISS, S.; SCHMIDTKE, C.; STADLER, P. F.; BONAS, U. A novel family of plasmid-transferred anti-sense ncRNAs. **RNA Biol**., v. 7, n. 2, p. 120–124, 2010.

FINERAN, P.C.; BLOWER, T.R.; FOULDS, I.J.; HUMPHREYS, D.P.; LILLEY, K.S. e SALMOND, G.P. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 106, n. 3, p. 894-899, 2009.

FOZO, E. M.; HEMM, M. R.; STORZ, G. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**., v. 72, n. 4, p. 579–589, 2008.

FOZO, E. M.; KAWANO, M.; FONTAINE, F.; KAYA, Y.; MENDIETA, K. S.; JONES, K. L.; OCAMPO, A.; RUDD, K. E.; STORZ, G. Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs. **Mol. Microbiol**., v. 70, n. 5, p. 1076-1093, 2008.

FOZO, E. M. New type I toxin-antitoxin families from "wild" and laboratory strains of *E. coli*: Ibs-Sib, ShoB-OhsC and Zor-Orz. **RNA Biol**., v. 9, n. 12, p. 1504-1512, 2012.

GERDES, K. The *par*B (*hok/sok*) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system. **Nat. Biotechnol.**, v.6, p. 1402-1405, 1988.

GERDES, K.; BECH, F. W.; JØRGENSEN, S. T.; LØBNER-OLESEN, A.; RASMUSSEN, P. B.; ATLUNG, T.; BOE, L.; KARLSTROM, O.; MOLIN, S.; VON MEYENBURG, K. Mechanism of Postsegregational Killin by the *hok* Gene Product of the *parB* System of Plasmid R1 and its Homology with the *relF* Gene product of the *E. coli relB* Operon. **EMBO Journal**, v. 5, n. 8, p. 2023-2023, 1986.

GERDES, K.; CHRISTENSEN, S.K.; LØBNER-OLESEN, A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 3, n. 5, p. 371-382, 2005.

GERDES, K.; GULTYAEV, A. P.; FRANCH, T.; PEDERSEN, K.; MIKKELSEN, N. D. Antisense RNA-regulated programmed cell death. **Annu. Rev. Genet**., v.31, p. 1-31, 1997.

GERDES, K.; HELIN, K.; CHRISTENSEN, O. W.; LØBNER-OLESEN, A. Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the parB locus of plasmid R1. **J. Mol. Biol.**, v. 203, n.1, p. 119-129, 1988.

GERDES, K.; RASMUSSEN, P. B.; MOLIN, S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 83, n. 10, p. 3116–3120, 1986.

GERDES, K.; WAGNER, E.G. RNA antitoxins. **Curr. Opin. Microbiol**., v. 10, n. 2, p. 117-124, 2007.

GOURSE, R.L.; ROSS, W.; GAAL, T. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. **Mol. Microbiol**., v. 37, n. 4, p. 687-695, 2000.

GREENFIELD, T. J.; EHLI, E.; KIRSHENMANN, T.; FRANCH, T.; GERDES, K.; WEAVER, K. E. The antisense RNA of the par locus of pAD1 regulates the expression of a 33-amino-acid toxic peptide by an unusual mechanism**. Mol Microbiol**., v. 37, n. 3, p. 652–660, 2000.

HAYES, F.; MELDEREN, L. V. Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 5, p. 386-408, 2011.

HAZAN, R.; ENGELBERG-KULKA, H. Escherichia coli mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. **Mol. Genet. Genomics**., v. 272, n. 2, p. 227–234, 2004.

JAFFÉ, A.; OGURA, T.; HIRAGA, S. Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. J **Bacteriol**., v. 163, n. 3, p. 841–849, 1985.

JENSEN, P. R.; HAMMER, K. The Sequence of Spacers between the Consensus Sequences Modulates the Strength of Prokaryotic Promoters. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 64, n. 1, p. 82–87, 1998.

JOHNSON, E. P.; STROM, A. R.; HELINSKI, D. R. Plasmid RK2 toxin protein ParE: purification and interaction with the ParD antitoxin protein. **J. Bacteriol**., v.178, n. 5, p. 1420-1429, 1996.

KAWANO, M.; OSHIMA, T.; KASAI, H.; MORI, H. Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in Escherichia coli. **Mol. Microbiol**., v. 45, n. 2, p. 333–349, 2002.

KIM, J. Y.; KANG, H. A. Comparison of effects of the *par* locus and the *parB* locus on plasmid stability and host cell growth. **J. Ferment. Bioeng**., v. 82, n. 5, p. 495-497, 1996.

KIMMAN, T. G.; SMIT, E. e KLEIN, M. R. Evidence-Based Biosafety: a Review of the Principles and Effectiveness of Microbiological Containment Measures. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 3, p. 403-425, 2008.

KNUDSEN, S.; SAADBYE, P.; HANSEN, L. H.; COLLIER, A.; JACOBSEN, B. L.; SCHLUNDT, J.; KARLSTROM, O. H. Development and testing of proved suicide functions for biological containment of bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 985-991, 1995.

KOVACH, M. E.; PHILLIPS, R. W.; ELZER, P. H.; ROOP, R. M. 2ND.; PETERSON, K. M. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotechniques**, v. 16, n. 5, p. 800-802, 1994.

MAGNUSON, R. D. Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems. **J. Bacteriol**., v. 189, n. 17, p. 6089-6092, 2007.

MAKAROVA, K. S.; GRISHIN, N. V.; KOONIN, E. V. The HicAB cassette, a putative novel, RNA-targeting toxin-antitoxin system in archaea and bacteria. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2581–2584, 2006.

MAKKAR, N. S., CASIDA JR, L. E.. Cupriavidus necator gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. **Int. J. Syst. Bacteriol**., v. 37, n. 4, p. 323–326, 1987.

MASUDA, H.; TAN, Q.; AWANO, N.; WU, K.P.; INOUYE, M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in Escherichia coli. **Mol. Microbiol**., v. 84, n. 5, p. 979-989, 2012.

McLOUGHLIN, A. E. Plasmid Stability and Ecological Competence in Recombinant Cultures. **Biotech. Adv.**, V. 12, p. 279-324, 1994.

MEACOCK, P.A.; COHEN, S.N. Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. **Cell**, v. 20, n. 2, p. 529-542, 1980.

MENART, V.; JEVSEVAR, S.; VILAR, M.; TROBIS, A.; PAVKO, A. Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in Escherichia coli based on strong P_R, P_L promoters from phage lambda. **Biotechnol. Bioeng**., v. 83, n. 2, p. 181–190, 2003.

MENG, H.; WANG, J.; XIONG, Z.; XU, F.; ZHAO, G.; WANG, Y. Quantitative Design of Regulatory Elements Based on High-Precision Strength Prediction Using Artificial Neural Network. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e60288, 2013.

MERGEAY, M.; NIES, D.; SCHELEGEL, H. G.; GERITS, J.; CHARLES, P.; VAN GIJSEGEM, F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. **J. Bacteriol**., v. 162, n. 1, p. 328-334, 1985.

MESELSON, M.; YUAN, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, p. 1110-1114, 1968.

MOERLOOZE, L.; STRUMAN, I.; RENART, A.; MARTIAL, J. A. Stabilization of T7-promoter-based pARHS expression vectors using the *par* locus. **Gene**, v. 119, n. 1, p. 91-93, 1992.

MOLIN, S.; BOE, L.; JENSEN, L. B.; KRISTENSEN, C. S.; GIVSOK, M.; RAMOS, J. L.; BEJ, A. K. Suicidal Genetic Elements and Their Use in Biological Containment of Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** V. 47, p. 139-166, 1993.

NAHRSTEDT, H.; LANSER, J.; GRONE, M.; EICHSTADT, R.; FREESCHE, J.; MEINHARDT, F. Strain development in *Bacillus licheniformis*: construction of biologically contained mutants deficient in sporulation and DNA repair. **J. Biotechnol.**, v. 119, n. 3, p. 245-254, 2005.

NORDSTRÖM, K.; AUSTIN, S. J. Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. **Annu Rev Genet**., v. 23, p. 37-69, 1989.

O'CONNELL, H. A.; NIU, C.; GILBERT, E. S. Enhanced high copy number plasmid maintenance and heterologous protein production in an Escherichia coli biofilm. **Biotechnol. Bioeng**., v. 97, n. 3, p. 439-446, 2007.

OGURA, T.; HIRAGA, S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 80, n. 15, p. 4784–4788, 1983.

PATTERSON, G. H.; KNOBEL, S. M.;. SHARIF, W. D.; KAIN, S. R.; PISTON, D. W. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. **Biophys. J**., v. 73, n. 5, p. 2782-2790, 1997.

PECOTA, D. C.; KIM, C. S.; WU, K.; GERDES, K.; WOOD, T. K. Combining the hok/sok, parDE, and pnd postsegregational killer loci to enhance plasmid stability. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 63, n. 5, p. 1917-1924, 1997.

PIMENTA, A. L.; ROSATO, Y. B.; ASTOLFI-FILHO, S. Effect of *par*B on plasmid stability and gene expression in *Xanthomonas campestris*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 14, n. 6, p. 233-237, 1992.

QUADROS, O. F. **Construção de um sistema biológico para a detecção de íons de mercúrio em bactérias Gram-negativas.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; BIONDO, R.; QUADROS, O. F.; VICENTE, E. J.; SCHENBERG, A. C. A metal-repressed promoter from gram-positive *Bacillus subtilis* is highly active and metal-induced in gram-negative *Cupriavidus metallidurans*. **Biotechnol. Bioeng**., v. 107, n. 3, p. 469-77, 2010.

RIESEBERG, M.; KASPER, C.; REARDON, K.R.; SCHEPER, T. Flow cytometry in biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v. 56, n. 3-4, p. 350-360, 2001.

ROSS, W.; AIYAR, S.E.; SALOMON, J.; GOURSE, R.L. Escherichia coli promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters. **J. Bacteriol**., v. 180, n. 20, p. 5375-83, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.

SCHNEIDER, D.; FAURE, D.; NOIRCLERC-SAVOYE, M.; BARRIÈRE, A.; COURSANGE, E.; BLOT, M. A broad-Host-Range Plasmid for Isolating Mobile Genetic Elements in Gram-Negative Bacteria. **Plasmid**, v. 44, n. 2, p. 201-207, 2000.

SCHWEDER, T.; SCHMIDT, I.; HERRMANN, H.; NEUBAUER, P.; HECKER, M.; HOFMANN, K. An expression vector system providing plasmid stability and conditional suicide of plasmid-containing cell. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, n. 1, p. 91-93, 1992.

SENGUPTA, M.; AUSTIN, S. Prevalence and Significance of Plasmid maintenance Functions in the Virulence Plasmids of Pathogenic Bacteria. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 7, p. 2502-2509, 2011.

SILVAGGI, J. M.; PERKINS, J. B.; LOSICK, R. Small untranslated RNA antitoxin in Bacillus subtilis. **J. Bacteriol**., v. 187, n. 19, p. 6641-6650, 2005.

SINGLETARY, L. A.; GIBSON, J. L.; TANNER, E. J.; MCKENZIE, G. J.; LEE, P. L.; GONZALEZ, C.; ROSENBERG, S. M. An SOS-Regulated Type 2 Toxin-Antitoxin System. **J. Bacteriol**., v. 191, n. 24, p. 7456–7465, 2009.

SOBECKY, P. A.; EASTER, C. L;, BEAR, P. D.; HELINSKI, D. R. Characterization of the stable maintenance properties of the par region of broad-host-range plasmid RK2. **J. Bacteriol**., v.178, n. 7, p. 2086-2093, 1996.

STEIDLER, L.; NEIRYNCK, S.; HUYGHEBAERT, N.; SNOECK, V.; VERMEIRE, A.; GODDEERIS, B.; COX, E.; REMON, J. P.; REMAUT, E. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, n. 7, p. 785-789, 2003.

STIEBER, D.; GABANT, P.; SZPIRER, C. Y. The art of selective killing: plasmid toxin/antitoxin systems and their technological applications. **BioTechniques**, v 45, n. 3, p. 344–346, 2008.

SUMMERS, D. K. The kinetics of plasmid loss. **Trends in Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 273–278, 1991.

TAGHAVI, S.; VAN-DER-LELIE, D.; MERGEAY, M. Electroporation of *Alcaligenes eutrophus* with (mega) plasmids and genomic DNA fragments. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 60, n. 10, p. 3585-3591, 1994.

TORRES, B.; JAENECKE, S.; TIMMIS, K.N.; GARCÍA, J. L.; DÍAZ, E. A dual lethal system to enhance containment of recombinant micro-organisms. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3595-601, 2003.

VOGEL, J.; ARGAMAN, L.; WAGNER, E. G.; ALTUVIA, S. The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide**. Curr. Biol**., v. 14, n. 24, p. 2271-2276, 2004.

WANG, X.; LORD, D. M.; CHENG, H.; OSBOURNE, D. O.; HONG, S. H.; SANCHEZ-TORRES, V.; QUIROGA, C.; ZHENG, K.; HERRMANN, T.; PETI, W.; BENEDIK, M. J.; PAGE, R.; WOOD, T. K. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. **Nat. Chem. Biol**., v. 8, n. 10, p. 855–861, 2012.

WANG, X.; LORD, D. M.; HONG, S. H.; PETI, W.; BENEDIK, M. J.; PAGE, R.; WOOD, T. K. Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. **Environ. Microbiol**., v. 15, n. 6, p. 1734-1744, 2013.

WOMBLE, D. D.; ROWND, R. H. Genetic and physical map of plasmid NR1: comparison with other IncFII antibiotic resistance plasmids. **Microbiol. Rev**., v. 52, n. 4, p. 433–451, 1988.

APÊNDICE A

Alinhamento do resultado do sequenciamento de pPHOKEGFP com a sequência suposta

```
KRH-7           CWCTATATAGGCGATTGGAGCTCTGGTCAGCGTGCAGGTATATGGGCTATGATGTGCCCG 60
pPHOKEGFP       -----------------GAGCTCTGGTCAGCGTGCAGGTATATGGGCTATGATGTGCCCG 43
                                 *******************************************

KRH-7           GCGCTTGAGGCTTTCTGCCTCATGACGTGAAGGTGGTTTGTTGCCGTGTTGTGTGGCAGA 120
pPHOKEGFP       GCGCTTGAGGCTTTCTGCCTCATGACGTGAAGGTGGTTTGTTGCCGTGTTGTGTGGCAGA 103
                ************************************************************

KRH-7           AAGAAGATAGCCCCGTAGTAAGTTAATTTTCATTAACCACCACGAGGCATCCCTATGTCT 180
pPHOKEGFP       AAGAAGATAGCCCCGTAGTAAGTTAATTTTCATTAACCACCACGAGGCATCCCTATGTCT 163
                ************************************************************

KRH-7           AGTCCACATCAAGCTGGCCTCTTACCGCGCTTTGCGCAAGGAGAAGAAGCATATGGTGAG 240
pPHOKEGFP       AGTCCACATCAAGCTGGCCTCTTACCGCGCTTTGCGCAAGGAGAAGAAGCATATGGTGAG 223
                ************************************************************

KRH-7           CAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT 300
pPHOKEGFP       CAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT 283
                ************************************************************

KRH-7           AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT 360
pPHOKEGFP       AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT 343
                ************************************************************

KRH-7           GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGAC 420
pPHOKEGFP       GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGAC 403
                ************************************************************

KRH-7           CACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA 480
pPHOKEGFP       CACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA 463
                ************************************************************

KRH-7           CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA 540
pPHOKEGFP       CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA 523
                ************************************************************

KRH-7           CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCG 600
pPHOKEGFP       CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCG 583
                ************************************************************

KRH-7           CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA 660
pPHOKEGFP       CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA 643
                ************************************************************

KRH-7           GTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAA 720
pPHOKEGFP       GTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAA 703
                ************************************************************

KRH-7           GGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA 780
pPHOKEGFP       GGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA 763
                ************************************************************

KRH-7           CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAG 840
pPHOKEGFP       CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAG 823
                ************************************************************

KRH-7           CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGA 900
pPHOKEGFP       CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGA 883
                ************************************************************

KRH-7           GTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATMCTCTCG 960
pPHOKEGFP       GTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA-------- 935
                ************************************************

KRH-7           GCATGGACGAGCTGTACAGTATYGAGGGGCCGGTACAGCTTTGGTCCTATGAGGTATGCG 1020
pPHOKEGFP       ------------------------------------------------------------

KRH-7           CTGSWYG 1027
pPHOKEGFP       -------
```

APÊNDICE B

Alinhamento do resultado do sequenciamento de pPSOKEGFP com a sequência suposta

```
FAS-1           TCTMTATAGGGCGATTGGAGCTCTTGCGCAAAGCGCGGTAAGAGGCTATCCTGATGTGGA 60
pPSOKEGFP       -----------------GAGCTCTTGCGCAAAGCGCGGTAAGAGGCTATCCTGATGTGGA 43
                                 ****************************************

FAS-1           CTAGACATAGGGATGCCTCGTGGTGGTTAATGAAAATTAACTTACTACGGGGCTATCTTC 120
pPSOKEGFP       CTAGACATAGGGATGCCTCGTGGTGGTTAATGAAAATTAACTTACTACGGGGCTATCTTC 103
                ************************************************************

FAS-1           TTTCTGCCACACAACACGGCAACAAACCACCTTCACGTCATGAGGCAGAAAGCCTCAAGC 180
pPSOKEGFP       TTTCTGCCACACAACACGGCAACAAACCACCTTCACGTCATGAGGCAGAAAGCCTCAAGC 163
                ************************************************************

FAS-1           GCCGGGCACATCATAGCCCATATACCTGCACGCTGAAAGGAGTCACTTCATATGGTGAGC 240
pPSOKEGFP       GCCGGGCACATCATAGCCCATATACCTGCACGCTGAAAGGAGTCACTTCATATGGTGAGC 223
                ************************************************************

FAS-1           AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA 300
pPSOKEGFP       AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA 283
                ************************************************************

FAS-1           AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG 360
pPSOKEGFP       AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG 343
                ************************************************************

FAS-1           ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACC 420
pPSOKEGFP       ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACC 403
                ************************************************************

FAS-1           ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC 479
pPSOKEGFP       ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC 463
                ************************************************************

FAS-1           TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC 539
pPSOKEGFP       TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC 523
                ************************************************************

FAS-1           GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC 599
pPSOKEGFP       GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC 583
                ************************************************************

FAS-1           ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG 659
pPSOKEGFP       ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG 643
                ************************************************************

FAS-1           TACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG 719
pPSOKEGFP       TACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG 703
                ************************************************************

FAS-1           GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTAC 779
pPSOKEGFP       GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTAC 763
                ************************************************************

FAS-1           CAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGC 839
pPSOKEGFP       CAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGC 823
                ************************************************************

FAS-1           ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAG 899
pPSOKEGFP       ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAG 883
                ************************************************************

FAS-1           TTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGGGG 959
pPSOKEGFP       TTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA--------- 934
                ************************************************

FAS-1           GGGCCCGGTACCCAGCTTTGTCCCTTTAGTGAGGTAATGCGCKA 1003
pPSOKEGFP       -------------------------------------------
```