

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Clonagem e caracterização de sistemas de restrição
e modificação do tipo IIG de *Epsilonproteobacteria*
em *Escherichia coli***

Pedro Luís de Almeida Alves

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Clonagem e caracterização de sistemas de restrição
e modificação do tipo IIG de *Epsilonproteobacteria*
em *Escherichia coli***

Pedro Luís de Almeida Alves

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Jorge Vítor

Orientador interno: Professor Doutor Mário Santos

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011



Clonagem e caracterização de sistemas de restrição e modificação do tipo IIG de *Epsilonproteobacteria* em *Escherichia coli*

Pedro Luís de Almeida Alves

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

Esta tese foi realizada no Instituto do Medicamento e Ciências Farmacêuticas da Universidade de Lisboa (iMed.UL), Divisão de Química Terapêutica, sob orientação directa do Professor Doutor Jorge Vítor, no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

A realização desta Tese de Mestrado teria sido impensável sem o apoio de várias pessoas e instituições a quem expresso o meu agradecimento:

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, em particular ao Instituto do Medicamento e Ciências Farmacêuticas da Universidade de Lisboa (iMed.UL), por gentilmente me ter acolhido num laboratório e me ter proporcionado todas as condições necessárias à elaboração desta dissertação.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, em particular ao Professor Doutor Rogério Tenreiro, por me ter dado a possibilidade de frequentar um Mestrado tão desafiante e numa área em tão franca expansão a nível nacional e internacional.

Ao Professor Doutor Jorge Vítor, não só pela orientação científica desta dissertação, mas também por toda a disponibilidade, apoio, encorajamento, sugestões, críticas construtivas ao trabalho, e grande optimismo.

Ao Professor Doutor Mário Santos pela orientação científica desta dissertação.

Ao New England Biolabs, empresa líder mundial na venda de enzimas de restrição, pelo financiamento deste projecto.

Ao Dr. Paulo Borges Dinis, cirurgião do Serviço de Otorrinolaringologia II do Hospital Pulido Valente, por me ter permitido assistir às endoscopias gástricas e ter recolhido biopsias, das quais foram isoladas as estirpes de *Helicobacter pylori*.

Ao Doutor João Vital pelas valiosas sugestões dadas na análise dos resultados obtidos.

Aos meus colegas de bancada, Miguel, Joana e Renato, pela partilha de conhecimentos, motivação e incentivo sempre demonstrados.

À D.Lurdes e à D.São, pelo excelente trabalho enquanto funcionárias da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

À minha família em geral e aos meus pais e irmãos em particular, pelo apoio incondicional e por sempre me terem feito sentir o conforto da minha casa.

À minha grande amiga e companheira Vânia, um agradecimento muito especial, por todo o apoio que sempre me deu, mesmo estando longe, por partilhar comigo o seu dia-a-dia durante 5 anos da sua vida, me ter compreendido sempre, e pelas sugestões e leitura integral do manuscrito.

Aos meus amigos de Lisboa, Miguel, Bernardino, Rita, e Marcelo, pelas brincadeiras ao longo destes anos.

Aos meus amigos da Régua, por terem sido bons companheiros durante a minha vida.

Aos meus amigos da residência, a minha segunda casa, pela alegria e partilha sempre demonstradas.

Aos meus colegas de trabalho da Science4you, pelo companheirismo.

E por último à D.Mena, pela amizade.

ABREVIATURAS

A - adenina	N4CMTase – N4-metilcitosina
Ac – acetate	N6AMTase – N6-metiladenina
ATP – adenosina trifosfato	N – A ou C ou G ou T
BLASTn – <i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide</i>	NaCl – cloreto de sódio
C5CMTase – C5-metilcitosina	NaOH – hidróxido de sódio
C – citosina	NEB – <i>New England Biolabs</i>
CaCl ₂ – cloreto de cálcio	o.n. – <i>over night</i>
CL – <i>Campylobacter locus</i>	ORF – <i>open reading frame</i>
DNA – ácido desoxirribonucleico	pb – pares de bases
DTT – ditioneitol	PCR – <i>polymerase chain reaction</i>
EBE – extracto bruto enzimático	p/v – peso por volume
FT – aplicação	R – A ou G
G – guanina	REase – endonuclease de restrição
GTP – guanosina trifosfato	REBASE – <i>restriction enzyme database</i>
HCl – ácido clorídico	rpm – rotações por minuto
HpL – <i>Helicobacter pylori locus</i>	s - segundo
KAc – acetato de potássio	SAM – S-adenosil-metionina
l – litro	Sistemas RM – sistemas de restrição e modificação
LB – <i>lysogeny broth</i>	T - timina
M – marcador	Tris – tris (hidroxi-metil) aminometano
mA – miliampere	T.S. – tampão de sonicação
ml – mililitro	UFC – unidades formadoras de colónias
mM – mili molar	µl – microlitro
MCS – <i>multiple cloning site</i>	V – volt
MgAc – acetato de magnésio	v/v – volume por volume
MgCl ₂ – cloreto de magnésio	W – lavagem
MgSO ₄ – sulfato de magnésio	X – qualquer resíduo de aminoácido
min - minuto	X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido
MWCO – <i>molecular weight cut-off</i>	Y – C ou T
MTase – metiltransferase	

RESUMO

Os sistemas de restrição e modificação (RM) são sistemas enzimáticos não vitais, de complexidade variável, ubiquitários em *Bacteria* e *Archaea*. Actualmente considera-se que existam quatro grandes tipos e vários subtipos.

Alguns dos géneros que pertencem à ordem *Campylobacterales*, nomeadamente *Helicobacter* e *Campylobacter*, têm uma característica pouco frequente, a presença de um elevado número de sistemas RM putativos no seu genoma. Analisaram-se os trinta e um genomas completamente sequenciados pertencentes à espécie *H. pylori* e os nove genomas completamente sequenciados pertencentes à espécie *C. jejuni*, anotados na REBASE (restriction enzyme database), e verificou-se que os sistemas RM não se encontram distribuídos ao acaso pelo genoma, localizando-se em *loci* bem definidos. A análise focou-se nos sistemas RM do tipo IIG e tendo as estirpes *H. pylori* 26695 e *C. jejuni* RM1221 como modelo, encontraram-se quatro *loci* em cada uma delas. Foram desenhados *primers* para os oito *loci* e usadas dezassete estirpes de *H. pylori* e cento e sessenta e nove estirpes de *Campylobacter* para verificar se essa observação era comum entre as diferentes estirpes. Obteve-se amplificação em todos os *loci* testados mas observaram-se grandes diferenças entre eles, após digestão com HindIII. Pôde também observar-se que nalguns dos *loci* testados não se obteve amplificação. Todos os produtos de PCR cujo perfil foi diferente, quer de estirpes de *H. pylori*, quer de estirpes de *Campylobacter*, foram clonados em pUC19 e transformados em *Escherichia coli* DH10B, mas apenas sete dos produtos de *Campylobacter* codificaram para uma enzima de restrição activa. É possível que em *H. pylori* a maioria destes genes putativos esteja inactivo, não só porque nos genomas sequenciados existem várias ORF com *frameshifts*, mas também porque podem ter ocorrido movimentos de sequências de DNA entre domínios situados em posições diferentes, no interior de um gene. No futuro, a sequenciação dos clones obtidos poderá permitir perceber se essa é de facto a razão para a falta de actividade observada.

PALAVRAS CHAVE: *Campylobacterales*; sistemas de restrição e modificação; enzimas de restrição do tipo IIG.

ABSTRACT

Restriction and modification (RM) systems are non-vital enzymatic systems of diverse complexity, which are ubiquitous among *Bacteria* and *Archaea*. Currently the RM systems are classified into four major types and several subtypes.

Some of the genus which belong to order *Campylobacterales*, mainly *Helicobacter* and *Campylobacter*, have a remarkable characteristic, the presence of a large number of putative RM systems in their genomes. The thirty one complete sequenced *H. pylori* genomes were analysed as well as the nine complete sequenced *C. jejuni* genomes annotated in REBASE (restriction enzyme database) and it was found that the RM systems are not randomly distributed over the genome, but instead are located at specific loci. The analysis was directed to type IIG RM systems and having *H. pylori* 26695 and *C. jejuni* RM1221 as models, four loci in each of them were found. Primers for the eight loci were designed and seventeen *H. pylori* strains and a hundred and sixty nine *Campylobacter* strains were used to test if this observation was common. PCR products were obtained in all loci but large differences between them were observed after digestion with HindIII. It was also realised that some of the loci were empty. All of the different PCR products from *H. pylori* strains and *Campylobacter* strains were cloned in pUC19 and transformed in *Escherichia coli* DH10B, but only seven from *Campylobacter* showed restriction activity. In *H. pylori* it is possible that most of these type IIG genes are "turn off" in the majority of the strains tested, not only because in the sequenced genomes there are several ORF with frameshifts, but also because movements of sequences between domains in different positions within a protein coding gene might have occurred. We will sequence some of our clones to see if that is the reason for the lack of activity.

KEY WORDS: *Campylobacterales*; restriction and modification systems; type IIG restriction endonucleases.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
I. – INTRODUÇÃO	1
I.1. – Sistemas de restrição e modificação.....	1
I.1.1. – Definição e nomenclatura.....	1
I.1.2. – Classificação e características gerais	4
I.1.2.1. – Sistemas de restrição e modificação do tipo II.....	5
I.1.2.1.1. – Sistemas de restrição e modificação do tipo IIG.....	8
I.1.3. – Função biológica	8
I.2. – Ordem <i>Campylobacterales</i>	9
I.2.1. – Análise bioinformática dos genomas de <i>Helicobacter</i> e <i>Campylobacter</i> já sequenciados.....	11
I.3. – Hipótese	12
I.4. – Objectivo.....	12
II. – MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
II.1. – Estirpes estudadas	13
II.2. – Cultura das estirpes.....	13
II.3. – Obtenção do DNA genómico.....	13
II.4. – Obtenção dos produtos de PCR dos diferentes <i>loci</i>	14
II.5. – Avaliação dos perfis de restrição dos produtos de PCR dos diferentes <i>loci</i>	15
II.6. – Estratégia PstI/BamHI	15
II.7. – Preparação de células competentes	16
II.8. – Ligação e transformação.....	17
II.9. – Avaliação dos clones.....	18
II.10. – Obtenção de extractos brutos enzimáticos	19
II.11. – Ensaio de actividade de restrição do extracto bruto enzimático.....	19
II.12. – Purificação da enzima de restrição	20
II.13. – Optimização das condições de reacção	22
II.14. – Mapeamento e determinação da sequência de reconhecimento	22
II.15. – Ensaio com recurso a um coquetel de bacteriófagos	23
III. – RESULTADOS	25
III.1. – Produtos de PCR dos diferentes <i>loci</i> e respectivos perfis de restrição	25
III.2. – Pesquisa de enzimas de restrição em clones de <i>Helicobacter</i>	26
III.2.1. – Ensaio de actividade de restrição	26
III.3. – Pesquisa de enzimas de restrição em clones de <i>Campylobacter</i>	28
III.3.1. – Ensaio de actividade de restrição	28
III.3.2. – Purificação da enzima de restrição	30

III.3.3. – Identificação da enzima de restrição expressa	30
III.4. – Ensaio com recurso a um coquetel de bacteriófagos	32
IV. – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	34
V. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
VI. – ANEXOS	40

I. – INTRODUÇÃO

I.1. – Sistemas de restrição e modificação

I.1.1. – Definição e nomenclatura

Os sistemas de restrição e modificação (RM) são sistemas enzimáticos cuja complexidade é variável, exclusivos dos organismos procariontes e ubiqüitários em *Bacteria* e *Archaea*. Estão também presentes em vírus que infectam algas verdes do género *Chlorella* (Roberts, 1976; Vítor, 1999; Pingoud *et al.*, 2005; Ando *et al.*, 2010). Estes sistemas são normalmente compostos por dois genes, um que codifica para uma fosfodiesterase específica, habitualmente designada por endonuclease de restrição (REase) ou enzima de restrição, que reconhece uma sequência de DNA específica e corta ambas as cadeias, e outro que codifica para uma metiltransferase (MTase), que metila a mesma sequência de DNA, protegendo-a desta forma da acção da REase companheira (Vítor, 1999; Donahue & Peek, 2001; Roberts *et al.*, 2003; Vale & Vítor, 2007).

Para que numa célula bacteriana exista um ou mais sistemas RM esta terá obrigatoriamente de proteger quer o seu DNA cromossomal, quer elementos extracromossomais da acção da(s) REase(s) desse(s) sistema(s). Assim sendo, existem três possibilidades para um DNA exógeno escapar à barreira dos sistemas RM: i) o local de reconhecimento da REase não existe nesse DNA; ii) esse mesmo local encontra-se de alguma forma modificado; iii) a célula possui algum mecanismo antagónico que inibe a acção da REase. Assim, qualquer DNA estranho à célula que nela consiga entrar, quer por meios naturais, quer artificiais, será degradado caso não se verifique pelo menos uma das possibilidades descritas (Roberts, 1976; Vítor, 1999; Kong *et al.*, 2000).

A primeira proposta de nomenclatura das REases surgiu em 1973, por Hamilton O. Smith e Daniel Nathans (Smith & Nathans, 1973), contudo, até à actualidade, já se verificaram algumas alterações às regras inicialmente propostas (Roberts *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2010). As REases são designadas por um acrónimo de três letras. A primeira delas é maiúscula e refere-se ao género bacteriano e as duas outras são minúsculas e dizem respeito à espécie. Assim sendo, todas as REases descritas da espécie *Helicobacter pylori* são designadas por Hpy. Após estas três letras pode ou não surgir a designação da estirpe, seguindo-se sempre a numeração da REase em algarismos romanos. No nome da REase não devem surgir espaços entre o acrónimo e o numeral romano, nem entre o acrónimo, a designação da estirpe e o numeral romano (Vítor, 1999; Roberts *et al.*, 2003). Seguindo estas regras percebemos facilmente que a primeira REase descrita na estirpe J99 de *H. pylori* tenha sido designada por Hpy99I (Xu *et al.*, 2000). A nomenclatura das REases seguida neste trabalho é a mesma que a adoptada por Roberts *et al.*, 2003.

As MTases por sua vez distinguem-se pelo tipo de substrato e pela posição do átomo metilado, sendo separadas em três classes (Kumar *et al.*, 1994). Duas destas classes modificam átomos de azoto exocíclicos, convertendo a adenina a N6-metiladenina (N6AMTase) ou a citosina a

N4-metilcitosina (N4CMTase). A terceira classe metila o carbono 5 do anel pirimidíco da citosina criando C5-metilcitosina (C5CMTase) (Figura I.1.) (Kumar *et al.*, 1994).

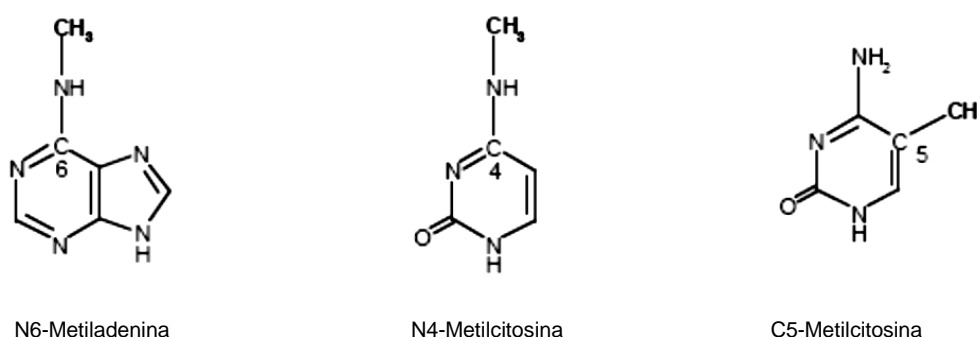


Figura I.1. – Estruturas químicas das bases de DNA modificadas pelas MTases (adaptado de Vítor, 1999).

Se houver necessidade de referir individualmente as proteínas que constituem um sistema RM deve usar-se uma letra maiúscula a preceder as três do acrónimo, separada destas por um ponto. Essa letra identifica a função dessa proteína no sistema em questão, por exemplo, M.BamHI designa a MTase do sistema BamHI. Se houver necessidade de referir a REase do sistema pode ou não colocar-se a letra R antes do acrónimo. Por exemplo, R.EcoRI e EcoRI são considerados sinónimos (Vítor, 1999; Roberts *et al.*, 2003).

A nomenclatura dos genes codificantes dos sistemas RM segue as regras gerais de Demerec *et al.*, 1966, adaptadas por Szybalski *et al.*, 1988. Assim sendo, o nome do gene é igual ao da enzima e deve surgir em itálico, sendo a primeira letra minúscula. A letra maiúscula usada como prefixo para definir a função da proteína no sistema RM surge neste caso no final, mas sem ser separada por um ponto. Por exemplo, o gene que codifica a R.EcoRI será o *ecoRIR*, e o que codifica a MTase será o *ecoRIM* (Vítor, 1999; Roberts *et al.*, 2003).

Na última década observou-se um extraordinário aumento do número de potenciais sistemas RM descobertos através da análise bioinformática dos genomas (Roberts *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2011). Actualmente encontram-se referenciadas três mil novecentas e oitenta e seis REases na base de dados REBASE (*restriction enzyme database*) (Gráfico I.1.). Esta é uma base de dados de acesso livre que disponibiliza toda a informação associada aos sistemas RM. Muitas destas enzimas, apesar de serem provenientes de diferentes organismos, reconhecem a mesma sequência nucleotídica que a primeira enzima encontrada, o protótipo, e como tal designam-se por isosquisómeros. Quando a sequência de reconhecimento de ambas as enzimas é a mesma mas o local de corte é diferente entre si diz-se que a enzima é um neoisosquisómero do protótipo (Roberts, 1976; Vítor, 1999).

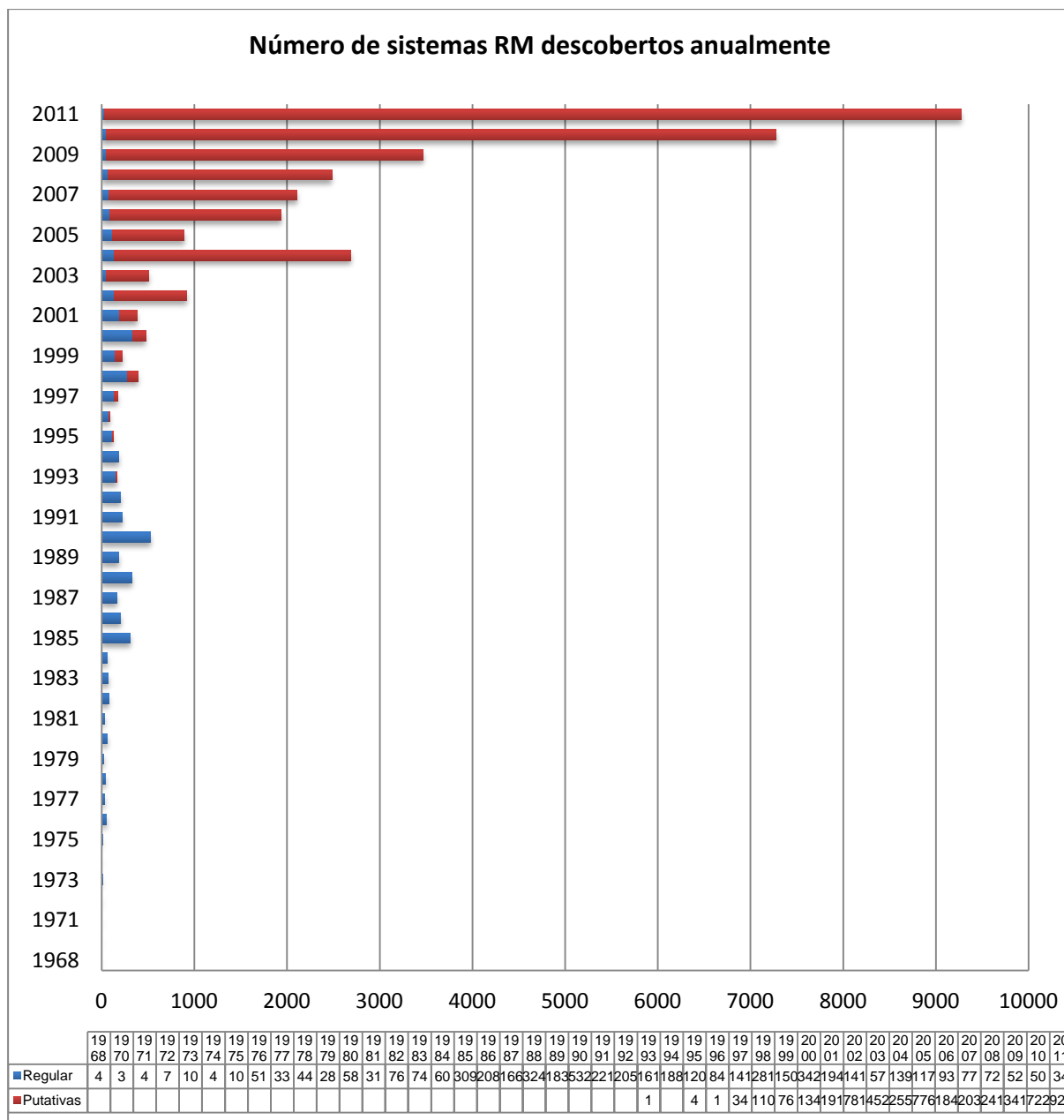


Gráfico I.1. – Aumento do número de sistemas RM descobertos anualmente desde 1968. As barras a vermelho representam o aumento do número de sistemas RM putativos, descobertos através da análise dos genomas presentes no GenBank. O pico observado em 2004 deve-se à adição das sequências metagenômicas provenientes da expedição ao “Mar dos Sargaços” (adaptado de Roberts *et al.*, 2010).

As REases têm uma importância fundamental na engenharia genética e na biotecnologia em geral pelo facto de terem diversas aplicações, nomeadamente no mapeamento de genomas bacterianos, na análise de sequências de DNA, no isolamento de genes, na inserção de genes de uma estirpe no genoma de outra estirpe, no mapeamento físico de genomas virais de DNA e na determinação de polimorfismos humanos. Têm também sido usadas como modelo para estudar vários aspectos das interacções entre ácidos nucleicos e proteínas, nomeadamente a localização, o reconhecimento e a catálise da sequência alvo. Apesar de todo o progresso que recentemente tem sido feito nesta área existem ainda bastantes questões por responder, principalmente no que respeita

ao mecanismo de catálise (Pingoud *et al.*, 2005). O seu número de aplicações para o ser humano poderá aumentar significativamente, assim que for possível alargar ou alterar a especificidade das REases, recorrendo à engenharia de proteínas (Vítor, 1999; Roberts *et al.*, 2003; Rimseliene *et al.*, 2003; Sistla & Rao, 2004; Pingoud *et al.*, 2005; Morgan & Luyten, 2009; Chan *et al.*, 2011).

A clonagem de REases é normalmente feita em *E. coli* e tem dois grandes objectivos: o aumento da produção e o estudo pormenorizado da REase (Vítor, 1999). As primeiras REases foram clonadas com recurso ao método da selecção pela metilase (Lunnen *et al.*, 1988), um método indirecto de selecção já que o alvo primário desta metodologia é o gene da MTase. Este método baseia-se na observação de que em muitos sistemas RM a REase é contígua à MTase, logo ao clonar a metilase existe uma elevada probabilidade de também se clonar a endonuclease de restrição que lhe está associada. A grande limitação deste método está relacionada com o facto de só ser possível utilizá-lo se existir um vector de clonagem que possua a sequência reconhecida pela REase a clonar (Vítor, 1999).

Na actualidade e com o aparecimento da Bioinformática já é possível fazer uma análise *in silico* dos genomas completamente sequenciados, através de softwares adequados como por exemplo os que se encontram na REBASE. Como tal, o método mais utilizado na clonagem de REases hoje em dia envolve o recurso à técnica de PCR, sendo possível produzir em larga escala REases a um preço muito mais reduzido, e até mesmo REases de microrganismos patogénicos.

I.1.2. – Classificação e características gerais

A classificação inicial das REases que foi apresentada por Robert Yuan em 1981 continha apenas três grupos diferentes, tipos I, II e III, e baseava-se em quatro critérios: i) o tipo de sequência reconhecida; ii) o local de hidrólise do DNA; iii) os cofactores necessários para a restrição; iv) a estrutura do complexo activo que realiza a restrição (Yuan, 1981).

Com o passar dos anos e a descrição de novas REases, a classificação de Robert Yuan foi ficando desajustada da realidade pois surgiram novas REases que não se enquadravam em nenhum dos tipos existentes (Vítor, 1999). Começaram então a surgir novas propostas de revisão da classificação de Yuan, como por exemplo a efectuada por Szybalski, 1985, onde se propõe a criação do subgrupo IIS (“*shifters*”) das REases do tipo II. Esta revisão foi aceite pela comunidade científica, e este subgrupo passou a incluir as REases que reconhecem sequências assimétricas e hidrolisam a dupla cadeia de DNA fora dessa sequência a uma distância definida (Vítor, 1999).

Já no ano de 2001 a classificação das REases foi revista por Pingoud & Jeltsch, 2001, tendo surgido novos subtipos do tipo II (IIE, IIF, IIT, IIG, IIB e IIM). Dois anos mais tarde, Richard Roberts publicou uma revisão da nomenclatura das REases e sugeriu a existência de novos subtipos do tipo II (IIA, IIC, IIH, IIM, IIP), além dos sugeridos por Pingoud & Jeltsch, 2001 (Roberts *et al.*, 2003). Para além dos 3 grandes tipos, Roberts *et al.*, 2003 propõe também a existência de um quarto tipo de REase que englobe os sistemas onde se verifique apenas a clivagem de DNA metilado e que tenham fraca especificidade, tais como McrA, McrBC e os sistemas Mrr de *Escherichia coli* (Roberts *et al.*, 2003) (Tabela I.1.).

Tabela I.1. – Classificação e características das REases, segundo Roberts *et al.*, 2003 (adaptado de Sistla & Rao, 2004).

Característica	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
Subunidades	Três diferentes	Duas idênticas	Duas diferentes	Duas diferentes
Actividade enzimática	REase, MTase, ATPase	REase ou MTase	REase, MTase, ATPase	REase, GTPase
Cofactores para a clivagem do DNA	ATP, SAM, Mg ²⁺	Mg ²⁺	ATP, Mg ²⁺ , (SAM)	Mg ²⁺ , GTP
Metilação	SAM, Mg ²⁺	SAM	SAM, Mg ²⁺	-
Sequência de reconhecimento	Assimétrica, bipartida	Normalmente simétrica	Assimétrica	Bipartida, metilada
Local de clivagem	Aleatório, a pelo menos 1000 pb do local de reconhecimento	No ou perto do local de reconhecimento	25-27 pb de distância do local de reconhecimento	Entre bases metiladas em várias posições
Translocação de DNA	Sim	Não	Sim	Sim

A característica mais importante e interessante das REases é a sua elevada especificidade, que se deve ao elevado número de contactos estabelecidos entre resíduos de aminoácidos e as bases nucleotídicas, bem como com o esqueleto de ligações fosfodiéster. Estas informações advieram de estudos da estrutura tridimensional de várias REases co-cristalizadas com fragmentos de DNA que continham a sequência reconhecida, bem como de vários trabalhos de mutagénese dirigida (Vítor, 1999).

I.1.2.1. – Sistemas de restrição e modificação do tipo II

Os sistemas RM mais frequentes pertencem ao tipo II. Estes caracterizam-se por ser sistemas simples, normalmente constituídos por dois genes, *M* e *R*, que codificam respectivamente para uma metiltransferase e para uma fosfodiesterase, reconhecendo ambas a mesma sequência de DNA. Existem no entanto sistemas que possuem um terceiro gene, designado por *C*, que se pensa estar envolvido no controlo da regulação da expressão da endonuclease e que precede o gene *R*. As sequências codificantes destes genes encontram-se em cromossomas, plasmídeos bacterianos ou ainda em vírus que infectam algas verdes do género *Chlorella*. Estas sequências são quase sempre contíguas, existindo mesmo, nalguns casos, uma pequena sobreposição (Roberts & Halford, 1993; Vítor, 1999; Kong *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2010).

As REases do tipo II ortodoxas são na sua maioria enzimas homodiméricas ou homotetraméricas, que reconhecem sequências simétricas de DNA de quatro a oito pares de bases de comprimento, palíndromas, sequências essas que podem estar interrompidas por um segmento de comprimento específico mas de sequência inespecífica (Pingoud & Jeltsch, 1997; Vítor, 1999; Pingoud *et al.*, 2005; Ando *et al.*, 2010). Estas REases, que não requerem ATP ou GTP, hidrolisam ambas as cadeias de DNA em posições constantes, no interior ou na vizinhança imediata da sequência de reconhecimento, produzindo extremidades 5' fosforiladas e 3' hidroxiladas. As extremidades geradas podem ser cegas ou coesivas, e neste último caso 5' ou 3' projectantes. Caracterizam-se também por serem proteínas heterogéneas com pesos moleculares entre dezoito e sessenta e seis kDa e sem qualquer homologia com as suas MTases companheiras, não dependendo normalmente destas para actuar, embora reconheçam a mesma sequência nucleotídica (Pingoud & Jeltsch, 1997; Vítor, 1999; Pingoud *et al.*, 2005; Ando *et al.*, 2010). Estas enzimas diferem entre si em alguns detalhes no processo de reconhecimento e no modo de clivagem, o que indica que

são mais diversas do que originalmente se pensava. Apesar disso, a grande maioria delas parece ter não só uma estrutura semelhante, como também um mecanismo de clivagem comum, o que sugere que tenham evoluído a partir de um ancestral comum (Ando *et al.*, 2010). Em relação às enzimas de restrição dos tipos I, III e IV, as do tipo II destacam-se pelo facto de possuírem uma organização das subunidades mais simples (Pingoud *et al.*, 2005).

As MTases activas destes sistemas actuam como monómeros e transferem o grupo metilo do dador SAM (S-adenosil-metionina) para o DNA em cadeia dupla, formando N4-metilcitosina, C5-metilcitosina ou N6-metiladenina. As MTases são enzimas com uma especificidade muito elevada, tal como as REases suas companheiras, mas ao contrário destas caracterizam-se por terem motivos fortemente conservados (Vítor, 1999; Vale, 2002). Durante anos pensou-se que todas as REases do tipo II pertenceriam à superfamília PD...(D/E)XK (X representa qualquer resíduo de aminoácido), devido à presença deste motivo proteico no centro activo de algumas REases do tipo II. Mais tarde, evidências bioinformáticas vieram demonstrar que este motivo não é ubiqüitário, logo a sua presença não é específica destas REases, existindo REases com este motivo que pertencem a outras famílias (Vítor, 1999; Pingoud *et al.*, 2005).

De uma maneira simplificada, o ciclo de reacção de uma REase do tipo II inicia-se, quer *in vitro*, quer *in vivo*, pela ligação não específica ao DNA, ao que se segue uma série de passos de dissociação/associação e/ou difusão facilitada ao longo do DNA até ser encontrado o local alvo. Assim que esse local é encontrado ocorre uma série de alterações conformacionais que levam à activação dos centros catalíticos e subsequente clivagem do DNA, com libertação dos produtos da reacção, possibilitando o início de um novo ciclo de reacção (Pingoud & Jeltsch, 1997) (Figura I.2.).

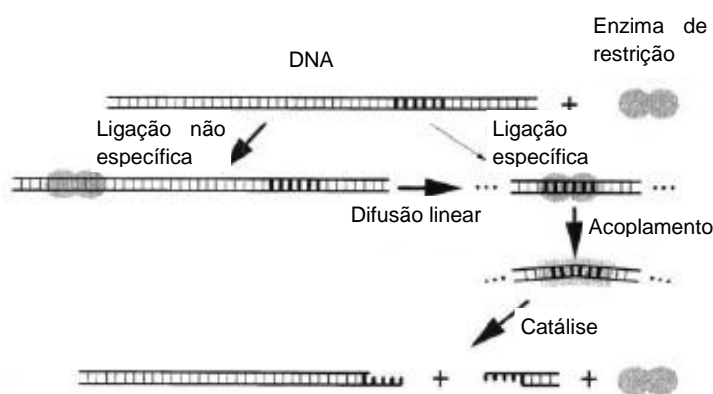


Figura I.2. – Ilustração esquemática das etapas envolvidas no reconhecimento e clivagem do DNA pelas enzimas de restrição do tipo II (adaptado de Pingoud & Jeltsch, 1997).

Estão referenciados na REBASE 3864 REases do tipo II, sendo é possível a existência de mais do que uma REase no mesmo hospedeiro, como por exemplo HindII e HindIII, ambas presentes em *Haemophilus influenzae* Rd (ATCC 51907). Apesar de toda esta diversidade, muitas das REases do tipo II existentes ainda não foram caracterizadas em detalhe (Vítor, 1999).

Existem numerosas excepções às REases do tipo II ortodoxas (Tabela I.2.). Alguns exemplos são: as REases do tipo IIS que cortam fora da sequência assimétrica; as que cortam de ambos os lados da sequência de reconhecimento (Bcgl); as que são activadas por SAM (Eco57I); as que interagem com duas cópias da sequência de reconhecimento (EcoRII); as que requerem um segundo

Tabela 1.2. – Nomenclatura e características das REases do tipo II (adaptado de Pingoud & Jeltsch, 2001 e Roberts *et al.*, 2003).

Subtipo	Característica	Exemplo	Sequência de reconhecimento
Ortodoxo	Sequência de reconhecimento palindrômica, reconhecida por uma enzima homodimérica. O local de corte ocorre no interior da sequência de reconhecimento ou adjacente a esta. Este subtipo corresponde às REases mais utilizadas em biologia molecular.	EcoRI EcoRV BglI	5'...G ¹ AATTC...3' 3'...CTTAA ₁ G...5' 5'...GAT ¹ ATC...3' 3'...CTA ₁ TAG...5' 5'...GCCNNNN ¹ NGGC...3' 3'...CGGN ₁ NNNNCCG...5'
A	Sequência de reconhecimento assimétrica, independentemente do local de clivagem ser longe ou dentro da sequência de reconhecimento.	Acil	5'...C ¹ CGC...3' 3'...GGC ₁ G...5'
B	A clivagem ocorre nos dois lados da sequência de reconhecimento.	Bcgl	5'...NN ¹ N ₁₀ CGAN ₆ TGCN ₁₀ NN ¹ ...3' 3'... ₇ NNN ₁₀ GCTN ₆ ACGN ₁₀ NN...5'
C	Termo genérico que engloba todas as enzimas que têm uma estrutura híbrida, que contém os domínios de clivagem e modificação dentro de um único polipéptido. Engloba todas as enzimas do tipo IIB, IIG e algumas do tipo IIH.	Gsul	5'...CTGGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNN ¹ ...3' 3'...GACCTCNNNNNNNNNNNNNNNNNN ₁ NN...5'
E	São necessárias duas sequências de reconhecimento para a clivagem, uma serve de efectuador alostérico.	NaeI	5'...GCG ¹ CGC...3' 3'...CGC ₁ GCG...5'
F	São necessárias duas sequências de reconhecimento para a clivagem, sendo ambas clivadas numa reacção concertada pela enzima homotetramérica.	NgoMIV	5'...G ¹ CCGGC...3' 3'...CGGCC ₁ G...5'
G	Uma cadeia polipeptídica com actividade de restrição e modificação. São estimuladas por SAM.	Eco57I	5'...CTGAAGN ₁₄ NN ¹ ...3' 3'...GACTTCN ₁₄ NN...5'
H	Características genéticas semelhantes às REases do tipo I, mas bioquimicamente comportam-se como REases do tipo II.	AhdI	5'...GACNNN ¹ NNGTC...3' 3'...CTGNN ₁ NNNCAG...5'
M	Sequência de reconhecimento metilada.	DpnI	5'...G ^m A ¹ TC...3' 3'...CT ₁ ^m AG...5'
P	Reconhecem sequências simétricas, palindromas, e clivam em locais simétricos fixos, quer dentro da sequência de reconhecimento, quer em locais imediatamente adjacentes a esta.	BsII	5'...CCNNNNN ¹ NNGG...3' 3'...GGNN ₁ NNNNNCC...5'
S	Semelhantes às do tipo A, pois a sequência de reconhecimento é assimétrica mas a clivagem de pelo menos uma das cadeias de DNA ocorre fora da sequência de reconhecimento.	FokI	5'...GGATGN ₉ ¹ NNNN...3' 3'...CCTACN ₉ NNNN ₁ ...5'
T	Diferentes subunidades com actividade de restrição e modificação.	Bpu10I	5'...CC ¹ TNAGC...3' 3'...GGANT ₁ CG...5'

O local de clivagem é indicado por ¹₁.

local de reconhecimento que actua como efectuador alostérico (NaeI); ou ainda, que têm subunidades estruturais fora do comum (BbvCI) (Vale, 2002; Roberts *et al.*, 2003). A nomenclatura actual tenta

agrupar as REases do tipo II de acordo com propriedades que são únicas de cada subtipo. Contudo, ocorre sempre alguma sobreposição, existindo enzimas que pertencem a mais do que um subtipo em simultâneo, o que é consequência da grande diversidade existente dentro das REases do tipo II (Pingoud *et al.*, 2005).

I.1.2.1.1. – Sistemas de restrição e modificação do tipo IIG

As REases do tipo IIG têm os domínios de clivagem e de modificação num único polipéptido, sendo portanto semelhantes às do tipo IIB. Por este motivo há autores que as consideram um subgrupo destas. As REases do tipo IIG são estimuladas por SAM e as suas sequências de reconhecimento podem ou não ser assimétricas. Desta forma percebemos mais uma vez que pode ocorrer alguma sobreposição entre as REases do tipo II, pois as REases do tipo IIA e IIP podem ser incorporadas nas REases do tipo IIG. Caracterizam-se também pelo facto de os genes que as codificam serem de relativamente grandes dimensões, quando comparados com os restantes genes que codificam para REases do tipo II. Estas enzimas são promissoras no que diz respeito à produção de REases com novas especificidades (Vitor, 1999; Roberts *et al.*, 2003; Rimseliene *et al.*, 2003; Sistla & Rao, 2004; Pingoud *et al.*, 2005; Morgan & Luyten, 2009; Chan *et al.*, 2011).

I.1.3. – Função biológica

Apesar de não se saber ao certo as funções dos sistemas RM pensa-se que uma delas poderá ser a de defender o hospedeiro contra a invasão por DNAs exógenos, tais como plasmídeos conjugativos e bacteriófagos (fagos). Isso seria conseguido através da clivagem do DNA invasor, após reconhecimento deste como sendo estranho à célula pela ausência de modificações características em locais específicos dentro da sequência de reconhecimento (Tomb *et al.*, 1997; Pingoud *et al.*, 2005; Ando *et al.*, 2010). Desta forma, a célula bacteriana conseguiria evitar a expressão ou a integração de elementos genéticos estranhos no seu genoma, sem impedir a troca de material genético entre células da mesma estirpe. Assim sendo, os sistemas RM actuariam como uma barreira à transferência da informação genética interespecífica tendo provavelmente um papel importante na especiação bacteriana. Esta teoria, denominada por defesa celular, tem sido aceite pela maioria da comunidade científica que se preocupa com a função dos sistemas RM (Vitor, 1999; Vale, 2002; Jeltsch, 2003; Pingoud *et al.*, 2005).

Pensa-se também que alguns tipos de sistemas RM serão elementos genéticos egoístas (Kusano *et al.*, 1995; Naito *et al.*, 1995; Kobayashi, 2001; Pingoud *et al.*, 2005), havendo ainda estudos que relacionam estes sistemas à virulência das bactérias, como no caso de *H. pylori*, onde foram descobertos genes com elevada homologia aos que codificam sistemas de restrição e modificação e que estão associados à presença de úlceras gástricas e à promoção da infiltração neutrofílica aguda (Ando *et al.*, 2010).

Recentemente demonstrou-se que os sistemas RM não são estáticos, já que as estirpes podem adquirir novos sistemas RM, por serem naturalmente competentes, através de transferência horizontal de genes, mas também os podem facilmente perder através mutações de MTases, eventos de deleção ou recombinação genética, ficando com vários genes órfãos. Parece então existir um processo dinâmico de aquisição, inativação mutacional e perda de sistemas RM (Figura I.3.). Foi também demonstrado que apesar de muitos dos genes integrantes dos sistemas RM existirem em mais do que uma estirpe bacteriana, diferentes conjuntos de genes se encontram funcionalmente activos, sendo a grande maioria específicos de cada estirpe (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Skoglund *et al.*, 2007; Furuta *et al.*, 2010; Furuta *et al.*, 2011a; Furuta *et al.*, 2011b; Furuta *et al.*, 2011c).

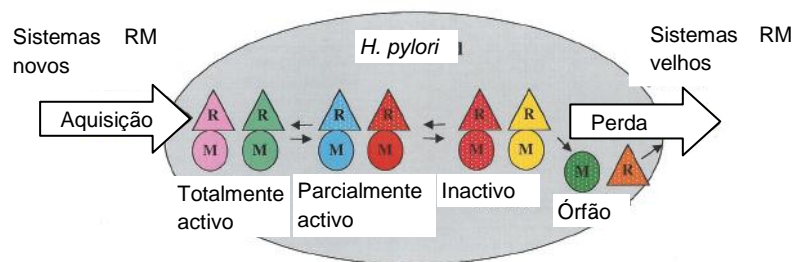


Figura I.3. – Diagrama esquemático que mostra a dinâmica aquisição e perda de genes dos sistemas de RM. As diferentes cores representam diferentes sistemas de restrição e modificação. Os triângulos representam genes R, que codificam para uma REase, e os círculos representam genes M, que codificam para uma MTase. Os genes órfãos não pertencem ao mesmo sistema. Os genes funcionais encontram-se a cor sólida. Os genes inativos estão representados por um padrão pontilhado (adaptado de Lin *et al.*, 2001).

I.2. – Ordem *Campylobacteriales*

A ordem *Campylobacteriales* inclui-se na classe *Epsilonproteobacteria*, que pertence ao filo *Proteobacteria* e ao domínio *Bacteria*. Engloba actualmente a família *Campylobacteraceae*, que inclui os géneros *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Dehalospirillum* e *Sulfurospirillum*, a família *Helicobacteraceae*, que inclui os géneros *Helicobacter*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum*, *Thiovulum* e *Wolinella*, e a família *Hydrogenimonaceae*, que engloba o género *Hydrogenimonas* (<http://www.bacterio.cict.fr/>; Wassenaar & Newell, 2006; Solnick *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2006).

A evolução tecnológica da sequenciação de DNA permite hoje obter a informação genética completa de um ser vivo, ou seja o seu genoma, muito rapidamente e a preços acessíveis. Surge assim material de trabalho para uma nova área da Biologia, a Genómica. Neste momento o GenBank regista mil setecentos e sessenta genomas de procariontes completos e cinco mil duzentos e trinta em curso. A grande maioria da anotação dos genomas tem sido feita de uma forma automática, tendo como referência a informação sobre os genes obtida por várias gerações de cientistas e depositada em várias bases de dados. No que diz respeito aos sistemas de restrição e modificação, o grupo liderado por Richard Roberts desenvolveu software adequado à pesquisa destes genes nos genomas completos e o resultado dessa análise tem sido acrescentado à REBASE (Zheng *et al.*, 2009). A

análise já realizada dos genomas completamente sequenciados de microrganismos pertencentes à ordem *Campylobacterales* revela que nos géneros *Campylobacter*, *Helicobacter* e *Sulfurimonas* existe um número muito elevado de genes com homologia a sistemas RM, apesar de os seus genomas serem relativamente pequenos quando comparados com o genoma de outras espécies bacterianas (Vítor, 1999; Kong *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Vale, 2002) (Tabela I.3. e Figura I.4.).

Tabela I.3. – Sistemas RM nos genomas sequenciados da ordem *Campylobacterales* (adaptado de Roberts *et al.*, 2010).

Família	Género	Espécie	Número de genomas sequenciados	Número mínimo de MTases	Número máximo de MTases
<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>C. concisus</i>	1	-	5
		<i>C. curvus</i>	1	-	7
		<i>C. fetus</i>	1	-	5
		<i>C. hominis</i>	1	-	11
		<i>C. jejuni</i>	9	6	11
		<i>C. lari</i>	1	-	5
	<i>Arcobacter</i>	<i>A. butzleri</i>	2	1	5
		<i>A. nitrofigilis</i>	1	-	4
		<i>Arcobacter sp.</i>	1	-	3
	<i>Dehalospirillum</i>	-	-	-	-
<i>Sulfurospirillum</i>	<i>S. deleyianum</i>	1	-	4	
<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>H. acinonychis</i>	1	-	28
		<i>H. bizzozeronii</i>	1	-	23
		<i>H. felis</i>	1	-	19
		<i>H. hepaticus</i>	1	-	8
		<i>H. mustelae</i>	1	-	8
		<i>H. pylori</i>	31	26	38
	<i>Sulfuricurvum</i>	<i>S. kujiense</i>	1	-	7
	<i>Sulfurimonas</i>	<i>S. autotrophica</i>	1	-	4
		<i>S. denitrificans</i>	1	-	14
	<i>Sulfurovum</i>	<i>Sulfurovum sp.</i>	1	-	4
	<i>Thiovulum</i>	-	-	-	-
	<i>Wolinella</i>	<i>W. succinogenes</i>	1	-	6
<i>Hydrogenimonaceae</i>	<i>Hydrogenimonas</i>	-	-	-	

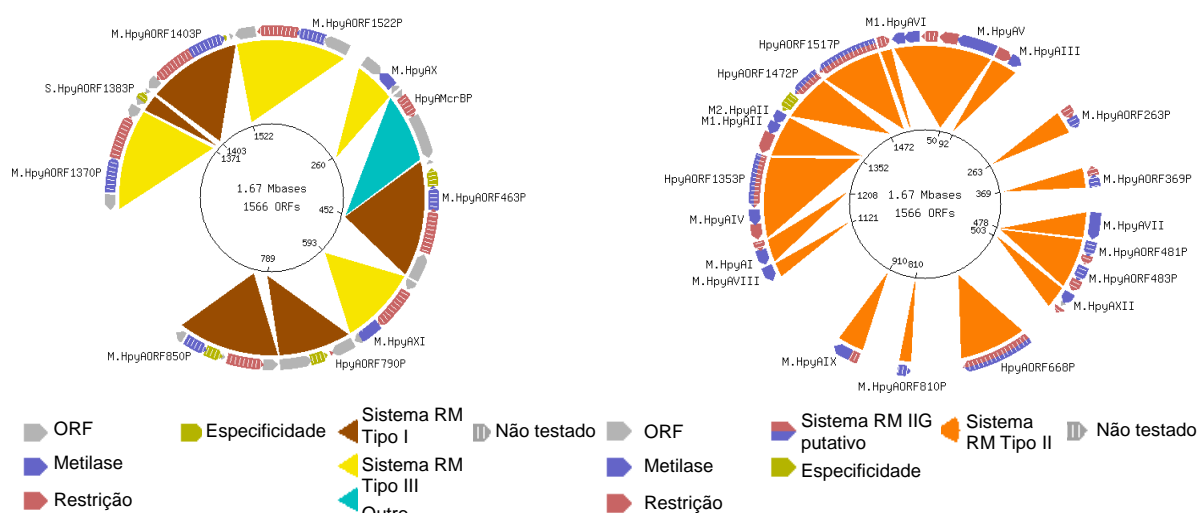


Figura I.4. – À esquerda, sistemas RM do tipo I e III no genoma de *H. pylori* 26695. À direita, sistemas RM do tipo II no genoma de *H. pylori* 26695. É possível observar a presença de vários sistemas RM do tipo IIG putativos (adaptado de Roberts *et al.*, 2010).

I.2.1. – Análise bioinformática dos genomas de *Helicobacter* e *Campylobacter* já sequenciados

Na última década observou-se um extraordinário aumento do número de potenciais sistemas RM descobertos através da análise bioinformática dos genomas (Roberts *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2011) (Gráfico I.1., página 3).

A inspeção visual dos mapas genômicos dos géneros *Helicobacter* e *Campylobacter* com os sistemas RM assinalados permitiu suspeitar que a localização genómica destes sistemas era sempre a mesma (Figuras I.5., I.6., I.7. e I.8.).

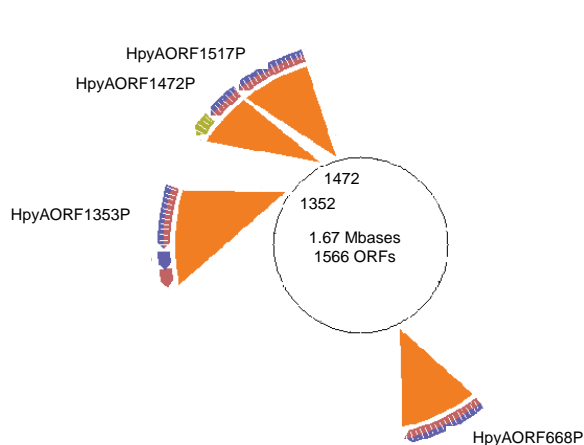


Figura I.5. – Mapa genómico de *H. pylori* 26695 dos sistemas RM do tipo IIG (adaptado de Roberts *et al.*, 2010).

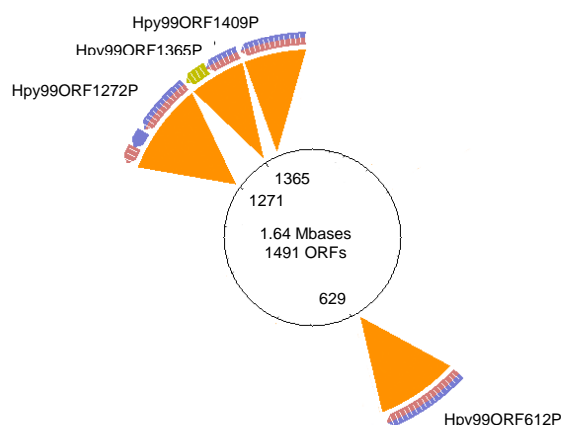


Figura I.6. – Mapa genómico de *H. pylori* J99 dos sistemas RM do tipo IIG (adaptado de Roberts *et al.*, 2010).

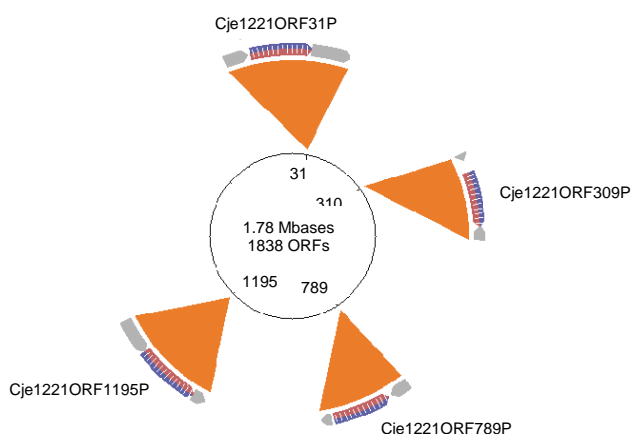


Figura I.7. – Mapa genómico de *C. jejuni* RM1221 dos sistemas RM do tipo IIG (adaptado de Roberts *et al.*, 2010).

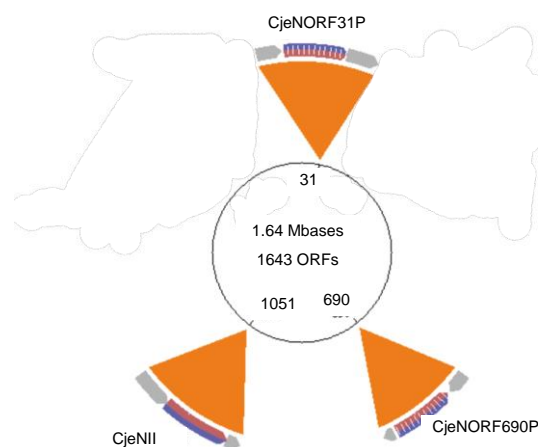


Figura I.8. – Mapa genómico de *C. jejuni* NCTC 11168 dos sistemas RM do tipo IIG (adaptado de Roberts *et al.*, 2010).

Utilizando os genomas de *H. pylori* 26695 e *C. jejuni* RM1221 como referência, realizou-se uma pesquisa aos genomas já completamente sequenciados utilizando o BLASTn (*Basic Local*

Alignment Search Tool nucleotide), tendo-se confirmado essa suspeita para os sistemas RM do tipo IIG nas duas espécies. Encontraram-se assim quatro *loci* em cada espécie, para os quais foram desenhados *primers* (Tabelas II.2. e II.3., página 14) e feitos os respectivos PCRs (Figura I.9.). Nos restantes géneros não foi possível fazer esta análise. No entanto, nos dois genomas sequenciados pertencentes a estirpes do género *Arcobacter* verifica-se que existe um potencial *locus* comum (dados não apresentados).

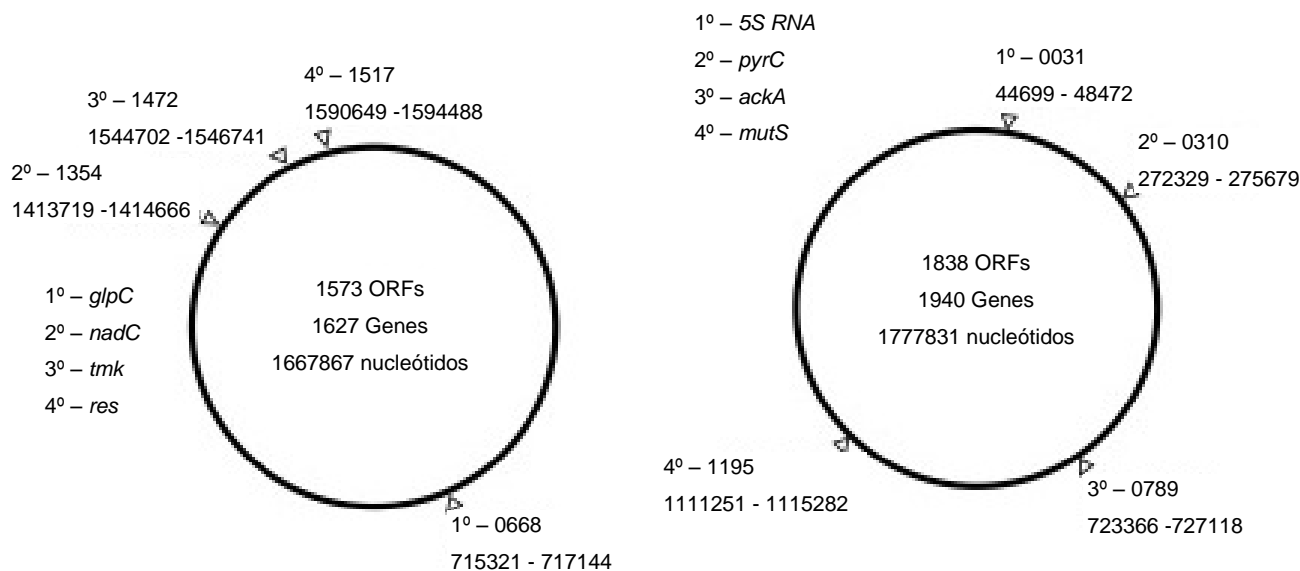


Figura I.9. – Possíveis *loci* no genoma de *H. pylori* 26695 (à esquerda) e *C. jejuni* RM1221 (à direita) que codifiquem para REases do tipo IIG, e respectivos genes que precedem esses *loci*.

I.3. – Hipótese

Existem nos genomas dos géneros *Helicobacter* e *Campylobacter* *loci* bem definidos que codificam para REases do tipo IIG.

I.4. – Objectivo

O principal objectivo deste trabalho foi verificar se estes *loci* são ubiqüitários. A metodologia utilizada foi a técnica de PCR aplicada a uma colecção de 169 estirpes de *Campylobacter* e 17 estirpes de *H. pylori* do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Os produtos de PCR com um perfil de restrição diferente após digestão com HindIII foram clonados em *E. coli* DH10B. Alguns clones foram seleccionados ao acaso para verificar se algum codificava para uma enzima de restrição activa. Caso codificasse para uma enzima de restrição, a sua sequência de reconhecimento seria determinada, bem como as suas condições óptimas de funcionamento (pH, tampões, temperatura).

II. – MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. – Estirpes estudadas

Neste trabalho foram estudadas dezassete estirpes de *H. pylori*, oitenta e quatro estirpes de *C. jejuni* e oitenta e cinco estirpes de *C. coli*. À excepção da estirpe *H. pylori* P1, gentilmente cedida pela Professora Doutora Bianca Bauer do *Max Planck Institute for Infection Biology* (Alemanha), todas as outras estirpes testadas pertenciam às colecções de *Campylobacter* e *Helicobacter* do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. As dezasseis estirpes desconhecidas de *H. pylori* foram isoladas a partir de dezasseis biopsias do estômago (corpo e antro pilórico) de doentes sintomáticos e assintomáticos, após recolha efectuada por endoscopia gástrica no Hospital Pulido Valente.

II.2. – Cultura das estirpes

As estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* conservadas a -80°C em 1 ml Brucella Broth (BD) suplementado com 20% glicerol (Merck) foram semeadas em caixas de Petri com meio Brucella Broth suplementado com 10% soro de bovino fetal (Gipco), ou com meio Mueller Hinton (BD) suplementado com 10% soro de bovino fetal e 1 ml de Campylobacter Selective Supplement – Skirrow (OXOID). As caixas de Petri foram incubadas numa estufa (Heraeus) a 42°C, durante 24 a 48 horas, em jarras de anaerobiose de 2,5 l (OXOID), 3,5 l (OXOID) ou 10 l (BBL), em atmosfera microaerofílica (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂), garantida com recurso a um sistema gerador de gás em jarra de anaerobiose (Campygen, OXOID) ou a uma mistura gasosa de botija (Gasin). Neste último caso foram feitos três ciclos de vácuo alternados com a injeção da referida mistura gasosa.

As estirpes de *H. pylori* conservadas a -80°C em 1 ml Brucella Broth suplementado com 20% glicerol foram semeadas em caixas de Petri com meio *Helicobacter pylori* Selective Medium (Biogerm), ou com meio Brucella Broth suplementado com 10% soro de bovino fetal e 1 ml de *Helicobacter pylori* Selective Supplement – Dent (OXOID). As caixas de Petri foram incubadas numa estufa (Memmert) a 37°C, durante 24 a 48 horas, em jarras de anaerobiose de 2,5 l, 3,5 l ou 10 l, em atmosfera microaerofílica (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂), garantida com recurso a um sistema gerador de gás em jarra de anaerobiose (Campygen, OXOID) ou a uma mistura gasosa de botija (Gasin). Neste último caso foram feitos três ciclos de vácuo alternados com a injeção da referida mistura gasosa.

II.3. – Obtenção do DNA genómico

O DNA genómico das estirpes de *C. jejuni*, *C. coli* e *H. pylori* foi extraído a partir de biomassa de células das estirpes testadas, crescidas em caixa, nas mesmas condições que as descritas em II.2. – Cultura das estirpes, recorrendo ao kit de extracção de DNA genómico QIAamp DNA Mini Kit (50) 51304 (QIAGEN) e seguindo as instruções do fabricante.

II.4. – Obtenção dos produtos de PCR dos diferentes *loci*

As reacções de PCR foram realizadas num Termociclador BIO-RAD C1000, e de acordo com o protocolo da polimerase usada, Phusion® Hot Start High-Fidelity (Finnzymes).

Tabela II.1. – Protocolo da Phusion Hot Start II (adaptado de http://www.finnzymes.com/pdf/phusion_hs2_datasheet_f549sl_1_2_low.pdf).

Etapa ciclo	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	98	30 s	1
Desnaturação	98	10 s	35
<i>Annealing</i>	X* ¹	30 s	
Extensão	72	15-30 s/kb	
Extensão final	72	10 min	1

*¹ = De acordo com o par de *primers* usado.

Tabela II.2. – *Primers* utilizados para a espécie *H. pylori*.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Temperatura de <i>melting</i> - Phusion Hot Start II (°C)* ²	Temperatura de <i>annealing</i> – PCR (°C)	Dimensão do fragmento amplificado (pb)* ³
HpL1 Start	CTGAATAAAAAGCCTTTTAAACCC	62,08	61	2156
HpL1 Stop	GCGTCAAAAAGGGTTTTTT	60,98		
HpL2 Start	CCATCAAGCCACTTTTATTG	60,09	60	3813
HpL2 Stop	TRTTTAAGTTTTCTTTAAAAAATCCAT	60,2		
HpL3 Start	CGCGGATGAATGAGTTATAATT	61,98	62	3562
HpL3 Stop	CCATGCCCAACAAGCC	63,14		
HpL4 Start	AGAAAAGCGTTTTATTTAAAATTCAT	60,53	60,5	5224
HpL4 Stop	AGCGTCCATGCTTACAGG	62,01		

pb - pares de bases

*² = temperatura de *melting* calculada no site: https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html

*³ = baseada na sequência do genoma de *H. pylori* 26695

Tabela II.3. – *Primers* utilizados para as espécies *C. jejuni* e *C. coli*.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Temperatura de <i>melting</i> - Phusion Hot Start II (°C)* ⁴	Temperatura de <i>annealing</i> – PCR (°C)	Dimensão do fragmento amplificado (pb)* ⁵
CampL1 Start	ATGCATTTCACTTTGCTAAATG	61	60	3774
CampL1 Stop	TTATTTCCCTTCTATGATTTTTATTTC	59,99		
CampL2 Start	ACTAAAGARTGTTGYGGTTGTGC	64,37	60	4485
CampL2 Stop	CAGAAAGTATTAAGAACAACACTGCA	61,72		
CampL3 Start	AAGGCTAAATTCTTTAAATTTTTTCAT	60,78	60	3964
CampL3 Stop	CTACAGATGAAGAATTAGAAATCGC	61,36		
CampL4 Start	AAACTCATAAAAGTGTCAGGGC	62,5	62,4	4188
CampL4 Stop	TCCGCTTAATATCATAATGTTTTTCAT	63,47		

pb - pares de bases

*⁴ = temperatura de *melting* calculada no site: https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html

*⁵ = baseada na sequência do genoma de *C. jejuni* RM1221

II.5. – Avaliação dos perfis de restrição dos produtos de PCR dos diferentes *loci*

Os produtos de PCR dos diferentes *loci* foram sujeitos a electroforese (Amersham Pharmacia Biotech Electrophoresis power supply EPS 301) em gel de agarose a 0,9% (LONZA SeaKem LE Agarose) corado com brometo de etídio (1 µg/ml) (Sigma), em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (Merck); ácido bórico 89 mM (Merck); EDTA 2,5 mM (Merck)], a 150 V e 250 mA, para se verificar quais os *loci* onde ocorreu amplificação. Foi também aplicado um marcador de massa molecular conhecida (1 kb) (1 kb DNA Ladder N3232 NEB). Os produtos de PCR dos *loci* onde ocorreu amplificação foram purificados recorrendo ao kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (250) 28-9034-71 (GE Healthcare) e seguindo as instruções do fabricante. Nalgumas estirpes foi possível observar o aparecimento de amplificação inespecífica, tendo surgido mais do que uma banda no gel. Nesses casos, a banda pretendida foi purificada do gel recorrendo ao mesmo kit. De seguida repetiu-se o PCR, exactamente nas mesmas condições do anterior. Nos casos em que após este segundo PCR surgiu uma única banda gel, a estirpe foi testada. Quando após segundo PCR se observou que a amplificação inespecífica se mantinha, a estirpe não foi testada. As estirpes onde se obteve uma única banda mas de dimensões diferentes da esperada também foram testadas.

Após serem conhecidos os *loci* onde ocorreu amplificação foi feita uma digestão dos produtos de PCR com a REase HindIII (20.000 U/ml; NEB), e consequente análise dos resultados por electroforese. A avaliação do número e dimensão das bandas obtidas em gel permitiu determinar se os produtos de PCR dos diferentes *loci* eram idênticos entre si (número e dimensão das bandas obtidas equivalente) e desta forma facilitar o trabalho aquando da clonagem desses produtos, já que na maioria dos casos apenas um produto de PCR diferente de cada *locus* foi clonado.

II.6. – Estratégia PstI/BamHI

O vector utilizado na ligação foi o pUC19 (1 mg/ml; NEB), plasmídeo frequentemente usado na clonagem em *E. coli*. A molécula em dupla cadeia é circular e tem dois mil seiscentos e oitenta e seis pb de comprimento. Tem também um MCS (*multiple cloning site*) com cinquenta e quatro pb e que possui locais únicos de corte para treze REases. Este MCS encontra-se no interior do gene *lacZα*. Para além disso, este plasmídeo possui o gene *bla* (Ap^R) que confere resistência à ampicilina (Catálogo NEB 2010-2011).

Após serem conhecidos os perfis de bandas dos produtos de PCR digeridos com a REase HindIII, foram seleccionados os perfis diferentes obtidos em todos os *loci* para posterior clonagem em *E. coli*. Quer os produtos de PCR obtidos, quer o vector utilizado na ligação, pUC19, foram sujeitos a uma digestão dupla com as REases PstI (20.000 U/ml; NEB) e BamHI (20.000 U/ml; NEB), de forma a criar extremidades coesivas em ambos os lados que permitissem a ligação entre eles na orientação correcta, e em simultâneo impedissem a religação do vector com ele próprio. A digestão dupla com as REases PstI e BamHI foi realizada segundo as condições do fornecedor, e só é possível porque

ambas as enzimas trabalham no mesmo tampão, NEBuffer#3 (NEB). Estas enzimas foram escolhidas porque só cortam o pUC19 uma única vez e as sequências de reconhecimento de ambas são pouco frequentes nos genomas das estirpes de *Helicobacter* e *Campylobacter*, não estão presentes nas regiões a amplificar e encontram-se no *multiple cloning site* (MCS) separadas por um número suficiente de nucleótidos para a digestão ser eficaz por ambas as enzimas. O facto de as sequências de reconhecimento destas REases estarem no MCS vai permite seleccionar as colónias transformantes com base na *white and blue selection*, pois o MCS encontra-se no interior do gene *lacZα* (Figura II.1.). Desta forma, se o plasmídeo contiver um *insert*, vai ser interrompido o gene e este não vai poder codificar a beta-galactosidase, enzima responsável por hidrolizar o substrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido), não sendo produzida a cor azul característica da hidrólise deste substrato. Após terem sido efectuadas as digestões duplas, quer o vector, quer os produtos de PCR foram purificados. Os produtos de PCR foram purificados recorrendo ao kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, e o vector foi purificado com o mesmo kit mas a purificação foi feita a partir de um gel de agarose a 0,9%.

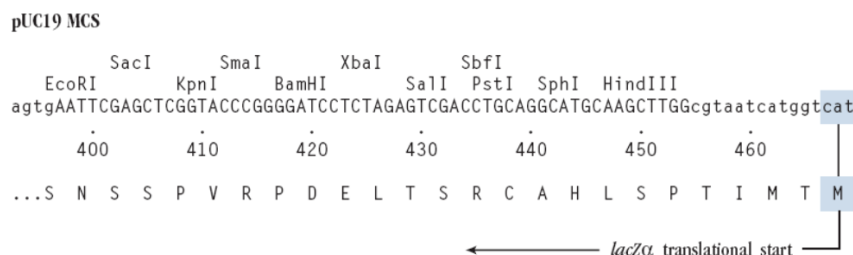


Figura II.1. – Sequência de nucleótidos do MCS do pUC19 (Adaptado de http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/maps/pUC19_map.pdf).

II.7. – Preparação de células competentes

A preparação de células competentes *E. coli* DH10B foi feita de acordo com o seguinte protocolo (adaptado de Vítor, 1999):

- 1) Semeou-se a estirpe de *E. coli* em meio LB (*lysogeny broth*) [Para 1 l: Bacto-Yeast Extract 5 g (BD), Bacto Tryptone 10 g (BD), NaCl 5 g (PA), NaOH 1 M 2 ml (Merck)] e incubou-se 16 a 20 horas a 37°C.
- 2) Inoculou-se 5 ml de LB suplementado com MgSO₄ (20 mM) com uma colónia e incubar *o.n.* (*overnight*) com agitação.
- 3) Inocularam-se 100 ml de LB suplementado com MgSO₄ (20 mM) pré-aquecido com 1 ml da cultura *o.n.* e incubou-se a 37°C com agitação vigorosa, 300 rpm, até a D.O. 590 nm = 0.375.

Nota: A densidade celular não excedeu 10⁸ células/ml.

- 4) Transferiram-se as células para dois tubos Falcon 50 ml, previamente arrefecidos a 0°C, e incubou-se 5 a 10 minutos no gelo.

Nota: Em todos os passos seguintes mantiveram-se as células sempre no gelo.

- 5) Centrifugaram-se os tubos Falcon a 3200 rpm durante 10 minutos a 4°C. Utilizou-se para tal uma centrífuga refrigerada Beckman Coulter Allegra 6R.
Nota: Não se utilizou o travão da centrífuga.
- 6) Decantou-se o sobrenadante e aspirou-se o líquido restante com pipeta de Pasteur estirada estéril.
- 7) Ressuspendeu-se cada *pellet* em 10 ml de CaCl₂ (0,1 M) estéril, arrefecido a 0°C, e repetiram-se pontos 4 e 5 (repetir por 2X).
- 8) Ressuspendeu-se cada *pellet* em 10 ml de CaCl₂ (0,1 M), arrefecido a 0°C, e incubou-se 30 minutos no gelo.
- 9) Centrifugaram-se os tubos Falcon a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C.
Nota: Não se utilizou o travão da centrífuga.
- 10) Ressuspendeu-se cada *pellet* em 2 ml de CaCl₂ (0,1 M), arrefecido a 0°C e distribuíram-se rapidamente alíquotas de 100 µl para tubos Eppendorf estéreis previamente arrefecidos com 40 µl glicerol.
- 11) Conservaram-se os tubos Eppendorf a -80°C.

II.8. – Ligação e transformação

A ligação dos produtos de PCR ao vector foi efectuada recorrendo ao Quick Ligation kit (M2200 NEB) e seguindo as instruções do fabricante, tendo sido usada uma proporção de 12:1, 12 µl de produto de PCR para 1 µl de pUC diluído de 1 para 10.

A transformação foi efectuada de acordo com o seguinte protocolo (adaptado de Vítor, 1999):

- 1) Descongelaram-se as células competentes no gelo.
- 2) Pipetaram-se 10 µl do produto de ligação arrefecido para tubo Eppendorf previamente arrefecido no gelo.
- 3) Adicionaram-se 100 µl de células competentes e homogeneizou-se suavemente com a pipeta.
- 4) Incubou-se o tubo Eppendorf no gelo durante 30 minutos.
- 5) Transferiu-se o tubo Eppendorf para banho a 42°C (Boekel Model 111002) e incubou-se durante 2 minutos.
- 6) Transferiu-se o tubo Eppendorf para o gelo e plaqueou-se todo o volume em meio LB suplementado com ampicilina (100 mg/ml) e X-gal (0,4 µl/ml), com o auxílio de um espalhador de vidro até o meio ficar seco.
- 7) Incubou-se a caixa de Petri numa estufa a 37°C por pelo menos 12 horas.

Nota: Todas as etapas do protocolo da transformação foram efectuada em assepsia.

Em simultâneo com cada conjunto de construções (ligação+transformação) realizado foram feitos três controlos de forma a minimizar o efeito de possíveis clones falsos positivos e falsos negativos: i) as células de *E. coli* DH10B foram transformadas só com o plasmídeo (pUC19), sem *insert*; ii) as células de *E. coli* DH10B foram transformadas com o plasmídeo (pUC19) digerido com PstI e BamHI e religado; iii) as células de *E. coli* DH10B foram transformadas com o plasmídeo

(pUC19) digerido com PstI e BamHI mas não religado. Desta forma foi possível perceber se: o pUC19 estava em boas condições e conferia aos clones resistência à ampicilina usada no meio de cultura; se as células competentes estavam de facto competentes para poderem incorporar o nosso *insert*; se as REases usadas na digestão estavam a trabalhar a 100% e a actuar no seu local de reconhecimento no DNA; e se a purificação após a digestão do pUC19 com as ER PstI e BamHI tinha de facto eliminado o fragmento de 18pb que se situa entre os locais de reconhecimento das duas REases no MCS, impedindo assim que este se tornasse a religar.

A selecção das colónias transformantes foi feita com base na *white and blue selection*. Foram seleccionadas ao acaso^{*6} algumas (cerca de 20)^{*7} colónias brancas de cada construção que foram repicadas com o auxílio de uma grelha para novo meio LB suplementado com ampicilina (100 mg/ml) e X-gal (0,4 µl/ml). Essas caixas foram incubadas durante pelo menos 12 horas em estufa a 37°C e posteriormente conservadas no frigorífico a 4°C. Simultaneamente, essas colónias foram também incubadas em tubo de ensaio com 10 ml meio líquido LB suplementado com ampicilina, durante pelo menos 12 horas, com agitação (180 rpm), em estufa a 37°C. Desses 10 ml, 1 ml foi usado para fazer novos tubos de conservação das estirpes, ao qual foi adicionado 20% glicerol, tubos esses que foram conservados a -80°C. Retirou-se também 1 ml para fazer a extracção de plasmídeos. O restante volume foi transferido para tubos Falcon 15 ml, e os tubos foram centrifugados a 15000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, numa centrífuga refrigerada Beckman Coulter Allegra 6R. Desprezou-se o sobrenadante, suspendeu-se o *pellet* em 1 ml tampão de sonicação (T.S.) 50 mM NaCl [Para fazer 500 ml T.S. 50 mM NaCl: juntar 25 ml T.S. 1 M NaCl com 475 ml T.S. 0 M NaCl; T.S. 0 M NaCl – Tris-HCl 20 mM (Merck) pH 7,5, EDTA 0,1 mM (Merck), 2-mercaptoetanol 0,5 ml.l⁻¹ (Sigma); T.S. 1 M NaCl - Tris-HCl 20 mM (Merck) pH 7,5, EDTA 0,1 mM (Merck), 2-mercaptoetanol 0,5 ml.l⁻¹ (Sigma), NaCl 1 M (PA)] e guardaram-se os tubos Falcon a -20°C.

^{*6} = Apesar de as colónias terem sido seleccionadas ao acaso, quando se verificou a olho nú existência de colónias com dimensões variadas (pequenas, médias e grande), tentou-se incluir nestas colónias representantes de todas as dimensões.

^{*7} = O número de colónias seleccionadas dependeu do número de colónias transformantes obtido em cada construção.

II.9. – Avaliação dos clones

Os plasmídeos foram extraídos recorrendo ao kit *illustra plasmidPrep Mini Spin (250) 28-9042-79* (GE Healthcare) e sujeitos a electroforese em gel de agarose a 0.9%, juntamente com um marcador de 1 kb (NEB), para além do vector pUC19 que serviu como controlo, de forma a determinar quais os plasmídeos com *insert*.

II.10. – Obtenção de extractos brutos enzimáticos

Após serem conhecidos quais os clones cujos plasmídeos possuíam *insert* foram descongelados os tubos Falcon 15 ml conservados a -20°C (passo II.8.), que continham as células bacterianas suspensas em 1 ml T.S. 50 mM NaCl, para se proceder à obtenção dos extractos brutos enzimáticos (EBE). Para tal, procedeu-se de acordo com o seguinte protocolo (adaptado de Schildkraut, 1984):

- 1) Transferiram-se as suspensões bacterianas para tubos Eppendorf 1,5 ml.
- 2) Sintonizou-se o sonicador (VC375 Sonics&Materials Vibra cell) para a potência máxima das *microtips* e sonicou-se, em gelo, durante 1 minuto, com pulsos de 1 segundo.
Nota: Teve-se o cuidado de verificar se o espigão de aço estava mergulhado na suspensão bacteriana sem tocar nas paredes ou no fundo do tubo. Isto de forma a evitar ao máximo a libertação de calor que poderia desnaturar a nossa proteína (REase).
- 3) Centrifugou-se a 12000 rpm durante 5 minutos, a 4°C, de forma a remover os restos das membranas e dos microrganismos que resistiram à sonicação, tendo-se utilizado para tal uma centrífuga refrigerada Heraeus biofuge primo R.
- 4) Recolheu-se o sobrenadante para novo tubo Eppendorf 1,5 ml e ensaiou-se de imediato a actividade.

II.11. – Ensaio de actividade de restrição do extracto bruto enzimático

O ensaio de actividade de restrição do EBE foi feito de acordo com o seguinte protocolo (adaptado de Schildkraut, 1984):

- 1) Aplicaram-se 75 µl da solução de mistura do DNA indicador [258 µl água para injectáveis; 30 µl NEBuffer#2 (NEB); 12 µl DNA do fago λ desmetilado (1 µg/ml; NEB)] no primeiro poço de uma microplaca e 50 µl nos quatro poços seguintes.
- 2) Aplicaram-se 12,5 µl do EBE ao primeiro poço da microplaca.
- 3) Homogeneizou-se e fez-se uma série de diluições, retirando 25 µl do primeiro poço e aplicando ao segundo poço e assim sucessivamente até ao quinto e último poço. Homogeneizou-se sempre bem entre diluições.
- 4) Taparam-se os poços da microplaca com fita adesiva e incubou-se a microplaca durante 1 hora a 37°C.
- 5) Após incubação, adicionou-se a cada poço 5 µl de solução stop [azul de bromofenol 0,2% (p/v) (BDH), xileno de cianol 0,2% (p/v) (BDH), glicerol 50% (v/v) (Merck), EDTA 50 mM (Merck) em água bidestilada estéril]. A adição de solução stop termina a reacção pois esta solução contém EDTA, que ao complexar com o ião magnésio, impede a continuação da acção da REase.
- 6) Aplicaram-se as amostras em gel de agarose a 0,9% e procedeu-se à respectiva electroforese. Após a electroforese fotografou-se o gel.

Através do recurso a uma série de diluições do EBE, reduz-se a interferência de RNA e/ou nucleases no ensaio, e por vezes torna-se possível calcular aproximadamente o número de unidades enzimáticas presentes no extracto total. As estirpes com REases são facilmente identificadas, pois na presença de uma REase o DNA indicador aparece fragmentado em bandas discretas, o que origina uma diminuição da intensidade da banda que corresponde à sua forma intacta. Possíveis falsos positivos, resultantes da presença de RNA ou plasmídeos, são facilmente eliminados, pois o efeito da diluição implica uma decrescente intensidade destas bandas em comparação com a banda do DNA indicador que permanece estável. Os possíveis falsos negativos podem surgir devido à ausência da sequência de reconhecimento no DNA indicador escolhido, o que pode ser ultrapassado se forem usados outros DNAs. A lise bacteriana insuficiente também pode implicar um resultado falso negativo, mas a visualização de bandas de RNA é indicadora de lise eficaz. Outros factores podem originar falsos negativos, como a falta de conhecimento da temperatura óptima da REase, da força iónica, da concentração salina do tampão, da necessidade de outros factores para a restrição, do estado de metilação do DNA e da presença de nucleases específicas que mascaram os fragmentos de DNA resultantes da restrição (Vitor, 1999).

II.12. – Purificação da enzima de restrição

Como na maioria dos casos o DNA indicador não é completamente hidrolisado pela acção do EBE, devido à existência de outras proteínas em solução, não são obtidos perfis de restrição claros. Torna-se por isso necessário proceder à purificação da REase. Uma vez que a sua identificação se faz por comparação com os perfis de restrição gerados no computador, é fundamental a existência de digestões perceptíveis e completas.

A purificação da REase foi efectuada de acordo com o seguinte protocolo (adaptado de Vitor, 1999):

I – Lise celular

- 1) Os clones cujo EBE tinha actividade foram postos a crescer em 500 ml meio líquido LB suplementado com ampicilina (100 mg/ml) e incubados *o.n.* com agitação (120 rpm), a 37°C.
- 2) A biomassa foi então dividida por dois frascos de centrífuga de 250 ml e procedeu-se à sua centrifugação em centrífuga refrigerada Beckman Coulter Allegra 6R durante 15 minutos a 5000 rpm e 4°C.
- 3) Desprezaram-se os sobrenadantes e suspenderam-se os *pellets* em 5 ml T.S. 50 mM NaCl.
- 4) Transferiram-se as suspensões bacterianas de ambos os frascos de centrífuga para tubo de aço de 50 ml e manteve-se o tubo no gelo.
- 5) Sintonizou-se o sonicador (VC375 Sonics&Materials Vibra cell) para a potência máxima das *microtips* e sonicou-se, em gelo, a suspensão bacteriana durante 4 minutos com pulsos de 1 segundo. Fez-se uma pausa de 2 minutos e voltou-se a sonicar a suspensão bacteriana durante mais 4 minutos com pulsos de 1 segundo.

Nota: Teve-se o cuidado de verificar se o espigão de aço estava mergulhado na suspensão bacteriana sem tocar nas paredes ou no fundo do tubo. Isto de forma a evitar ao máximo a libertação de calor que poderia desnaturar a proteína (REase).

- 6) Transferiu-se a suspensão bacteriana para um tubo Falcon 50 ml e centrifugou-se em centrífuga refrigerada Beckman Coulter Allegra 6R durante 15 minutos a 5000 rpm e 4°C.
- 7) Transferiu-se o sobrenadante para um tubo Falcon 15 ml e manteve-se no gelo.

II – Cromatografia em coluna de baixa pressão

Todas as soluções usadas estavam à temperatura de 4°C, tendo sido a cromatografia efectuada à mesma temperatura.

- 8) Lavou-se a coluna de cromatografia (Sigma; 10 centímetros de comprimento e 1 de diâmetro) com água destilada e álcool.
- 9) Homogeneizou-se a suspensão da matriz [Heparina Sepharose CL-6B (Pharmacia)] sem fazer bolhas e verteu-se 2 ml na coluna inclinada. Verificou-se se não existiam bolhas de ar.
- 10) Colocou-se a coluna na vertical dentro do frigorífico, abriu-se a válvula da coluna e deixou-se a matriz compactar.
- 11) Lavou-se por gravidade a matriz com 10 ml de T.S. da mesma molaridade da amostra (50 mM NaCl) e regulou-se o colector de fracções de forma a recolher fracções de 10 ml.
- 12) Aplicou-se a amostra (obtida no passo 7) com o auxílio de uma bomba peristáltica, regulada para debitar um fluxo de 0,5 ml.min⁻¹. Recolheu-se uma fracção de 10 ml (aplicação).
- 13) Lavou-se a coluna com 10 ml de T.S. da mesma molaridade da amostra (50 mM NaCl). Recolheu-se uma fracção de 10 ml (lavagem).
- 14) Regulou-se o colector de fracções de forma a recolher fracções de 1,75 ml e iniciou-se a eluição das proteínas com um gradiente contínuo de 50 mM a 1 M NaCl em T.S.

Nota: No final recolheram-se 31 fracções, para além da aplicação e da lavagem.

III – Ensaio da actividade enzimática das fracções da coluna

- 15) Preparou-se uma solução de mistura do DNA indicador [Para cada fracção: 1 µl DNA do fago λ desmetilado (1 µg/ml); 5 µl NEBuffer#2 (NEB); 44 µl água para injectáveis] para aplicação, lavagem e fracções ímpares.
- 16) Distribuíram-se 50 µl da solução de mistura do DNA indicador por cada poço da microplaca.
- 17) Aplicaram-se 5 µl de cada fracção a ensaiar, fracções ímpares, bem como as fracções correspondentes à aplicação e à lavagem, a cada um dos poços da microplaca.
- 18) Taparam-se os poços com fita adesiva e incubou-se a microplaca a 37°C durante 1 hora.
- 19) A cada poço aplicou-se 5 µl de solução stop, aplicaram-se as amostras em gel de agarose a 0,9% e procedeu-se à respectiva electroforese. Após a electroforese fotografou-se o gel.

IV – Concentração

- 20) Seleccionaram-se as fracções que exibiam os perfis de restrição mais nítidos (não esquecer as fracções pares) e aplicaram-se num concentrador (Vivaspin Sartorius 100.000 MWCO).

- 21) Centrifugou-se durante uma hora, a 4°C, à rotação indicada para o tipo de concentrador usado, segundo indicações do fabricante, até se obter no final pelo menos 1/10 do volume inicial.
- 22) Adicionou-se glicerol de modo a obter uma concentração final de 50% (v/v) e homogeneizou-se.
- 23) Conservou-se a -20°C.

II.13. – Optimização das condições de reacção

Depois de se analisar o gel do ensaio da actividade enzimática das fracções da coluna seleccionou-se a fracção em que a REase apresentou melhor actividade e procedeu-se à determinação da temperatura óptima da REase, bem como do tampão em que a REase é mais activa. Foram testadas três temperaturas, 22°C, 37°C e 65°C, em tampão de média concentração salina, NEBuffer#2, pois muitas REases são activas neste tipo de tampão. Foram também ensaiados os quatro tampões básicos da NEB (Tabela II.4.), à temperatura de 37°C, pois muitas REases são activas a esta temperatura. O DNA usado nos ensaios foi o DNA do fago λ desmetilado, e os ensaios foram realizados na presença e na ausência de SAM.

Tabela II.4. – Composição dos tampões de digestão (adaptado de Catálogo NEB 2010-2011).

Designação	Composição	pH a 25°C
NEBuffer#1	10 mM Tris Propano-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT	7,0
NEBuffer#2	10 mM Tris HCl, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 1 mM DTT	7,9
NEBuffer#3	50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 1 mM DTT	7,9
NEBuffer#4	20 mM Tris Ac, 10 mM MgAc, 50 mM KAc, 1 mM DTT	7,9

A forma mais eficaz de se verificar se se estava na presença de um perfil de restrição completo foi somar os pesos moleculares dos fragmentos gerados e verificar se essa soma correspondia à dimensão total do DNA indicador escolhido. Caso a soma das bandas tivesse uma dimensão superior à do DNA indicador escolhido, a digestão seria parcial, sendo necessário aumentar a concentração da REase, aumentar o tempo de digestão, diminuir a concentração do DNA indicador ou fazer combinações destas alterações. Sempre que possível, a determinação do perfil de restrição foi feita utilizando DNA de baixo peso molecular, como por exemplo pUC19 ou λ , de forma a analisar um reduzido número de fragmentos de restrição (Vítor, 1999).

II.14. – Mapeamento e determinação da sequência de reconhecimento

A caracterização de uma REase envolve a descrição dos padrões de clivagem de diferentes amostras de DNA e da determinação da sequência de reconhecimento. Em termos práticos a sequência de reconhecimento é a propriedade da REase que é fundamental e que precisa de ser conhecida (Roberts, 1976).

Para se determinar a sequência de reconhecimento foi feita uma comparação visual de vários perfis de restrição obtidos pela acção da REase em estudo com perfis gerados por computador das REases já descritas. De forma a facilitar a identificação visual procuraram-se os perfis mais claros e com o menor número de bandas. Os DNA frequentemente usados foram, para além do DNA do fago λ , DNA de outros bacteriófagos, como o T7 e o ϕ X174, e de plasmídeos, como o pUC19 e o pBR322. Ao encontrar um perfil de restrição semelhante ao da REase em estudo, realizou-se, sempre que possível, um ensaio triplo em que se comparou, por electroforese em gel a 1.4%, os perfis gerados pela REase desconhecida, pelo seu potencial isosquisómero e pela mistura de ambas. Caso os três perfis fossem iguais a identificação era positiva. Contudo, verificou-se que não só nem sempre foi possível obter digestões completas do DNA substrato, como também fracções com uma REase isolada, ou seja, poderia existir mais que uma REase na mesma fracção. Assim sendo recorreu-se ao mapeamento do local de corte em DNA conhecidos (λ , T7, ϕ X174, pUC19 e pBR322), quer com a fracção em que a REase apresentou melhor actividade, quer com o concentrado. Estes DNA foram digeridos em simultâneo pela REase em estudo e por uma REase comercialmente disponível, que cliva o DNA num único local, sendo esse local conhecido. Este procedimento foi realizado por mais três vezes, recorrendo sempre a REases comerciais cujos locais de corte eram conhecidos. Para além disso foi aplicado um outro critério na escolha das REases comerciais, as quatro REases usadas na digestão do DNA tinham locais de corte relativamente equidistantes ou diametralmente opostos. Os locais de corte funcionaram como “âncoras” em relação a um local de corte da REase em estudo, reduzindo assim o número de isosquisómeros possível. No final, graças ao cruzamento de toda a informação foi possível decifrar se a REase em estudo era um isosquisómero de outra já descrita, ou se se tratava de uma REase com uma sequência de reconhecimento nova (Roberts, 1976; Vítor, 1999; Vale, 2002).

A determinação da sequência de reconhecimento foi feita com recurso aos programas de utilização gratuita NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) e REBpredictor (Gingeras *et al.*, 1978). Com base nos perfis de restrição completos, estes programas indicam várias sequências que podem explicar o perfil de restrição obtido. Comparando com o mapeamento feito previamente conseguiu-se assim determinar a sequência reconhecida. A confirmação poderá ser obtida por sequenciação de um fragmento do perfil de restrição (técnica não realizada).

II.15. – Ensaio com recurso a um coquetel de bacteriófagos

Apesar de não se saber ao certo as funções dos sistemas RM pensa-se que uma delas poderá ser a de defender o hospedeiro contra a invasão por DNAs exógenos, tais como plasmídeos conjugativos e bacteriófagos. Como tal foi feita uma abordagem diferente de encontrar clones cujo extracto bruto enzimático tivesse actividade, ou seja, clones cujos *inserts* codificassem para uma REase activa. Essa tentativa baseou-se no recurso a um coquetel de bacteriófagos^{*8}, que foi usado para tentar seleccionar as bactérias produtoras de REase. Este teste foi feito de acordo com o seguinte protocolo:

- 1) Seleccionaram-se dois produtos de PCR de cada *locus* de amostras onde ocorreu amplificação. Teve-se o cuidado de escolher produtos de PCR com perfis de bandas diferentes, após digestão com HindIII. No total foram seleccionados 8 perfis diferentes de estirpes de cada género, *Helicobacter* e *Campylobacter*.
- 2) Descongelaram-se os produtos de PCR seleccionados e o vector (pUC19), ambos já digeridos com as REases PstI e BamHI e efectuaram-se novas ligações entre eles, tendo sido novamente usada uma proporção de 12:1, 12 µl de produto de PCR para 1 µl de pUC diluído de 1 para 10.
- 3) Efectuaram-se novas transformações, seguindo o mesmo protocolo (II.8. – Ligação e transformação) das anteriores, contudo no passo 6, após se terem transferido os tubos Eppendorf para o gelo não se plaqueou todo o volume em meio LB suplementado com ampicilina (100 mg/ml) e X-gal (0,4 µl/ml). Em vez disso, transferiu-se o volume do tubo Eppendorf para 5 ml de meio líquido LB suplementado com glucose (20 mM).
- 4) Os tubos de ensaio foram incubados em estufa a 37°C, com agitação (180 rpm), durante 3 horas.
- 5) Após esse período, o volume de cada tubo de ensaio (sensivelmente 5 ml) foi dividido por 2 novos tubos de ensaio com meio LB suplementado com ampicilina (100 mg/ml). A um dos tubos juntaram-se 10 µl de concentrado de um coquetel de bacteriófagos. O outro tubo, ao qual não se adicionaram os 10 µl serviu de controlo.
- 6) Incubaram-se os tubos de ensaio em estufa a 37°C durante 1 hora.
- 7) Incubaram-se os tubos de ensaio em estufa a 37°C, com agitação, durante 66 horas. De 12 em 12 horas foram feitas inspecções visuais da densidade óptica do meio.
- 8) Após o referido tempo de incubação foram feitos dois tipos de ensaio: determinação das UFC (unidades formadoras de colónias), recorrendo a diluições seriadas de 1:10 a partir de 90 µl de meio fresco LB suplementado com ampicilina (100 mg/ml) e 10 µl de inóculo de cada tubo de ensaio; e ensaio de actividade de restrição do EBE, de acordo com o protocolo II.11. – Ensaio de actividade de restrição do extracto bruto enzimático.

*⁸ – Este coquetel de bacteriófagos teve origem em fezes de mamífero (porco). Trata-se de um coquetel e não de um bacteriófago isolado porque aquando do teste foram observadas placas fágicas de diferentes diâmetros, e durante o trabalho foi seguido o critério de que placas fágicas de diferentes diâmetros corresponderiam a diferentes fagos.

III. – RESULTADOS

III.1. – Produtos de PCR dos diferentes *loci* e respectivos perfis de restrição

Os resultados dos produtos de PCR dos quatro *loci* de *H. pylori* estão resumidos na tabela III.1. e alguns resultados são mostrados nas figuras III.1. e III.2., página 27. Os resultados dos produtos de PCR dos quatro *loci* de *C. coli* e *C. jejuni* estão resumidos na tabela III.2..

Tabela III.1. – Resultados referentes às 17 estirpes de *H. pylori* testadas.

17 estirpes testadas	HpL1	%* ¹⁰	HpL2	%* ¹⁰	HpL3	%* ¹⁰	HpL4	%* ¹⁰
Número de amostras onde se conseguiu obter uma única banda, com ou sem a dimensão esperada	6	35,29	8	47,06	15	88,24	7	41,18
Produto de PCR com a dimensão esperada	6	35,29	7	41,18	14	82,36	3	17,65
Sem amplificação	11	64,71	0	0	0	0	9	52,94
Amplificação inespecífica	0	0	9	52,94	2	11,76	1	5,88
Amplificação inespecífica mas após purificação do gel e novo PCR conseguiu isolar-se a banda	0	0	1	5,88	0	0	2	11,76
Produto de PCR com dimensão diferente da esperada	0	0	0	0	1	5,88	2	11,76
Número de perfis de digestão diferentes* ⁹	2	-	5	-	8	-	5	-
Número provável de diferentes REases* ⁹	2	-	5	-	8	-	5	-

*⁹ – Estes valores apenas se referem às estirpes onde se conseguiu obter uma única banda, com ou sem a dimensão esperada.

*¹⁰ – O valor da percentagem aparece arredondado a duas casas decimais.

Tabela III.2. – Resultados referentes às 169 estirpes de *Campylobacter* testadas.

169 estirpes testadas	CL1	%* ¹²	CL2	%* ¹²	CL3	%* ¹²	CL4	%* ¹²
Número de estirpes onde se conseguiu obter uma única banda, com ou sem a dimensão esperada	39	23,08	145	85,80	114	67,45	139	82,25
Produto de PCR com a dimensão esperada	39	23,08	36	21,30	114	67,45	122	72,19
Sem amplificação	109	64,50	23	13,61	41	24,26	23	13,61
Amplificação inespecífica	21	12,43	1	0,59	14	8,28	7	4,14
Amplificação inespecífica mas após purificação do gel e novo PCR conseguiu isolar-se a banda	0	0	0	0	0	0	0	0
Produto de PCR com dimensão diferente da esperada	0	0	109	64,50	0	0	17	10,06
Número de perfis de digestão diferentes* ¹¹	4	-	9	-	4	-	12	-
Número provável de diferentes REases* ¹¹	4	-	9	-	4	-	12	-

*¹¹ – Estes valores apenas se referem às estirpes onde se conseguiu obter uma única banda, com ou sem a dimensão esperada, e cujos perfis de digestão são conhecidos. Nem todos os produtos de PCR foram digeridos com HindIII e portanto o número de perfis de digestão e de prováveis REases diferentes poderá ser superior ao apresentado.

*¹² – O valor da percentagem aparece arredondado a duas casas decimais.

Os resultados da avaliação dos perfis de restrição dos produtos de PCR dos diferentes *loci* de *H. pylori* encontram-se expressos na Tabela III.3.. A tabela com os resultados das estirpes de *Campylobacter* testadas encontra-se nos Anexos (Tabela VI.1., páginas 40 a 43).

Tabela III.3. – Resultados dos perfis de restrição com HindIII das 17 estirpes de *H. pylori* testadas.

<i>Helicobacter</i> sp.	HpL1 (2156pb)	Perfil após digestão com HindIII	HpL2 (3813pb)	Perfil após digestão com HindIII	HpL3 (3562pb)	Perfil após digestão com HindIII	HpL4 (5224pb)	Perfil após digestão com HindIII	Perfil da estirpe
B1A	+	A	+	A	+	A	+ - +	A	AAAA
B1C	+	A	+	A	+	A	+ -	X	AAA0
B3A	-	X	+ - +	B	+ -	X	-	X	0B00
B3C	-	X	+ -	X	+	B	+ - +	B	00BB
B4A	-	X	+ -	X	*	C	+	C	00CC
B4C	-	X	+ -	X	+ -	X	+	C	000C
B6A	+	B	+	C	+	D	+	D	BCDD
B6C	+	B	+	C	+	D	-	X	BCD0
B8A	-	X	+ -	X	+	E	*	E	00EE
B8C	-	X	+ -	X	+	E	*	E	00EE
B10A	-	X	+	D	+	F	-	X	0DF0
B10C	-	X	+ -	X	+	F	-	X	00F0
B11A	+	A	+ -	X	+	G	-	X	A0G0
B11C	+	A	+ -	X	+	G	-	X	A0G0
B14A	-	X	+	E	+	H	-	X	0EH0
B14C	-	X	+	E	+	H	-	X	0EH0
P1	-	X	+ -	X	+	H	-	X	00H0

+ = Produto de PCR com a dimensão esperada.

- = Não houve amplificação.

+ - = Houve amplificação inespecífica.

+ - + = Houve amplificação inespecífica mas após a banda pretendida ter sido purificada do gel e ter sido feito novo PCR, conseguiu isolar-se a banda.

* = Produto de PCR com uma dimensão diferente da esperada.

0 = Locus vazio.

X = Não foi determinado o perfil de digestão pois não houve amplificação.

III.2. – Pesquisa de enzimas de restrição em clones de *Helicobacter*

III.2.1. – Ensaio de actividade de restrição

A pesquisa de REases foi efectuada através da análise do ensaio de actividade de restrição do EBE (II.11. – Ensaio actividade de restrição do extracto bruto enzimático, páginas 19 e 20) de todos os clones com *insert*.

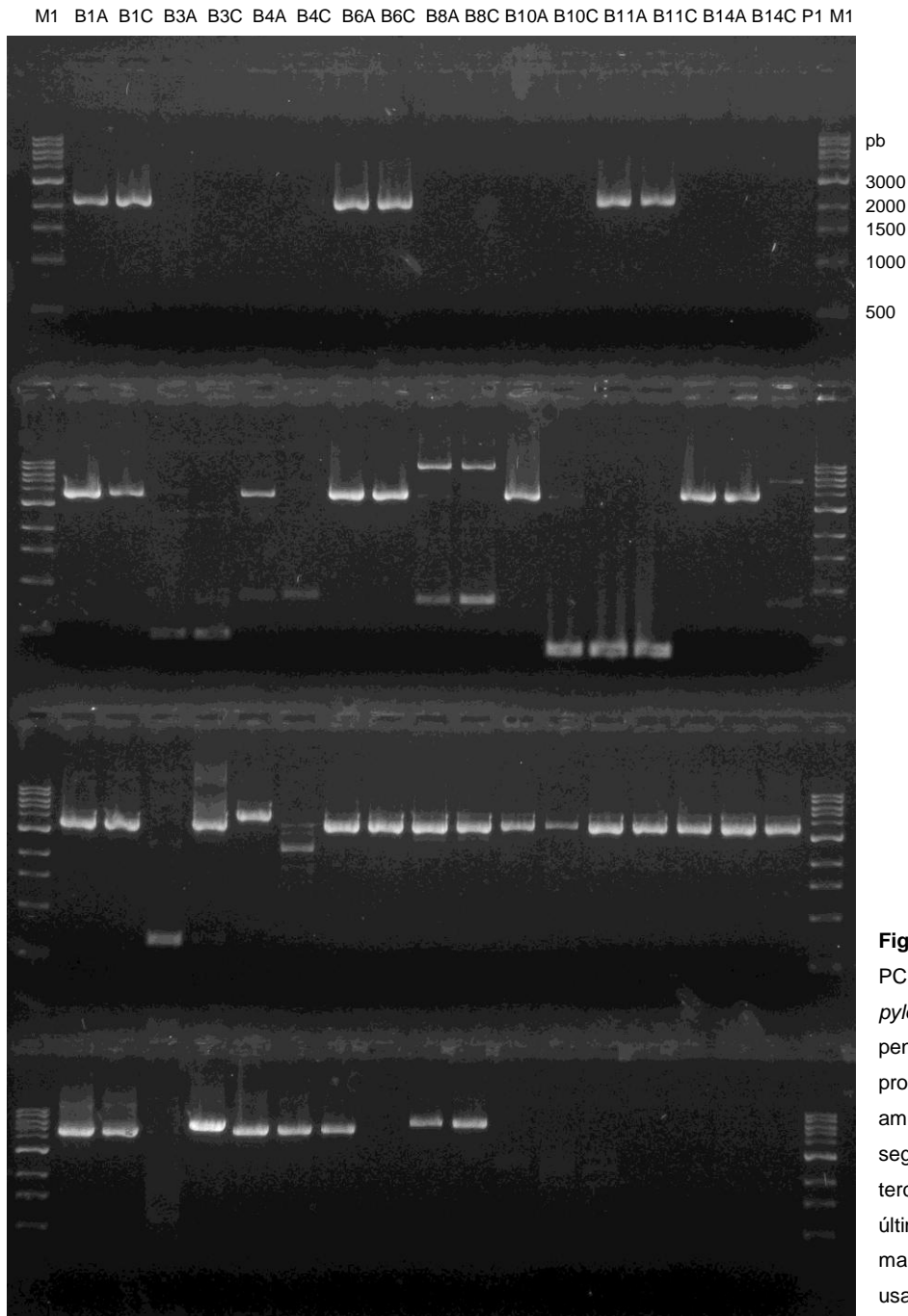


Figura III.1. – Produtos de PCR das 17 estirpes de *H. pylori* testadas. No primeiro pente foram aplicados os produtos de PCR obtidos por amplificação do locus HpL1, no segundo do locus HpL2, no terceiro do locus HpL3 e no último do locus HpL4. O marcador de massa molecular usado (M1) foi o de 1kb (NEB).

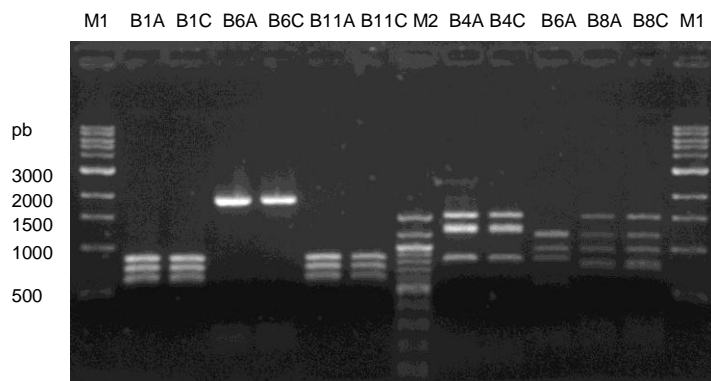


Figura III.2. – Perfis de restrição de alguns dos produtos de PCR obtidos por amplificação dos HpL1 [à esquerda do marcador de 100 bp (M2), 100bp DNA Ladder N3231 New England Biolabs] HpL4 [à direita do marcador de 100 bp (M2)]. Foi também usado o marcador de massa molecular 1 kb (M1) (NEB).

Foram clonados todos os perfis diferentes e de cada construção foram testadas algumas colónias brancas, número esse que variou consoante o número de colónias transformantes obtido. Sabendo que o vector utilizado na ligação foi o pUC19 (2686 pb) e conhecendo as dimensões dos fragmentos amplificados em cada gene, foi possível perceber através da análise do gel que os plasmídeos dos clones com o *insert* pretendido surgiam no gel com uma dimensão correspondente à soma do número de pares de bases do pUC19 com o número de pares de bases do fragmento a amplificar (Figura III.3.). É de realçar que nem sempre isto se verificou, tendo surgido bandas no gel com dimensões inferiores à suposta, mas superiores à do pUC19. Os clones com este resultado foram considerados positivos, embora o seu *insert* não tivesse a dimensão esperada, tendo sido o seu EBE sujeito ao ensaio de actividade enzimática para pesquisa de REase.

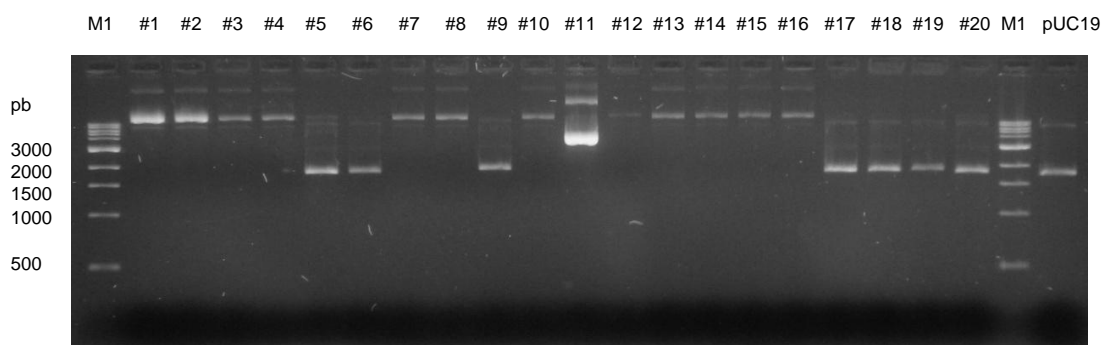


Figura III.3. – Extração de plasmídeos de 20 colónias da construção HpL2 B6C. É possível perceber que um dos plasmídeos não contém o *insert* esperado (poço número 12), mas que ainda assim foi considerado positivo por ter uma dimensão superior à do pUC19. É também observável a presença de vários plasmídeos sem *insert*. O poço número 23 corresponde ao pUC19 diluído de 1 para 10. O marcador de massa molecular usado (M1) foi o de 1kb (NEB).

No rastreio da actividade de restrição de clones das 17 estirpes de *H. pylori* testadas não foi detectada a presença de REases.

III.3. – Pesquisa de enzimas de restrição em clones de *Campylobacter*

III.3.1. – Ensaio de actividade de restrição

A pesquisa de REases em estirpes de *Campylobacter* foi efectuada em conjunto com a Joana Vital pelo que os resultados apresentados são fruto do trabalho de ambos. Esta pesquisa foi realizada através da análise do ensaio de actividade de restrição do EBE (II.11. – Ensaio actividade de restrição do extracto bruto enzimático, páginas 19 e 20) de todos os clones com *insert*. No rastreio da actividade de restrição das estirpes *C. coli* P13, *C. jejuni* P54 (Figura III.4.), *C. jejuni* P116, *C. coli* P307, *C. coli* P452 (Figura III.5.), *C. coli* P646 (Figura III.5.) e *C. jejuni* P 659, detectou-se a presença de REase. Todas as REases foram detectadas em construções com *inserts* amplificados do *locus* 4 (CL4). As estirpes *C. jejuni* P54, *C. coli* P452 e *C. coli* P646 foram testadas por mim. Importa salientar

que só se considerou a presença de REases nos isolados onde se observaram bandas discretas de DNA.

Tabela III.4. – Resultados dos perfis de restrição com HindIII de cada um dos quatro *locus* das estirpes onde foi detectada actividade.

<i>Campylobacter</i> sp.	CL1 (3774pb)	Perfil após digestão com HindIII	CL2 (4485pb)	Perfil após digestão com HindIII	CL3 (3964pb)	Perfil após digestão com HindIII	CL4 (4188pb)	Perfil após digestão com HindIII	Perfil da estirpe
<i>C. coli</i> P 013	-	X	*	C	+	B	+	B	0CBB
<i>C. jejuni</i> P 054	+	B	*	C	+	B	+	F	BCBF
<i>C. jejuni</i> P 116	+	A	*	G	+	D	+	L	AGDL
<i>C. coli</i> P 307	-	X	*	-	+	-	+	D	0_D
<i>C. coli</i> P 452	-	X	-	X	+ -	X	+	J	000J
<i>C. coli</i> P 646	-	X	+	-	-	X	+	K	0_0K
<i>C. jejuni</i> P 659	+	C	+	E	+	A	+	H	CEAH

+ = Produto de PCR com a dimensão esperada.

- = Não houve amplificação.

+ - = Houve amplificação inespecífica.

* = Produto de PCR com uma dimensão diferente da esperada.

0 = Locus vazio.

- = Não foi feito.

X = Não foi determinado o perfil de digestão pois não houve amplificação.

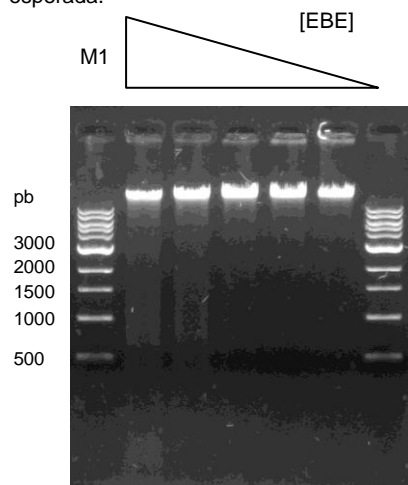


Figura III.4. – Ensaio de actividade de restrição do EBE (série de diluições) do clone #16 da estirpe *C. jejuni* P54 no DNA do fago λ . É possível observar a presença de bandas discretas de DNA o que indica que o *insert* codificava para uma REase activa. O marcador de massa molecular usado (M1) foi o de 1kb (NEB).

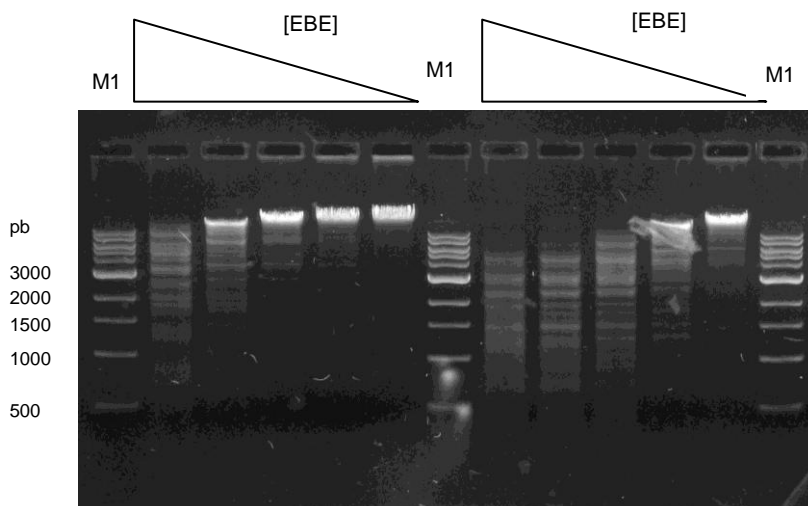


Figura III.5. – Ensaio de actividade de restrição do EBE (série de diluições) do clone #9 da estirpe *C. coli* P452 (à esquerda), e do clone #1 da estirpe *C. coli* P646 (à direita) no DNA do fago λ . É possível observar a presença de bandas discretas de DNA nos 2 clones, o que indica que estes *inserts* codificavam para REases activas. O marcador de massa molecular usado (M1) foi o de 1kb (NEB).

III.3.2. – Purificação da enzima de restrição

Após purificação dos EBEs obtidos a partir da lise das células dos clones das estirpes onde se detectou a presença de REase, foi feito o ensaio da actividade enzimática das fracções da coluna (aplicação, lavagem e fracções ímpares), de acordo com o protocolo II.12. – Purificação da enzima de restrição, páginas 20 a 22, e após aplicação das amostras em gel de agarose a 0,9% procedeu-se à respectiva electroforese (Figura III.6.).

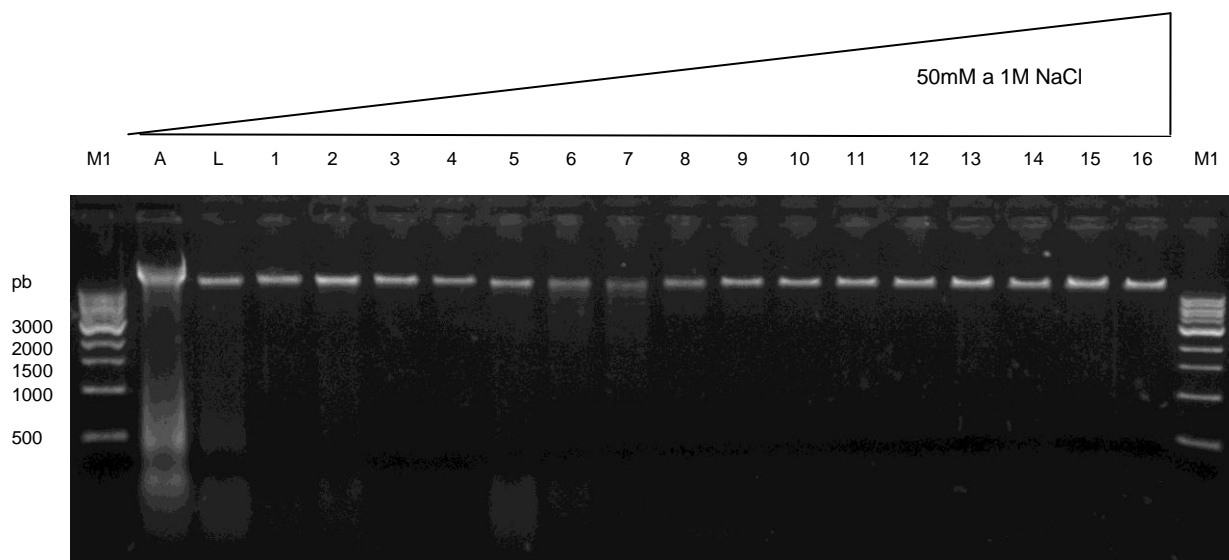


Figura III.6. – Ensaio de actividade enzimática das fracções da coluna, após purificação do EBE do clone #16 da estirpe *C. jejuni* P54, por cromatografia em coluna de baixa pressão. Foram ensaiadas todas as fracções. No primeiro e no último poços foi aplicado o marcador de massa molecular de 1kb (M1) (NEB). A – aplicação, L – lavagem.

Pela observação da figura III.6., verifica-se que neste caso a actividade de restrição surge na fracção número cinco, e estende-se até à fracção número oito, sendo a fracção número sete a que apresenta melhor actividade.

Nos ensaios de actividade enzimática das fracções da coluna, após purificação dos EBEs dos clones #9 da estirpe *C. coli* P452 e #1 da estirpe *C. coli* P646, não foram detectadas quaisquer actividades enzimáticas. Foram repetidos os respectivos ensaios de actividade dos EBEs que vieram confirmar que as REases presentes tinham perdido a actividade.

III.3.3. – Identificação da enzima de restrição expressa

A fracção número sete, a que apresentava melhor actividade aquando do ensaio de actividade enzimática das fracções da coluna, após purificação do EBE do clone #16 da estirpe *C. jejuni* P54 por cromatografia em coluna de baixa pressão, foi utilizada para proceder à determinação da temperatura óptima da REase, bem como do tampão em que a REase é mais activa (II.13. – Optimização das condições de reacção, página 22) (Figura III.7.).

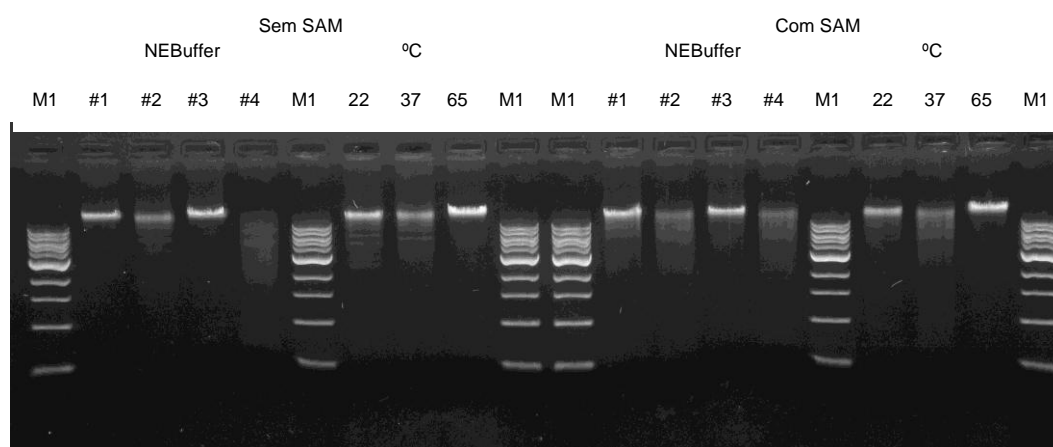


Figura III.7. – Ensaio da fracção número sete com os quatro tampões básicos da NEB, NEBuffer#1, #2, #3 e #4, à temperatura de 37°C, e também com o NEBuffer#2 às temperaturas de 22°C, 37°C e 65°C, na ausência e na presença de SAM, respectivamente. O DNA usado foi o DNA do fago λ desmetilado. O marcador de massa molecular usado foi o de 1kb (M1) (NEB).

A REase exibe melhor actividade no tampão NEBuffer#2, à temperatura de 37°C, sem SAM. Após serem obtidas estas informações procedeu-se à determinação da sequência de reconhecimento, não só através da comparação visual de vários perfis de restrição obtidos pela acção da REase em estudo com perfis gerados por computador das REases já descritas, mas também através do mapeamento em DNAs de menor massa molecular (λ , T7, ϕ X174, pUC19 e pBR322). As REases comerciais escolhidas para o mapeamento do DNA substrato pUC19 foram EcoRI, AlwNI, BsaI e SspI (todas do NEB). As REases comerciais escolhidas para o mapeamento do DNA substrato pBR322 foram EcoRI, AlwNI, PvuII e SphI (todas do NEB). As REases comerciais escolhidas para o mapeamento do DNA substrato ϕ X174 foram PstI, SspI, NciI e StuI (todas do NEB) (Figura III.8.).

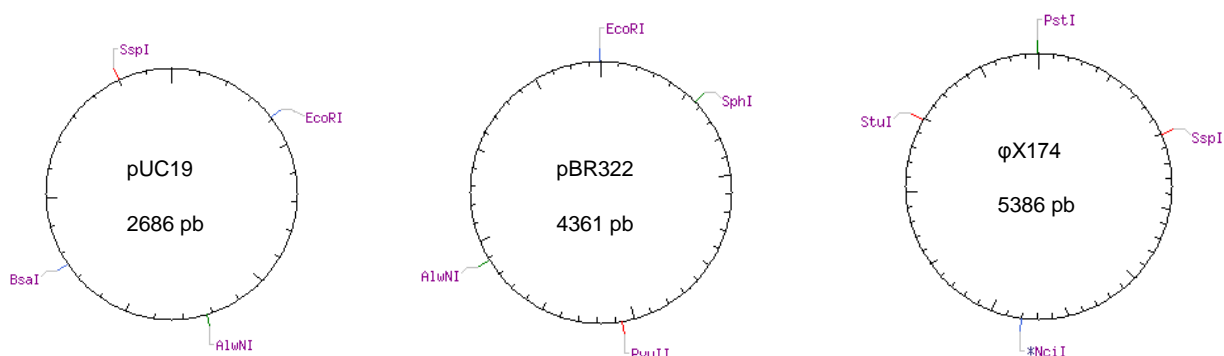


Figura III.8. – Mapas de restrição dos DNAs substratos pUC19 com as REases EcoRI, AlwNI, BsaI, e SspI, pBR322 com as REases EcoRI, AlwNI, PvuII, e SphI, e ϕ X174 com as REases PstI, SspI, NciI e StuI, respectivamente (adaptado de Vincze *et al.*, 2003).

Os mapeamentos dos DNAs substratos λ e T7 foram feitos apenas a partir da digestão com a REase em estudo.

Apesar de o mapeamento ter sido feito, a fotografia tirada após electroforese em gel de agarose a 1,4% não ficou perceptível e como tal foi impossível mapear. Repetiu-se novamente todo o protocolo II.12. – Purificação da enzima de restrição, páginas 20 a 22, mas aquando da análise por electroforese em gel de agarose do ensaio de actividade enzimática das fracções da coluna verificou-se a ausência de fragmentação do DNA. Tal como tinha acontecido com as REases dos clones #9 da estirpe *C. coli* P452 e #1 da estirpe *C. coli* P646, aparentemente a REase presente no EBE do clone #16 da estirpe *C. jejuni* P54 também perdeu a actividade (Tabela III.5.).

Tabela III.5. – Resultados finais obtidos nas estirpes onde foi detectada actividade.

Estirpe	Perfil da estirpe	Locus onde foi detectada a presença de Rease	Sequência de reconhecimento da REase encontrada	REase	Protótipo	Subtipo segundo a REBASE
<i>C. coli</i> P 013	0CBB	CL4	5' CAYNNNNNRTG 3'	CcoP13III	Cjul	IIG
<i>C. jejuni</i> P 054	BCBF	CL4	Não determinada	CjeP54* ¹³	-	-
<i>C. jejuni</i> P 116	AGDL	CL4	Não determinada	CjePII	-	-
<i>C. coli</i> P 307	0_D	CL4	Não determinada	CcoP307I	-	-
<i>C. coli</i> P 452	000J	CL4	Não determinada	CcoP452* ¹³	-	-
<i>C. coli</i> P 646	0_0K	CL4	Não determinada	CcoP646* ¹³	-	-
<i>C. jejuni</i> P 659	CEAH	CL4	5' CACNNNNNNGAA 3'	CjeP659IV	CjeP659IV	IIG

*¹³ – Actividade perdida.

III.4. – Ensaio com recurso a um coquetel de bacteriófagos

Apesar de nas construções HpL1 B1A e HpL2 B1A se ter verificado o aparecimento de colónias resistentes ao coquetel de bacteriófagos, após o ensaio actividade de restrição do EBE em nenhuma delas foi detectada actividade.

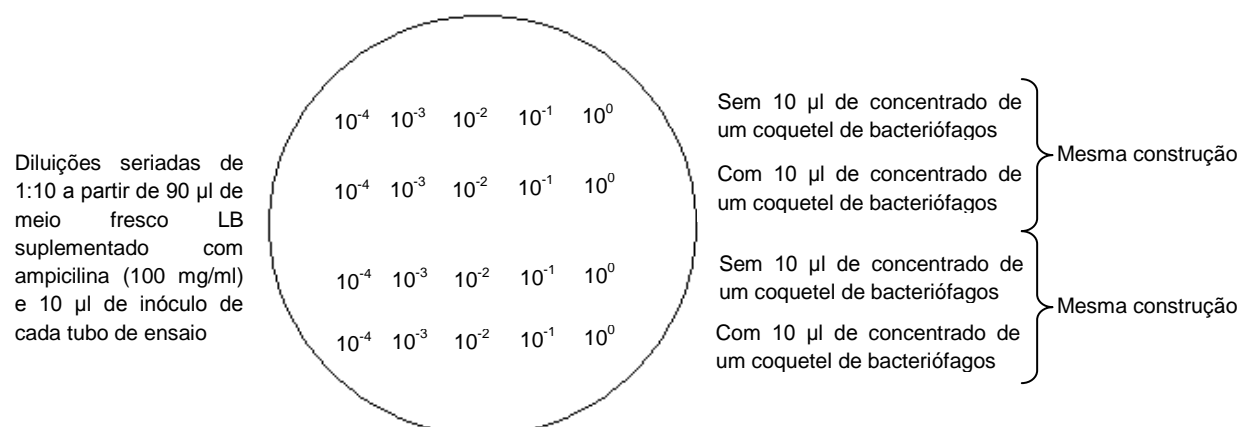


Figura III.9. – Esquema ilustrativo da determinação das UFC, através do recurso a diluições seriadas de 1:10 a partir de 90 µl de meio fresco LB suplementado com ampicilina (100 mg/ml) e 10 µl de inóculo de cada tubo de ensaio, de 2 construções de cada locus de *Helicobacter*, sem e com 10µl de concentrado de um coquetel de bacteriófagos (de cima para baixo, respectivamente).

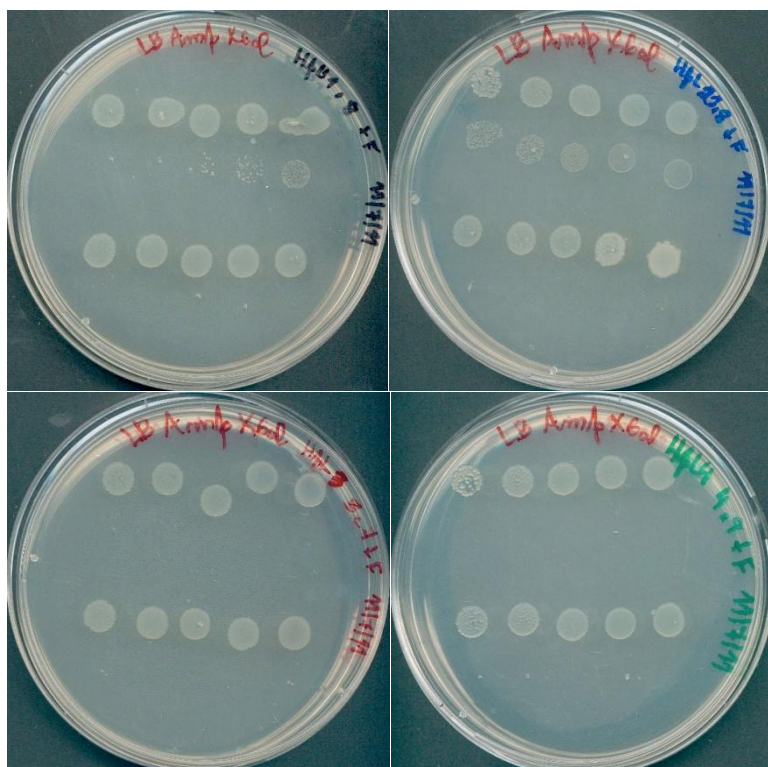


Figura III.10. – Determinação das UFC de 2 construções de cada *locus* de *Helicobacter*. Em cada caixa de Petri foram testadas 2 construções de cada *locus*, sem e com 10µl de concentrado de um coquetel de bacteriófagos (de cima para baixo, respectivamente). É possível observar nas construções HpL1 B1A e HpL2 B1A o aparecimento de colónias resistentes ao coquetel de bacteriófagos.

Foi detectada actividade no EBE da construção HpL2 B6C (Passo 8 do protocolo II.15. – Ensaio com recurso a um coquetel de bacteriófagos, páginas 23 e 24), mas após extracção de plasmídeos foi possível verificar que os plasmídeos não continham o *insert* de interesse, tratando-se muito provavelmente de um contaminante com actividade. Tentou-se o isolamento em caixa do contaminante, o que não foi possível. Através da comparação do padrão de bandas obtido com os perfis de restrição gerados no computador foi possível descobrir que REase descoberta se tratava de um isosquisómero da REase Nspl (dados não apresentados).

IV. – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Para verificar a hipótese que serviu de base a esta dissertação, a existência de *loci* ubiquitários que codificassem para REases do tipo IIG no genoma de *Campylobacteriales*, recorreu-se à técnica de PCR para amplificar os locais alvo do genoma de algumas estirpes de uma espécie do gênero *Helicobacter* e de duas do gênero *Campylobacter*. Na REBASE existe unicamente informação de múltiplos genomas em três espécies da ordem *Campylobacteriales*: *H. pylori*, com trinta e um genomas, *C. jejuni* com nove, e *Arcobacter butzleri* só com dois. Assim, a análise genômica comparativa só pôde ser realizada nos gêneros *Helicobacter* e *Campylobacter*. No total foram testadas dezassete estirpes de *H. pylori* e cento e sessenta e nove estirpes de *Campylobacter*, oitenta e quatro estirpes de *C. jejuni* e oitenta e cinco estirpes de *C. coli*.

Através da análise dos resultados obtidos por PCR para as estirpes da espécie *H. pylori* foi possível observar a ocorrência de amplificação em qualquer um dos quatro *loci* testados. Nestes, o *locus* HpL3 foi aquele onde se observou uma maior percentagem de produtos de PCR com a dimensão esperada, 82,36%. Nos *loci* HpL2 e HpL3 ocorreu amplificação em todas as estirpes testadas. O *locus* HpL2 foi aquele onde se observou a maior percentagem de amplificações específicas e o *locus* HpL1 foi aquele onde foi observada uma maior ausência de amplificação. Apenas nos *loci* HpL3 e HpL4 se obtiveram produtos de PCR com uma dimensão diferente da esperada. No *locus* HpL3 observou-se um maior número de perfis de digestão diferentes. A ocorrência de amplificação em qualquer um dos quatro *loci* testados foi também observada em relação às estirpes das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, o que veio comprovar a hipótese de que os *loci* testados eram ubiquitários entre estas espécies. Nestes, os *loci* HpL3 e HpL4 foram aqueles onde se observou uma maior percentagem de produtos de PCR com a dimensão esperada, 67,45% e 72,19%, respectivamente. O *locus* HpL1 foi aquele onde foi observada uma maior ausência de amplificação, 64,50%.

Em ambos os gêneros esses resultados mostraram que nalguns casos foram obtidos fragmentos com uma dimensão superior à esperada, e noutros foi até verificada a ocorrência de amplificação inespecífica, surgindo no gel mais que uma banda. Estes resultados pareceram indicar não só a existência de populações heterogêneas de microrganismos, o que a verificar-se seria uma prova de que o estômago pode ser colonizado por várias estirpes de *H. pylori* em simultâneo, como também comprovar os resultados obtidos por alguns autores que mostram que a ocorrência de movimentos de sequências de aminoácidos específicas de um domínio, em posições específicas, para um outro domínio numa outra posição dentro da mesma proteína se possa dever à existência de fenómenos de recombinação genética (Furuta *et al.*, 2010; Furuta *et al.*, 2011a; Furuta *et al.*, 2011b; Furuta *et al.*, 2011c). Ainda assim foi possível, nalgumas estirpes, isolar a banda pretendida a partir do gel e após novo PCR conseguiu-se que surgisse apenas uma única banda, tendo as bandas com dimensões diferentes da esperada desaparecido. Todas as estirpes com este resultado, bem como as estirpes onde se obteve uma banda com uma dimensão superior ao esperado, foram consideradas positivas e foram testadas.

Os produtos de PCR obtidos nos oito *loci* testados (quatro em estirpes pertencentes ao género *Helicobacter* e quatro em estirpes pertencentes ao género *Campylobacter*) cujo perfil de restrição foi diferente foram clonados (pelo menos um *insert* de cada perfil de restrição diferente) em *E. coli*, e verificaram-se quais deles codificavam para uma enzima de restrição activa. Esta avaliação foi feita através de um método bioquímico que se baseou na observação da acção de EBE em DNAs conhecidos (Shildkraut, 1984). A série de diluições do EBE permitiu, tal como seria de esperar, reduzir a interferência de RNA ou nucleases nos ensaios que poderiam mascarar a actividade de uma potencial REase que estivesse presente no EBE. Ainda assim a observação de RNA nos ensaios foi verificada, o que assegurou que a lise das células bacterianas por sonicação foi sempre bem conseguida, garantindo deste modo que a não observação de actividade enzimática aquando do ensaio de actividade de restrição do EBE se devia efectivamente à ausência de REase activa e não à existência de uma lise deficiente. Uma outra razão que poderia levar ao aparecimento de possíveis falsos negativos seria a ausência da sequência de reconhecimento no DNA indicador escolhido, mas esta hipótese pareceu muito pouco provável pelo facto de o DNA indicador escolhido ter sido o DNA do fago λ desmetilado, cujo genoma tem uma dimensão bastante razoável (quarenta e oito mil quinhentos e dois pb) quando comparado com os genomas de outros DNAs frequentemente usados, pUC19 (dois mil seiscentos e oitenta e seis pb), pBR322 (quatro mil trezentos e sessenta e um pb) e ϕ X174 (cinco mil trezentos e oitenta e seis pb).

Detectou-se a presença de actividade enzimática em clones de sete construções (três de estirpes de *C. jejuni* e quatro de estirpes de *C. coli*) a partir de *inserts* amplificados do *locus* 4 (CL4), nomeadamente, *C. coli* P13, *C. jejuni* P54, *C. jejuni* P116, *C. coli* P307, *C. coli* P452, *C. coli* P646 e *C. jejuni* P 659.

Começando pela análise dos resultados obtidos pela Joana Vital foi possível concluir que a REase presente no EBE de um clone da estirpe *C.coli* P 013 reconhecia a sequência 5'...CAYNNNNNRTG...3', protótipo Cju. Esta REase foi designada por CcoP13III e tratava-se de um isosquisómero da Cjul (Tabela III.5, página 32). Pelo facto de ainda não ser conhecido o seu local de corte não foi possível afirmar se se tratava ou não de um neoisosquisómero. Em relação à REase de um clone da estirpe *C. jejuni* P 659 foi possível concluir que esta REase reconhecia a sequência 5'...CACNNNNNNNGAA...3', protótipo CjeP659IV. Esta enzima foi designada por CjeP659IV e tratava-se de um protótipo pois foi a primeira REase descoberta que reconhecia esta sequência (Tabela III.5., página 32). No que diz respeito às REases presentes no EBE de clones das estirpes *C. jejuni* P116 e *C. coli* P307, não foi possível tirar conclusões acerca da sua sequência de reconhecimento pois verificou-se através da análise do gel do mapeamento que a digestão dupla tinha sido incompleta e como tal seria impossível mapear. Os mapeamentos destas estirpes irão futuramente ser repetidos para que se possa determinar as sequências de reconhecimento destas REases e confirmar se se tratam ou não de sequências de reconhecimento novas e por conseguinte de REases protótipos, ou isosquisómeros ou neoisosquisómeros de alguma REase já conhecida. As dimensões dos fragmentos clonados apontam para que sejam sistemas do tipo IIG.

A análise dos resultados por mim obtidos revelou que num dos clones ensaiados da estirpe *C. jejuni* P54, o clone #16, obtido da construção com o produto de PCR amplificado a partir do *locus* 4

(CL4), foi detectada a presença de actividade enzimática. Após se ter efectuado a purificação do EBE foi feito o ensaio da actividade enzimática das fracções da coluna de acordo com o protocolo II.12. – Purificação da enzima de restrição, páginas 20 a 22, e após aplicação das amostras em gel de agarose a 0,9% procedeu-se à respectiva electroforese. A análise do gel permitiu saber que a REase tinha sido eluída nas fracções números cinco, seis, sete e oito (Figura III.6., página 30). Desta purificação apenas resultaram dezoito fracções (fracções correspondentes à aplicação e à lavagem, mais dezasseis fracções), ao contrário das trinta e cinco fracções que normalmente são recolhidas para o volume de EBE testado (aproximadamente 10 ml). Foi depois feito o ensaio dos tampões e da temperatura com a fracção sete, aquela que apresentou melhor actividade, o que revelou que esta REase apresentava melhor actividade na presença de NEBuffer#2 e à temperatura de 37°C. Essa mesma fracção, bem como o concentrado das fracções seis e sete foram depois utilizados para proceder ao mapeamento e determinação da sequência de reconhecimento, usando as REases e os substratos descritos na secção III.3.3. – Identificação da enzima de restrição expressa, páginas 30 a 33. Após ter sido tirada a fotografia ao gel do mapeamento foi possível concluir que esta não era perceptível e que como tal seria impossível mapear. Repetiu-se novamente todo o protocolo mas aquando da análise por electroforese em gel de agarose do ensaio de actividade enzimática das fracções da coluna verificou-se a ausência de fragmentação do DNA. Levantaram-se então três hipóteses distintas: ou a REase do clone tinha perdido actividade, ou a REase não tinha sido eluída e tinha ficado agarrada à matriz da coluna, ou a lise das bactérias por sonicação não tinha sido completa, visto que no gel também não foi nitidamente observável a presença de RNA. Para desfazer a dúvida foi feito um novo ensaio de actividade de restrição do EBE do clone e verificou-se que a primeira hipótese era a verdadeira, ou seja, o clone tinha de facto perdido a actividade. Para além destas estirpes, detectou-se também a presença de actividade enzimática no clone #9 da estirpe *C. coli* P452 e no clone #1 da estirpe *C. coli* P646. Após terem sido efectuadas as purificações dos EBEs foram feitos os ensaios de actividade enzimática das fracções da coluna de acordo com o protocolo II.12. – Purificação da enzima de restrição, páginas 20 a 22, e após aplicação das amostras em gel de agarose a 0,9% procedeu-se à respectiva electroforese. A análise dos géis permitiu descobrir que não existia fragmentação do DNA indicador e por isso também estes clones tinham perdido a actividade. Para desfazer a dúvida foi também feito um novo ensaio de actividade de restrição do EBE dos clones e verificou-se que ambos os clones tinham de facto perdido a actividade.

Os resultados obtidos para o género *Campylobacter*, sete REases clonadas com actividade em cento e sessenta e nove estirpes testadas podem ser explicados pela dificuldade já observada por alguns autores em expressar genes de sistemas RM em *E. coli*, pois os produtos destes genes são tóxicos. Seja qual for a justificação a taxa de sucesso é muito reduzida (4,1%). O que está descrito é que surgem problemas ao introduzir estes genes num novo hospedeiro se o DNA não está suficientemente metilado pela MTase e a REase for expressa imediatamente (Lin *et al.*, 2001). Os resultados obtidos corroboraram esta teoria pois em várias construções efectuadas não se verificou o aparecimento de clones em caixa. Uma solução a adoptar para este problema poderá ser a clonagem dos produtos de PCR numa estirpe do género *Campylobacter*, ao invés de em *E. coli*, recorrendo ao uso de vectores próprios dessas mesmas estirpes.

Foi também curioso observar que todas as REases clonadas com actividade foram codificadas por *inserts* obtidos a partir da amplificação do *locus* 4 (CL4). Contêm os outros *loci* enzimas activos ou outros genes que não sistemas RM? Só a sequenciação dos clones obtidos poderá esclarecer esta questão. Ao que parece nalgumas estirpes o *locus* CL4 não sofreu qualquer alteração, continuando a codificar para uma REase activa, enquanto que a maioria dos genes dos restantes *loci*, 1 (CL1), 2 (CL2) e 3 (CL3) parece ter sido afectada por fenómenos de recombinação genética (Furuta *et al.*, 2010; Furuta *et al.*, 2011a; Furuta *et al.*, 2011b; Furuta *et al.*, 2011c). Não se conhece uma explicação para a perda de actividade enzimática observada em alguns clones de *Campylobacter*. É no entanto um fenómeno frequente em outros laboratórios (Richard Morgan, comunicação pessoal).

Os resultados obtidos para o género *Helicobacter*, sem REases clonadas com actividade, podem ser explicados pelos mesmos motivos que serviram de justificação para alguns dos resultados obtidos para o género *Campylobacter*. Isto é, a toxicidade dos produtos dos genes clonados para a *E. coli* (Lin *et al.*, 2001), ou a presença de um mecanismo de regulação por escorregamento da polimerase por parte da própria célula (Roberts *et al.*, 2010). Se a taxa de sucesso for semelhante à obtida com *Campylobacter*, a percentagem de clones com actividade em dezassete estirpes será 0,6%, o que está de acordo com os resultados obtidos. Interessante é também a observação que a variabilidade de perfis de restrição encontrada em *H. pylori*, vinte possíveis enzimas diferentes em dezassete estirpes, contrasta com as vinte e nove possíveis em cento e sessenta e nove estirpes diferentes de *Campylobacter*, confirmando assim a elevada variabilidade genética encontrada em *H. pylori*.

Os resultados obtidos referentes às digestões dos produtos de PCR dos *loci* de *Helicobacter* com a REase HindIII permitiram chegar a algumas observações interessantes. Foi possível observar que nos oito pares de estirpes isoladas de amostras recolhidas do antro pilórico e do corpo do estômago de diferentes doentes, em apenas três pares se observou um perfil idêntico entre si em relação ao quatro *loci* testados, o que mostra que muito possivelmente a estirpe que coloniza o antro pilórico é a mesma que coloniza o corpo. Nos restantes cinco pares de estirpes isoladas do mesmo doente mas de uma localização diferente no estômago, foi possível observar que os perfis de restrição eram diferentes entre si, o que indica a existência de populações heterogéneas de microrganismos. A variabilidade é também uma questão importante, já que foi verificado que não existem estirpes isoladas de diferentes pacientes com o mesmo perfil de restrição.

A localização dos sistemas RM do tipo IIG em *loci* foi também verificada para outros sistemas RM (dados não apresentados). Assim sendo, a pesquisa *in silico* de novos sistemas RM será uma metodologia que irá alargar o número de especificidades já existente.

V. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alm *et al.*, (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397, 719-723.
- Ando *et al.*, (2010). Restriction-modification systems may be associated with *Helicobacter pylori* virulence. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25, S95-S98.
- Chan, S-H., Stoddard, B., Xu, S-y. (2011). Natural and engineered nicking endonucleases-from cleavage mechanism to engineering of strand specificity. *Nucleic Acids Research* 39, 1-18.
- Demerec, M., Adelberg, E., Clark, A., Hartman, P. (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54, 61-76.
- Donahue, J., and Peek, R. (2001). Restriction and Modification Systems. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Mobley, H., Mendz, G. and Hazell, S. (eds). Washington DC, ASM Press. pp. 269-276.
- Furuta, Y., Abe, K., Kobayashi, I. (2010). Genome comparison and context analysis reveals putative forms of restriction-modification systems and related rearrangements. *Nucleic Acids Research* 38, 2428-2443.
- Furuta *et al.*, (2011a). Birth and death of genes linked to chromosomal inversion. *PNAS* 108, 1501-1506.
- Furuta, Y., Yahara, K., Hatakeyama, M., Kobayashi, I. (2011b). Evolution of *cagA* oncogene of *Helicobacter pylori* through recombination. *PLoS ONE* 6(8), 1-11.
- Furuta, Y., Kawai, M., Uchiyama, I., Kobayashi, I. (2011c). Domain movement within a gene: a novel evolutionary mechanism for protein diversification. *Plos One* 6, 1-9.
- Gingeras, T., Milazzo, J., Roberts, R. (1978). A computer assisted method for the determination of restriction enzyme recognition sites. *Nucleic Acids Research* 5, 4105-4127.
- Jeltsch, A. (2003). Maintenance of species identity and controlling speciation of bacteria: a new function for restriction/modification systems? *Gene* 317, 13-16.
- Karamov, E., Naroditskiĭ, B., Zavizion, B., Tikhonenko, T. (1977). Transformation of substrate specificity of EcoRI restrictase by glycerol. *Biull Eksp Biol Med* 84, 46-48.
- Karcher, S. (1995). Recombinant DNA cloning. In *Molecular Biology: A project approach*. Academic Press, Inc. United States of America. pp. 73-76.
- Kobayashi, I. (2001). Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Research* 29, 3742-3756.
- Kong, H., Lin, L., Porter, N., Stickel, S., Byrd, D., Posfai, J., Roberts, R. (2000). Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acids Research* 28, 3216-3223.
- Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Mi, S., Posfai, J., Roberts, R., Wilson, G. (1994). The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Research* 22, 1-10.
- Kusano, K., Naito, T., Handa, N., Kobayashi, I. (1995). Restriction-modification systems as genomic parasites in competition for species sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11095-11099.
- Labrie, S., Samson, J., Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology* 8, 317-327.
- Lin, L., Posfai, J., Roberts, R., Kong, H. (2001). Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2740-2745.
- Lunnen *et al.*, (1988). Cloning type II restriction and modification genes. *Gene* 74, 25-32.
- Morgan, R., and Luyten, Y. (2009). Rational engineering of type II restriction endonuclease DNA binding and cleavage specificity. *Nucleic Acids Research* 37, 5222-5233.
- Naito, T., Kusano, K., Kobayashi, I. (1995). Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* 267, 897-899.
- Pingoud, A., and Jeltsch, A. (1997). Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *European Journal of Biochemistry* 246, 1-22.
- Pingoud, A., and Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research* 29, 3705-3727.
- Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., Wende, W. (2005). Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 685-707.

- Rimseliene, R., Maneliene, Z., Lubys, A., Janulaitis, A. (2003). Engineering of restriction endonucleases: Using methylation activity of the bifunctional endonuclease Eco571 to select the mutant with a novel sequence specificity. *Journal of Molecular Biology* 327, 383-391.
- Roberts, R. J. (1976). Restriction endonucleases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 4, 123-164.
- Roberts *et al.*, (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* 31, 1805-1812.
- Roberts, R., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. (2010). REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 38, D234-D236.
- Schmid, E., Vonrecklinghausen, G., Ansorg, R. (1990). Bacteriophages in *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. *J Med Microbiol* 32, 101-104.
- Shildkraut, I. (1984). Screening for and characterizing restriction endonucleases. *In Genetic Engineering, Principals and Methods*. Vol 6. Setlow, J. and Hollaender, A. (eds). New York, Plenum Press. pp. 117-140.
- Simon, J., Gross, R., Klimmer, O., Kröger, A. (2006). The Genus *Wolinella*. *In The Prokaryotes*. Third Edition. Volume 7. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (eds). Singapore, Springer. pp.178-194.
- Sistla, S., and Rao, D. (2004). S-adenosyl-L-methionine-dependent restriction enzyme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39, 1-19.
- Skoglund, A., Bjoorkholm, B., Nilsson, C., Andersson, A., Jernberg, C., Schirwitz, K., Enroth, C., Krabbe, M., Engstrand, L. (2007). Functional analysis of the M.HpyAIV DNA methyltransferase oh *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* 189, 8914-8921.
- Smith, H., and Nathans, D. (1973). A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *Journal of Molecular Biology* 81, 419-423.
- Solnick, J., O'Rourke, J., Van Damme, P., Lee, A. (2006). The Genus *Helicobacter*. *In The Prokaryotes*. Third Edition. Volume 7. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (eds). Singapore, Springer. pp.139-177.
- Szybalski, W. (1985). Universal restriction endonucleases: designing novel cleavage specificities by combing adapter oligodeoxynucleotide and enzyme moieties. *Gene* 40, 169-173.
- Szybalski, W., Blumenthal, R., Brooks, J., Hattman, S., Raleigh, E. (1988). Nomenclature for bacterial genes coding for class-II restriction endonucleases and modification methyltransferases. *Gene* 74, 279-280.
- Tomb *et al.*, (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539-547.
- Vale, A. F. F. (2002). Tipagem de estirpes de *Helicobacter pylori*: os sistemas de restrição e modificação. Lisboa. Tese de Mestrado.
- Vale, F., and Vítor, J. (2007). Genomic methylation: a tool for typing *Helicobacter pylori* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4243-4249.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31, 3688-3691.
- Vítor, J. M. B. (1999). Sistemas de restrição e modificação em *Campylobacter jejuni* e *C. coli*. Lisboa. Tese de Doutoramento.
- Von Heinegg, E., Nalik, H., Schmid, E. (1993). Characterization of a *Helicobacter pylori* phage (HP1). *J Med Microbiol* 38, 245-249.
- Wassenaar, T., and Newell, D. (2006). The Genus *Campylobacter*. *In The Prokaryotes*. Third Edition. Volume 7. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (eds). Singapore, Springer. pp.119-138.
- Xu, Q., Morgan, R., Roberts, R., Blaser, M. (2000). Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9671-9676.
- Yuan, R. (1981). Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annu Rev Biochem* 50, 285-315.
- Zheng, Y., Posfai, J., Morgan, R., Vincze, T., Roberts, R. (2009). Using shotgun sequence data to find active restriction enzyme genes. *Nucleic Acids Research* 37, 1-11.

VI. – ANEXOS

Tabela VI.1. – Resultados dos perfis de restrição com HindIII das estirpes de *Campylobacter* testadas.

<i>Campylobacter</i> sp.* ¹⁴	CL1 (3774pb)	Perfil após digestão com HindIII	CL2 (4485pb)	Perfil após digestão com HindIII	CL3 (3964pb)	Perfil após digestão com HindIII	CL4 (4188pb)	Perfil após digestão com HindIII	Perfil da estirpe
<i>C. jejuni</i> P 007	+	–	+	A	+	A	*	A	_AAA
<i>C. jejuni</i> P 010	-	X	*	D	+	B	+	B	0DBB
<i>C. coli</i> P 011	-	X	*	B	+ -	X	+	C	0B0C
<i>C. coli</i> P 013	-	X	*	C	+	B	+	B	0CBB
<i>C. jejuni</i> P 014	-	X	+	–	+	B	+ -	X	0_B0
<i>C. coli</i> P 015	+ -	X	*	B	-	X	+	B	0B0B
<i>C. coli</i> P 016	-	X	*	B	-	X	+	D	0B0D
<i>C. jejuni</i> P 021	-	X	*	G	+	–	-	X	0G_0
<i>C. jejuni</i> P 023	-	X	*	C	+	B	+	B	0CBB
<i>C. jejuni</i> P 024	-	X	*	C	+	B	+	E	0CBE
<i>C. coli</i> P 025	-	X	*	C	+	B	+	D	0CBD
<i>C. coli</i> P 026	-	X	*	B	-	X	+	D	0B0D
<i>C. coli</i> P 031	+ -	X	*	B	-	X	+	D	0B0D
<i>C. jejuni</i> P 035	-	X	+	A	+	A	*	A	0AAA
<i>C. jejuni</i> P 037	-	X	+	A	+	A	+	E	0AAE
<i>C. jejuni</i> P 043	+	–	*	C	+	B	+	F	_CBF
<i>C. jejuni</i> P 044	+	–	*	C	+	B	+	F	_CBF
<i>C. jejuni</i> P 049	-	X	*	C	+	B	+	F	0CBF
<i>C. jejuni</i> P 051	-	X	*	C	+	B	+	–	0CB_
<i>C. jejuni</i> P 052	-	X	*	G	+	A	+	C	0GAC
<i>C. jejuni</i> P 053	-	X	+	–	+	A	+	E	0_AE
<i>C. jejuni</i> P 054	+	B	*	C	+	B	+	F	BCBF
<i>C. jejuni</i> P 055	+	B	*	D	+	B	+	B	BDBB
<i>C. jejuni</i> P 062	-	X	+	–	+	A	*	A	0_AA
<i>C. jejuni</i> P 063	-	X	*	G	+	B	+	C	0GBC
<i>C. jejuni</i> P 064	+ -	X	+	E	+	A	*	A	0EAA
<i>C. jejuni</i> P 065	+	–	+	A	+	A	+	C	_AAC
<i>C. coli</i> P 073	+ -	X	-	X	+	–	+	F	00_F
<i>C. jejuni</i> P 074	+	D	*	C	+	B	+	E	DCBE
<i>C. coli</i> P 078	+	D	*	–	+	B	+	D	D_BD
<i>C. coli</i> P 080	-	X	+	E	+	A	*	A	0EAA
<i>C. coli</i> P 084	+ -	X	*	–	+	–	+	E	0_E
<i>C. coli</i> P 085	+ -	X	*	–	+ -	X	+	D	0_0D
<i>C. coli</i> P 090	+ -	X	*	–	+	–	+	–	0_
<i>C. coli</i> P 092	+	X	*	–	+	–	+	D	0_D
<i>C. coli</i> P 096	-	X	*	–	-	X	+	F	0_OF
<i>C. jejuni</i> P 109	-	X	+	–	+	A	*	A	0_AA
<i>C. jejuni</i> P 116	+	A	*	G	+	D	+	L	AGDL

Capítulo VI – Anexos

<i>C. jejuni</i> P 129	-	X	*	D	+	B	+	B	0DBB
<i>C. jejuni</i> P 131	-	X	*	-	+	A	+	E	0_AE
<i>C. jejuni</i> P 132	-	X	+	-	+	A	*	A	0_AA
<i>C. jejuni</i> P 133	+	-	+	A	+	A	*	A	_AAA
<i>C. jejuni</i> P 134	+ -	X	*	E	+	B	+	B	0EBB
<i>C. jejuni</i> P 148	-	X	*	-	-	X	-	X	0_00
<i>C. jejuni</i> P 149	+	-	*	-	+	-	-	X	__0
<i>C. jejuni</i> P 152	-	X	*	-	+	-	-	X	0_0
<i>C. jejuni</i> P 153	-	X	*	-	-	X	+	-	0_0_
<i>C. jejuni</i> P 156	-	X	-	X	-	X	+	-	000_
<i>C. jejuni</i> P 157	-	X	*	-	-	X	-	X	0_00
<i>C. jejuni</i> P 160	-	X	*	-	-	X	-	X	0_00
<i>C. jejuni</i> P 161	-	X	*	-	+	-	-	X	0_0
<i>C. coli</i> P 162	-	X	-	X	-	X	+	-	000_
<i>C. coli</i> P 164	-	X	-	X	-	X	+	-	000_
<i>C. coli</i> P 165	-	X	-	X	-	X	-	X	0000
<i>C. coli</i> P 170	-	X	-	X	-	X	+	-	000_
<i>C. coli</i> P 174	-	X	-	X	-	X	-	X	0000
<i>C. coli</i> P 175	-	X	-	X	-	X	-	X	0000
<i>C. jejuni</i> P 178	-	X	*	-	+	-	*	-	0__
<i>C. jejuni</i> P 179	+	-	+	-	+	-	*	-	___
<i>C. jejuni</i> P 180	-	X	*	-	+	-	+	-	0__
<i>C. jejuni</i> P 184	-	X	+	-	+	-	+	-	0__
<i>C. coli</i> P 185	-	X	-	X	-	X	+	-	000_
<i>C. jejuni</i> P 197	-	X	+	-	+	-	-	X	0_0
<i>C. coli</i> P 198	+	-	*	-	+	-	*	-	___
<i>C. coli</i> P 199	-	X	*	-	-	X	-	X	0_00
<i>C. coli</i> P 201	-	X	-	X	-	X	-	X	0000
<i>C. coli</i> P 203	-	X	-	X	-	X	-	X	0000
<i>C. jejuni</i> P 205	-	X	*	C	-	X	+	E	0C0E
<i>C. jejuni</i> P 207	+	-	*	-	+	-	-	X	__0
<i>C. coli</i> P 208	-	X	*	-	-	X	-	X	0_00
<i>C. jejuni</i> P 209	-	X	+	E	+	A	*	A	0EAA
<i>C. jejuni</i> P 210	-	X	+	-	+	B	-	X	0_B0
<i>C. jejuni</i> P 211	-	X	+	-	+	B	+	-	0_B_
<i>C. jejuni</i> P 212	+	A	+	E	+	C	+	C	AECC
<i>C. jejuni</i> P 214	-	X	*	B	+	A	+	F	0BAF
<i>C. coli</i> P 215	+ -	X	*	-	+	D	+	D	0_DD
<i>C. jejuni</i> P 217	-	X	*	-	+	B	+	B	0_BB
<i>C. jejuni</i> P 220	-	X	*	-	+	B	+	E	0_BE
<i>C. coli</i> P 222	-	X	*	-	+	B	+	G	0_BG
<i>C. coli</i> P 229	-	X	*	-	+ -	X	+	G	0_0G
<i>C. jejuni</i> P 230	+	B	*	-	+	B	+	E	B_BE
<i>C. coli</i> P 231	-	X	*	-	-	X	+	D	0_0D
<i>C. coli</i> P 235	+	-	+	A	+	A	*	A	_AAA
<i>C. coli</i> P 240	+	-	*	-	+	A	+	-	_A_
<i>C. coli</i> P 242	+	-	*	-	+	-	+	D	__D
<i>C. coli</i> P 243	-	X	*	-	+	-	+	-	0__

Capítulo VI – Anexos

<i>C. coli</i> P 245	+	-	*	-	+	D	+	E	__DE
<i>C. coli</i> P 246	-	X	*	-	-	X	+	D	0_0D
<i>C. coli</i> P 247	-	X	*	-	+ -	X	+	-	0_0_
<i>C. coli</i> P 248	+	-	*	-	+ -	X	+	-	__0_
<i>C. coli</i> P 249	-	X	*	-	-	X	+	D	0_0D
<i>C. coli</i> P 251	+	-	*	-	+ -	X	+	D	__0D
<i>C. coli</i> P 253	-	X	+	A	+	A	+	E	0AAE
<i>C. coli</i> P 255	-	X	*	-	+	-	+	D	0__D
<i>C. coli</i> P 256	-	X	*	-	+ -	X	+	-	0_0_
<i>C. coli</i> P 257	-	X	-	X	-	X	+	-	000_
<i>C. coli</i> P 258	-	X	*	-	+	-	+	-	0__
<i>C. coli</i> P 260	+ -	X	-	X	+	-	+	-	00__
<i>C. coli</i> P 261	+ -	X	*	-	+	-	+	-	0__
<i>C. coli</i> P 262	+ -	X	*	-	+	-	+	-	0__
<i>C. coli</i> P 264	+ -	X	*	-	+	-	+	-	0__
<i>C. coli</i> P 266	+ -	X	*	-	+	-	+	D	0__D
<i>C. coli</i> P 267	+ -	X	*	-	+	-	+	-	0__
<i>C. coli</i> P 268	+ -	X	-	X	+	-	+	-	00__
<i>C. coli</i> P 269	+ -	X	-	X	+	-	+	F	00_F
<i>C. coli</i> P 270	+ -	X	*	-	+	-	+	J	0__J
<i>C. coli</i> P 271	+ -	X	+	-	+	-	+	-	0__
<i>C. coli</i> P 272	+ -	X	*	-	+	-	+	-	0__
<i>C. coli</i> P 275	-	X	-	X	-	X	-	X	0000
<i>C. coli</i> P 276	-	X	-	X	-	X	-	X	0000
<i>C. jejuni</i> P 278	-	X	-	X	-	X	+	-	000_
<i>C. jejuni</i> P 282	-	X	*	-	+	-	-	X	0_0
<i>C. coli</i> P 284	+ -	X	*	-	+	-	+	C	0__C
<i>C. coli</i> P 287	+	-	*	-	+	-	+	E	__E
<i>C. coli</i> P 291	-	X	-	X	+	-	+	F	00_F
<i>C. coli</i> P 293	-	X	*	-	+	A	+	F	0_AF
<i>C. coli</i> P 294	-	X	*	-	+	A	+	J	0_AJ
<i>C. coli</i> P 295	-	X	*	B	+	A	+	D	0BAD
<i>C. jejuni</i> P 297	-	X	+	-	+	-	-	X	0_0
<i>C. coli</i> P 307	-	X	*	-	+	-	+	D	0__D
<i>C. coli</i> P 309	+	C	*	-	+	-	+	G	C__G
<i>C. coli</i> P 378	-	X	*	-	+	-	+	D	0__D
<i>C. coli</i> P 379	-	X	*	-	+	-	+	D	0__D
<i>C. jejuni</i> P 384	+	C	+	E	+	A	*	A	CEAA
<i>C. jejuni</i> P 391	+	A	*	C	+	B	*	A	ACBA
<i>C. coli</i> P 395	-	X	*	-	+	-	+	D	0__D
<i>C. coli</i> P 416	+	A	-	X	+	B	+	E	A0BE
<i>C. jejuni</i> P 431	+	-	-	X	-	X	+	-	__00_
<i>C. coli</i> P 433	-	X	*	-	+	-	+	E	0__E
<i>C. jejuni</i> P 434	+	B	*	C	+	A	+	E	BCAE
<i>C. jejuni</i> P 436	+	B	*	C	+	A	+	E	BCAE
<i>C. jejuni</i> P 438	-	X	*	C	-	X	+	-	0C0_
<i>C. jejuni</i> P 439	-	X	+	F	+	D	+ -	X	0FD0
<i>C. jejuni</i> P 444	-	X	+	H	+	B	+	C	0HBC

<i>C. jejuni</i> P 445	-	X	+	F	+	B	+	H	0FBH
<i>C. jejuni</i> P 446	-	X	*	C	-	X	+	_	0C0_
<i>C. jejuni</i> P 447	-	X	*	C	-	X	+	C	0C0C
<i>C. jejuni</i> P 448	+	B	*	G	+	A	+	C	BGAC
<i>C. coli</i> P 450	-	X	*	_	-	X	+ -	X	0_00
<i>C. jejuni</i> P 451	+	B	*	G	+	A	+	C	BGAC
<i>C. coli</i> P 452	-	X	-	X	+ -	X	+	J	000J
<i>C. jejuni</i> P 453	-	X	+	H	+	B	+ -	X	0HB0
<i>C. jejuni</i> P 454	-	X	+	I	+	D	+ -	X	0ID0
<i>C. jejuni</i> P 456	-	X	+	I	+	D	+ -	X	0ID0
<i>C. jejuni</i> P 459	+	B	*	G	+	A	+	C	BGAC
<i>C. coli</i> P 461	-	X	*	_	+	A	+	E	0_AE
<i>C. jejuni</i> P 462	-	X	+	A	+	A	*	A	0AAA
<i>C. coli</i> P 463	-	X	+	H	+	B	+ -	X	0HB0
<i>C. jejuni</i> P 464	-	X	+	H	+	B	+	C	0HBC
<i>C. coli</i> P 465	-	X	*	_	-	X	+	E	0_0E
<i>C. jejuni</i> P 472	-	X	*	_	+ -	X	+	D	0_0D
<i>C. jejuni</i> P 477	+	A	*	G	+	B	+	D	AGBD
<i>C. coli</i> P 484	-	X	*	_	+	B	+	H	0_BH
<i>C. jejuni</i> P 495	-	X	*	_	-	X	+	F	0_0F
<i>C. coli</i> P 508	-	X	*	_	-	X	+	F	0_0F
<i>C. jejuni</i> P 587	-	X	*	_	+	B	*	A	0_BA
<i>C. jejuni</i> P 600	+	B	*	G	+	B	+	C	BGBC
<i>C. jejuni</i> P 623	-	X	*	G	+ -	X	+	C	0G0C
<i>C. jejuni</i> P 631	-	X	*	G	+ -	X	+	C	0G0C
<i>C. coli</i> P 646	-	X	+	_	-	X	+	K	0_0K
<i>C. jejuni</i> P 647	+	C	+	H	+	A	+	D	CHAD
<i>C. coli</i> P 657	-	X	+ -	_	-	X	+	I	0_0I
<i>C. coli</i> P 658	-	X	-	X	-	X	-	X	0000
<i>C. jejuni</i> P 659	+	C	+	E	+	A	+	H	CEAH
<i>C. jejuni</i> P 660	+	C	*	E	+	A	+	H	CEAH
<i>C. jejuni</i> P 661	-	X	*	C	-	X	-	X	0C00
<i>C. coli</i> P 662	-	X	*	_	+ -	X	+	K	0_0K
<i>C. coli</i> P 663	-	X	*	_	+ -	X	+	G	0_0G
<i>C. coli</i> P 664	-	X	*	_	+ -	X	+	G	0_0G

*14 – As estirpes de *Campylobacter* testadas pertencem a duas espécies do género, sendo elas *C. jejuni* e *C. coli*.

+ = Produto de PCR com a dimensão esperada.

0 = Locus vazio.

- = Não houve amplificação.

_ = Não foi feito.

+ - = Houve amplificação inespecífica.

X = Não foi determinado o perfil de digestão pois não

* = Produto de PCR com uma dimensão diferente da esperada.

houve amplificação.