

WALDERLY MELGAÇO BEZERRA

**EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA YD  
DE *Chromobacterium violaceum* EM SISTEMAS HETERÓLOGOS:  
POTENCIAL NO CONTROLE DE PRAGAS E FUNGOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

FORTALEZA – CE

- 2008 -

WALDERLY MELGAÇO BEZERRA

**EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA YD DE  
*Chromobacterium violaceum* EM SISTEMAS HETERÓLOGOS:  
POTENCIAL NO CONTROLE DE PRAGAS E FUNGOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, área de Concentração Bioquímica.

Aprovada em: 25 de setembro de 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro  
(Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira  
(Examinador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dra. Terzinha Feitosa Machado  
(Examinadora)  
Embrapa Agroindústria Tropical

Bezerra, W. M. 2008

Mariana,  
por você e para você

## AGRADECIMENTOS

Durante a elaboração e execução e desse trabalho inúmeras pessoas me influenciaram, inspiraram e ajudaram de diversas maneiras.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao professor Dr. *Thalles Barbosa Grangeiro*, pela avaliação imparcial, ajuda incondicional e orientação brilhante. Pela paciência durante o meu ano de afastamento. Pelo exemplo de caráter e integridade, para mim, para a nossa pequena, e para todos à sua volta.

Ao professor Dr. *José Tadeu Abreu de Oliveira*, pela disponibilidade em avaliar o trabalho e compor a banca examinadora. Pelo exemplo de profissional brilhante, comprometido e devotado.

À Dra. *Terezinha Feitosa Machado*, da Embrapa Agroindústria Tropical, pela disponibilidade em avaliar o trabalho e compor a banca examinadora. Pelas valiosas contribuições na correção do trabalho.

À professora Dra. *Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini*, pela amizade, pela ajuda imprescindível nas análises estatísticas e disponibilidade em avaliar o trabalho.

A todos os professores do Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Ceará, onde o trabalho foi executado, em especial à professora M. Sc. *Maria Aparecida Oliveira Alves*, pela presteza e sabedoria.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, em especial à professora Dra. *Cristina Paiva da Silveira Carvalho*, responsável pela minha iniciação no estudo das proteínas heterólogas; professora Dra. *Dirce Fernandes Melo* e professor Dr. *Márcio Viana Ramos* por todo o auxílio prestado e pela disponibilidade no uso de equipamentos dos respectivos laboratórios.

À professora Dra. *Maria Isabel Florindo Guedes* do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Ceará, por permitir a utilização de seu laboratório para a realização de parte dos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular: *Adriana Sampaio*, *Isac Bonfim*, *Júlio Camilo* e *Rafael Carvalho*, e àqueles que já deixaram saudade, *Bruno Lopes*,

*Camila Dias, Davi Coe, Nathália Dias, prof. Dr. Eder Freire*, pela companhia mais que agradável.

Às grandes companheiras de trabalho, *Denise Nepomuceno, Marina Lobo, Patrícia Gadelha, Sandra Ribeiro e Tuana Correia*, por fazer do laboratório a extensão do lar-doce-lar. Pelas inúmeras conversas, confidências, risadas, momentos de concentração e descontração, e pela maneira como essas companhias não nos deixam desistir frente aos inúmeros obstáculos do caminho.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Bioquímica, *Juliana Gomes, David Landim e Hélio Filho*. Ao colega *Wagner Felix*, pela alegria em todos os momentos, e por me ensinar que ‘a peroxidase é irreversivelmente inibida pela azida sódica’.

Ao grande amigo *Yuri Maia*, pelos oito anos de amizade, presença e companheirismo. Sem palavras, eu apenas agradeço.

Aos meus pais, *Edvaldo e Célia*, e aos meus irmãos, *Edvaldo Filho e Wall*, pela paciência durante as minhas ausências e pelo amor dedicado.

À *Francisca Lopes*, a grande mãe da *Mariana* nesses quase dois anos de sua vida, indispensável para manter a minha tranquilidade quanto à sua criação. Pelo amor devotado e incondicional para com a minha pequeninha, não existem palavras para agradecê-la.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO FINANCEIRO  
DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT)

Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.

“... Não importa tanto o tema da tese quanto a  
experiência de trabalho que ela comporta.”

Umberto Eco

## RESUMO

*Chromobacterium violaceum* é uma betaproteobactéria de vida livre encontrada em regiões tropicais e subtropicais. *C. subtsugae*, bactéria do mesmo gênero, possui atividade tóxica contra insetos de diversos gêneros. Entre os genes que podem estar envolvidos no potencial inseticida dessa bactéria, destacam-se aqueles que codificam quitinases. Em adição, identificou-se também no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 uma proteína contendo repetições YD com potencial atividade inseticida, codificada pelo gene *cv2776*, similar àquelas produzidas por *Xenorhabdus bovienii* e *Photorhabdus luminescens*. O motivo YD compreende 20 aminoácidos, com sequência consenso Gx3-9YxYDx2GR(L, I ou V)x3-10G (x representa qualquer aminoácido). A proteína TccC, de *P. luminescens*, possui 9 repetições YD, assim como a proteína SepC, de *Serratia entomophila*. SepC, juntamente com outras duas toxinas, SepA e SepB, são suficientes para causar a doença “âmbar” em *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). No presente trabalho, a região codificadora do gene *cv2776* de *C. violaceum* ATCC 12472 foi clonada em dois diferentes sistemas de expressão heteróloga. Em *Escherichia coli*, o gene foi expresso sob controle do promotor *araBAD*, induzido por L-arabinose. A proteína rCV2776 foi detectada por ensaio de imunoblotting na fração insolúvel das células de *E. coli* induzidas. A rCV2776 presente na fração insolúvel das células dessa bactéria teve efeito letal sobre larvas de *Callosobruchus maculatus*, diminuindo em até 78% o número de insetos adultos emergidos, além de diminuir o peso médio desses insetos. Além disso, a fração celular de *E. coli* contendo rCV2776 mostrou-se capaz de inibir o crescimento vegetativo de três fungos fitopatogênicos, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Quando incorporada no meio de cultura em uma concentração de 1% (m/v), essa fração causou percentuais de inibição de crescimento do micélio de 38.5% (*R. solani*), 60.7% (*M. phaseolina*) e 71.1% (*S. rolfsii*), respectivamente. Na levedura *Pichia pastoris*, a região codificadora foi expressa sob controle do promotor P<sub>AOX</sub>, que é induzido na presença de metanol como única fonte de carbono. Quando expressa em *P. pastoris*, a proteína recombinante foi aparentemente degradada por proteases endógenas, e não pôde ser detectada em análises de SDS-PAGE ou *Western Blotting*, mesmo quando foram aplicados 8,0 mg do sobrenadante concentrado e liofilizado no gel de eletroforese. Em conclusão, a proteína rCV2776 presente na fração insolúvel das células de *E. coli* induzidas foi efetiva em controlar a emergência do caruncho do feijão-de-corda, bem como em retardar o crescimento de *M. phaseolina* e *S. rolfsii*.

Palavras-chave: repetições YD; CV2776; expressão heteróloga; atividade inseticida; atividade fungicida



## ABSTRACT

*Chromobacterium violaceum* is a free-living betaproteobacterium, which is found in the water and soil environments of tropical and subtropical regions. *C. subtsugae*, another species of the same genus, is toxic towards insects belonging to several orders. Among the genes that may be involved in the insecticidal activity displayed by these bacteria are those that encode chitinases. In addition to these chitinases, a protein containing YD repeats with potential insecticidal activity, encoded by the gene *cv2776*, was also identified in the genome of *C. violaceum* ATCC 12472. Similar proteins have also been found in the genomes of *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens*. The YD motif comprises 20 amino acids, with the consensus sequence  $G_{x3-9}Y_xYD_{x2}GR(L, I \text{ or } V)_{x3-10}G$ , where x represents any amino acid. The protein TccC, from *P. luminescens*, has nine YD repeats in its sequence, as well as the protein SepC, from *Serratia entomophila*. SepC, along with two other toxins, SepA and SepB, are able to cause the "amber" disease in *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). In the present work, the DNA coding sequence of the gene *cv2776* of *C. violaceum* ATCC 12472 was cloned in two different heterologous systems. In *Escherichia coli*, the coding sequence was expressed under control of the promoter *araBAD*, induced by L-arabinose. The protein rCV2776 was detected by immunoblotting in the insoluble fraction of induced *E. coli* cells. The rCV2776 present in the total insoluble cell fraction caused the death of *Callosobruchus maculatus* larvae, reducing the number of emerged adults in 78% and also decreasing the average weight of the insects. The *E. coli* cell fraction containing the recombinant protein also affected the vegetative growth of the phytopathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. When the fraction containing rCV2776 was incorporated at 1% (w/v) in the medium, the inhibition percentages of the mycelium growth were 38.5% (*R. solani*), 60.7% (*M. phaseolina*) and 71.1% (*S. rolfsii*). In the yeast *Pichia pastoris*, the coding sequence was expressed under the control of the promoter  $P_{AOX}$ , which is induced by methanol as the sole carbon source. When expressed in *P. pastoris*, the recombinant protein was apparently degraded by endogenous proteases and could not be detected by SDS-PAGE or Western Blotting, even when 8 mg of protein was loaded into the gel. In conclusion, the recombinant protein CV2776 present in the insoluble fraction of induced *E. coli* cells was effective in controlling the emergence of the cowpea weevil, as well as slowing the growth of *M. phaseolina* and *S. rolfsii*.

Key words: YD repeats; CV2776; heterologous expression; insecticidal activity; antifungal activity

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** – Mapa circular e pontos de referência do vetor de clonagem pGEM-T *Easy Vector Multiple Cloning Sequences*. Fonte: [www.promega.com](http://www.promega.com)**Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 2** – Mapa circular do vetor de expressão em *Escherichia coli* pBAD/*Myc-His C*. Fonte: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 3** – Mapa circular do plasmídio para controle positivo de indução pBAD/*Myc-His/lacZ*. Fonte: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 4** – Sementes artificiais usadas no bioensaio para avaliação dos efeitos de extratos totais de *Escherichia coli* expressando a rCV2776 contra *Callosobruchus maculatus*. Cada tratamento constou de 30 sementes artificiais, distribuídas em três repetições.**Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 5** – Placas com discos de cultura do fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii*, utilizado no bioensaio com extratos totais de *Escherichia coli* expressando a rCV2776. O experimento contou com sete tratamentos, com três repetições.**Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 6** – Mapa circular do vetor de expressão em *Pichia pastoris* pPICZαA. Fonte: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 7** – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do gene *cv2776* amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *Chromobacterium violaceum* ATCC 11472, utilizando iniciadores específicos para essa região. 1 – Marcador de massa molecular φX-174 RF DNA/*Hae III digest* (300 ng); 2 a 4 – *cv2776* amplificado com os iniciadores desenhados para expressão em *E. coli*; 5 a 7 – *cv2776* amplificado com os iniciadores desenhados para a expressão em *P. pastoris*; 8 – controle negativo da reação..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 8** – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da preparação de plasmídios recombinantes pGEM::*cv2776* isolados de células de *E. coli* TOP10. M: marcador de massa molecular *Mass Ruler DNA Ladder, High Range*; 2 a 9: diferentes clones isolados de colônias brancas de pGEM::*cv2776*; 10: Controle negativo (colônia azul).**Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 9** – Eletroforese em gel de agarose 1,0% da PCR de clones dos plasmídios recombinantes pGEM::cv2776, utilizando os iniciadores desenhados para expressão em *E. coli*. M: marcador de massa molecular  $\phi$ X-174 RF DNA/*Hae* III *digest* (Invitrogen), 250 ng; 2 a 8: diferentes clones isolados de colônias brancas de pGEM::cv2776; 9: Controle negativo com água..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 10** – Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo EtBr 0,5  $\mu$ g/mL dos plasmídios isolados de células recombinantes de *Escherichia coli* pBAD::cv2776. M: Marcador de massa molecular  $\lambda$ DNA/*Hind* III *digest* (Invitrogen), 250 ng; 1 a 10: Plasmídios isolados pelo método de lise alcalina. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 11** – Eletroforese em gel de agarose 1,0% da PCR de clones dos plasmídios recombinantes pBAD::cv2776, utilizando os iniciadores desenhados para expressão em *E. coli*. M: marcador de massa molecular  $\phi$ X-174 RF DNA/*Hae* III *digest* (Invitrogen), 250 ng; 1 a 8: diferentes clones isolados de colônias brancas de pBAD::cv2776. A seta indica o fragmento de 810 pb amplificado para o clone selecionado. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 12** – Eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, das amostras utilizadas como controles da indução. Amostras: 1. *E. coli* TOP10 induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h; 2. *E. coli* TOP10 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; 3. *E. coli* TOP10-pBAD/*Myc*-His C, não induzido, 4 h; 4. *E. coli* TOP10-pBAD/*Myc*-His C induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h; 5. *E. coli* TOP10-pBAD/*Myc*-His C induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; 6. *E. coli* TOP10-pBAD/*Myc*-His/*lacZ* induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h; 7. *E. coli* TOP10 + pBAD/*Myc*-His/*lacZ* induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; 8. *E. coli* TOP10 + pBAD/*Myc*-His/*lacZ* não induzido, 0 h; 9. *E. coli* TOP10 + pBAD/*Myc*-His/*lacZ* não induzido, 4 h; M. Marcador de elevada massa molecular *High Molecular Weight* - SDS *Calibration* (Amersham). A seta vermelha indica a banda correspondente à  $\beta$ -galactosidase, controle positivo da indução..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 13** – Eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, da indução piloto das células de *E. coli* TOP10 pBAD::cv2776, com diferentes concentrações de L-arabinose. Poços 1 e 2: *E. coli* TOP10 :: pBAD/*lacZ* induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h e 4 h; Poços 3 e 12: Marcador de massa molecular *BenchMark Pre-stained*; Poços 4, 6, 8 e 10: *E. coli* TOP10 pBAD::cv2776 induzido com 0,002%, 0,02%, 0,2% e 2% de L-arabinose, 0 h; Poços 5, 7, 9 e 11: *E. coli* TOP10 pBAD:: cv2776 induzido com 0,002%, 0,02%, 0,2% e 2% de L-arabinose, 4 h; (Massa estimada de CV2776: ~ 30 kDa). As setas vermelhas indicam

uma proteína de cerca de 43 kDa, induzida nas amostras apontadas **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 14** – Eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, das frações obtidas após a lise de células de *E. coli* TOP10 pBAD::cv2776, induzidas com 0,02% de L-arabinose. M: Marcador de massa molecular *BenchMark Pre-stained*; Poços 1, 3, 5 e 7: Fração solúvel; Poços 2, 4, 6 e 8: Fração insolúvel. A seta indica a altura da banda correspondente à rCV2776..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 15** – Imunodeteção por Western Blotting das frações obtidas após a lise de células de *E. coli* TOP10 pBAD::cv2776, induzidas com 0,02% de L-arabinose. M: Marcador de massa molecular *BenchMark Pre-stained*; Poços 1, 3, 5 e 7: Fração solúvel; Poços 2, 4, 6 e 8: Fração insolúvel. Não houve reconhecimento de bandas na fração solúvel pelo anticorpo primário anti-cauda de histidina. A seta indica a altura da banda correspondente à rCV2776.

**Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 16** – Percentagem de emergência de insetos adultos de *Callosobruchus maculatus* alimentados com diferentes concentrações da fração solúvel (FS) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776, incorporada em sementes artificiais. As barras representam o desvio padrão. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 17** – Percentagem de emergência de insetos adultos de *Callosobruchus maculatus* alimentados com diferentes concentrações da fração insolúvel (FI) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776, incorporada em sementes artificiais. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ( $p > 0,01$ ) pelo teste de Tukey. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 18** – Tempo médio de desenvolvimento (de ovo a adulto) de *Callosobruchus maculatus* alimentados com diferentes concentrações da fração solúvel (FS) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776, incorporada em sementes artificiais. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ( $p > 0,01$ ) pelo teste de Tukey..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 19** – Tempo médio de desenvolvimento (de ovo a adulto) de *Callosobruchus maculatus* alimentados com diferentes concentrações da fração insolúvel (FI) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776, incorporada em sementes artificiais. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ( $p > 0,01$ ) pelo teste de Tukey..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 20** – Peso médio dos insetos adultos recém-emergidos de *Callosobruchus maculatus* alimentados com diferentes concentrações da fração solúvel (FS) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776, incorporada em sementes artificiais. As barras representam o desvio padrão. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 21** – Peso médio dos insetos adultos recém-emergidos de *Callosobruchus maculatus* alimentados com diferentes concentrações da fração insolúvel (FI) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776, incorporada em sementes artificiais. As barras representam o desvio padrão. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 22** – Aspecto geral do bioensaio para avaliação do efeito de FS e FI, obtidas de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776, sobre o crescimento de fungos fitopatógenos. Em A: Discos de culturas inoculados no dia zero; em B: Crescimento do fungo após sete dias de incubação. A: *M. phaseolina* dia zero; B: *M. phaseolina* após 7 dias de crescimento; C: *R. solani* dia zero; D: *R. solani* após 7 dias de crescimento; E: *S. rolfii* dia zero; F: *S. rolfii* após 7 dias de crescimento. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 23** – Efeito da fração solúvel (FS) obtida de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776, sobre o crescimento do fungo *Macrophomina phaseolina*. Controle: meio de cultura BDA; Tratamentos FS: meio de cultura BDA adicionado de diferentes concentrações da fração: 0,25, 0,5 e 1%; Controle + Nistatina: meio de cultura BDA suplementado com o antifúngico nistatina a 8.000 U/mL..... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 24** – Curva de crescimento do fungo *Macrophomina phaseolina* nos diferentes tratamentos submetidos. Controle: meio de cultura BDA; Tratamentos FI: meio de cultura BDA adicionado de diferentes concentrações da fração insolúvel de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776; Controle + Nistatina: meio de cultura BDA suplementado com o antifúngico nistatina a 8.000 U/mL. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 25** – Curva de crescimento do fungo *Rhizoctonia solani* nos diferentes tratamentos submetidos. Controle: meio de cultura BDA; Tratamentos FS: meio de cultura BDA adicionado de diferentes concentrações da fração solúvel de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776; Controle + Nistatina: meio de cultura BDA suplementado com o antifúngico nistatina a 8.000 U/mL. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 26** – Curva de crescimento do fungo *Rhizoctonia solani* nos diferentes tratamentos submetidos. Controle: meio de cultura BDA; Tratamentos FI: meio de cultura BDA adicionado de diferentes concentrações da fração insolúvel de células de *E. coli* expressando a

proteína rCV2776; Controle + Nistatina: meio de cultura BDA suplementado com o antifúngico nistatina a 8.000 U/mL. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 27** – Curva de crescimento do fungo *Sclerotium rolfsii* nos diferentes tratamentos submetidos. Controle: meio de cultura BDA; Tratamentos FS: meio de cultura BDA adicionado de diferentes concentrações da fração solúvel de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776; Controle + Nistatina: meio de cultura BDA suplementado com o antifúngico nistatina a 8.000 U/mL. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 28** – Curva de crescimento do fungo *Sclerotium rolfsii* nos diferentes tratamentos submetidos. Controle: meio de cultura BDA; Tratamentos FI: meio de cultura BDA adicionado de diferentes concentrações da fração insolúvel de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776; Controle + Nistatina: meio de cultura BDA suplementado com o antifúngico nistatina a 8.000 U/mL. .... **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 29** – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do gene *cv2776* amplificado por PCR a partir do plasmídeo recombinante pPICZ $\alpha$ A::*cv2776* isolado de *Escherichia coli* TOP10, utilizando iniciadores específicos para essa região. 1 – Marcador de massa molecular  $\phi$ X-174 RF DNA/ *Hae* III *digest* (300 ng); 2, 3, 4, 5 – Diferentes clones positivos de *cv2776*..... 85

**FIGURA 30** – Alinhamento das sequências de aminoácidos, traduzidas a partir das sequências de DNA dos insertos presentes em dois clones do plasmídeo recombinante pPICZ $\alpha$ A/*cv2776* isolados de *Escherichia coli* TOP10. A sequência do clone 1 permaneceu idêntica a sequência depositada no GenBank para o mesmo fragmento (*cv2776*). No clone 2 houve a incorporação de 81 pares de base (27 aminoácidos) na porção 3' terminal do DNA (ou –COOH da sequência traduzida) – sequência em negrito. Em vermelho: Aminoácidos presentes no motivo G<sub>X3-9</sub>Y<sub>X</sub>YD<sub>X2</sub>GR(L, I ou V)<sub>X3-10</sub>G; Sublinhado: sequência da repetição YD; Itálico: resíduos que compõem a cauda de poli-histidina. **Erro! Indicador não definido.**

**FIGURA 31** – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do gene *cv2776* amplificado por PCR a partir do DNA genômico de clones de *Pichia pastoris* obtidos após transformação com o plasmídeo recombinante pPICZ $\alpha$ A::*cv2776*, utilizando iniciadores específicos para essa região. 1 e 16 – Marcador de massa molecular  $\phi$ X-174 RF DNA- *Hae* III *digest* (300 ng); 2, 3, 4, 5, 6, 7 – Clones de pPIC::*cv2776c1*, isolado de *P. pastoris* X-33; 8, 9, 10, 11, 12, 13 – Clones de pPIC::*cv2776c5*, isolado de *P. pastoris* X-33; 14 – Controle positivo, utilizando pGEM::*cv2776* como substrato; 15 – Controle negativo, utilizando água no lugar do DNA substrato. .... **Erro! Indicador não definido.**



## LISTA DE QUADROS

**QUADRO 1** – Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da região codificadora *cv2776*, desenhados de acordo com a seqüência deste gene depositada no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ..... **Erro! Indicador não definido.**

**QUADRO 2** – Protocolo para confecção dos géis de poliacrilamida. Gel de concentração na concentração final de poliacrilamida de 3,5% (m/v) e gel de separação na concentração final de poliacrilamida de 12,5% (m/v)..... **Erro! Indicador não definido.**



## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** – Efeitos da fração solúvel (FS) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776 sobre o desenvolvimento dos insetos *Callosobruchus maculatus*, quando incorporada em sementes artificiais..... **Erro! Indicador não definido.**

**TABELA 2** – Efeitos da fração insolúvel (FI) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776 sobre o desenvolvimento dos insetos *Callosobruchus maculatus*, quando incorporada em sementes artificiais..... **Erro! Indicador não definido.**

**TABELA 3** – Percentual de inibição do crescimento do micélio (%ICM) de fungos fitopatogênicos cultivados em meio contendo diferentes concentrações de frações potéticas (FS e FI) de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776 de *Chromobacterium violaceum*..... **Erro! Indicador não definido.**

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

A<sub>260</sub> – absorvância a 260 nm

*AOX1* – fragmento de 942 pb contendo o promotor da enzima álcool oxidase que é induzido por metanol

*Bgl* II – endonuclease de restrição obtida a partir de *Bacillus globiggi*

CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio

C-terminal – carboxi-terminal

*cv1887* - janela aberta de leitura presente no genoma de *C. violaceum* com 4.155 pb que codifica uma proteína nemática

*cv2776* – janela aberta de leitura presente no genoma de *C. violaceum* com 810 pb que codifica uma proteína hipotética conservada

DAB – diaminobenzidina

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxinucleotídeo trifosfato

DO<sub>600</sub> – densidade óptica a 600 nm

*Eco* RI – endonuclease de restrição obtida a partir de *Escherichia coli* estirpe RY 13

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

EtBr – (IUPAC: *3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide*) brometo de etídeo, fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>

FI – Fração Insolúvel da rCV2776 expressa em *Escherichia coli* TOP10

FS – Fração Solúvel da rCV2776 expressa em *Escherichia coli* TOP10

IgG – imunoglobulina G

IPTG – isopropil β-D-1tiogalactopiranosídeo

kDa – quiloDalton

mA – miliamper

m/m – massa/massa

m/v – massa/volume

N-terminal – amino-terminal

ORF – “*open reading frame*” (janela aberta de leitura)

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – pares de base

pBAD/*Myc*-His C – vetor de 4.100 pb para expressão em *E. coli*

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da DNA polimerase)

pPICZα/*Myc*-His A – vetor de 3.328 pb para expressão secretada em *P. pastoris*

rCV1887 – proteína recombinante codificada pela sequência *cv1887* de *C. violaceum*

rCV2776 – proteína recombinante codificada pela sequência *cv2776* de *C. violaceum*

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

*Sna*B I – endonuclease de restrição obtida a partir de *Sphaerotilus natans*

*Sst* I – endonuclease de restrição obtida a partir de *Streptomyces stanford*

*Taq* DNA polimerase – enzima polimerase do DNA de *Thermus aquaticus*

TBE – tampão Tris-Borato-EDTA

TE – tampão Tris-EDTA

TEMED – *N,N,N',N'* – tetrametiletilenodiamina

Tris – tris-hidroxiaminometano

Tween – *polyoxyethylene sorbitan monolaurato*

v/v – volume/volume

*Xba* I – endonuclease de restrição obtida a partir de *Xanthomonas badrii*

X-Gal – *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside*

YNB – *Yeast Nitrogen Base* (com sulfato de amônio e sem aminoácidos)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>15</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>16</b>
<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES .....</b>	<b>17</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1. A bactéria <i>Chromobacterium violaceum</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2. Bactérias como agentes no controle de pragas na agropecuária .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3. Proteínas com repetições Tyr-Asp (YD).....</b>	<b>27</b>
<b>1.4. Sistemas heterólogos para a produção de proteínas recombinantes .....</b>	<b>29</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Objetivo geral .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIAIS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Enzimas e anticorpos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2. Cepas de bactérias e levedura, plasmídios e antibióticos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3. Espécimes usados em bioensaios.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4. Sistemas e kits.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5. Reagentes e outros materiais .....</b>	<b>36</b>
<b>4.6. Formulação dos meios de cultura .....</b>	<b>37</b>
4.6.1. Meios de cultura para bactéria .....	37
4.6.2. Meios de cultura para levedura .....	38
4.6.3. Culturas estoque.....	38
4.6.4. Meio de cultura para ensaios com fungos.....	38
<b>5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>39</b>

**5.1. Clonagem da região codificadora *cv2776* no plasmídio pGEM-T Easy** Erro! Indicador não definido.

5.1.1. Desenho dos iniciadores e amplificação da ORF *cv2776*..... **Erro! Indicador não definido.**

5.1.2. Ligação dos insertos purificados no vetor de clonagem pGEM-T Easy... **Erro! Indicador não definido.**

**5.2. Transformação de células de *Escherichia coli* TOP10 com o plasmídio pGEM::*cv2776*** ..... Erro! Indicador não definido.

5.2.1. Preparação de células de *E. coli* TOP10 eletrocompetentes ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.2.2. Transformação das células de *E. coli* TOP10 por eletroporação ..... **Erro! Indicador não definido.**

**5.3. Obtenção do plasmídio recombinante de expressão em *Escherichia coli*** ..... Erro! Indicador não definido.

5.3.1. Subclonagem da região codificadora *cv2776* no vetor de expressão pBAD/*Myc-His C*... **Erro! Indicador não definido.**

5.3.2. Sequenciamento do plasmídio recombinante pBAD::*cv2776* .. **Erro! Indicador não definido.**

**5.4. Indução da expressão da proteína recombinante rCV2776** Erro! Indicador não definido.

5.4.1. Indução experimental piloto ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.4.2. Indução da rCV2776ec em larga escala ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.4.3. Preparação dos extratos totais das células induzidas..... **Erro! Indicador não definido.**

**5.5. Bioensaios utilizando a rCV2776ec**..... Erro! Indicador não definido.

5.5.1. Ensaios contra *Callosobruchus maculatus* ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.5.2. Ensaios contra fungos fitopatógenos ..... **Erro! Indicador não definido.**

**5.6. Clonagem da região codificadora *cv2776* em *Pichia pastoris* X-33** Erro! Indicador não definido.

5.6.1. Obtenção do plasmídeo recombinante de expressão em *Pichia pastoris* . **Erro! Indicador não definido.**

5.6.2. Linearização do plasmídio pPICZαA::*cv2776*..... **Erro! Indicador não definido.**

**5.7. Transformação de células de *Pichia pastoris* X-33 com pPICZαA::*cv2776*** ..... Erro! Indicador não definido.

5.7.1. Preparação de células de *P. pastoris* eletrocompetentes ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.7.2. Transformação de células de *P. pastoris* X-33 por eletroporação ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.7.3. Isolamento de DNA genômico de *P. pastoris* recombinante.... **Erro! Indicador não definido.**

**5.8. Expressão da região codificadora *cv2776* recombinante em *Pichia pastoris* .....Erro!**  
Indicador não definido.

**5.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol (SDS-PAGE).....Erro!** Indicador não definido.

**5.10. Imunodeteção da rCV2776 imobilizada em membrana (*Western Blotting*) .....Erro!**  
Indicador não definido.

5.10.1. Eletrotransferência ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.10.2. Detecção das proteínas imobilizadas em membrana ..... **Erro! Indicador não definido.**

**6. RESULTADOS..... 40**

**6.1. Amplificação dos insertos e clonagem da região codificadora do gene *cv2776* no plasmídio pGEM T e transformação em *E. coli*.....Erro!** Indicador não definido.

**6.2. Clonagem e expressão de *cv2776* em *E. coli* TOP10.....Erro!** Indicador não definido.

6.2.1. Subclonagem da região codificadora do gene *cv2776* no plasmídio de expressão pBAD/*Myc*-His C e transformação *E. coli* TOP10..... **Erro! Indicador não definido.**

6.2.2. Expressão da proteína recombinante CV2776 em *E. coli* TOP10 ..... **Erro! Indicador não definido.**

6.2.2.1. Induções piloto..... **Erro! Indicador não definido.**

6.2.2.2. Induções em larga escala ..... **Erro! Indicador não definido.**

**6.3. Atividade inseticida de rCV2776ec .....Erro!** Indicador não definido.

**6.4. Atividade fungicida de rCV2776ec .....Erro!** Indicador não definido.

**6.5. Clonagem de *cv2776* em *Pichia pastoris* X-33.....Erro!** Indicador não definido.

6.5.1. Subclonagem da região codificadora do gene *cv2776* no plasmídio de expressão pPICZ $\alpha$ A e transformação em *P. pastoris* X-33 ..... **Erro! Indicador não definido.**

6.5.2. Expressão da proteína recombinante CV2776 em *P. pastoris* X-33 ..... **Erro! Indicador não definido.**

**7. DISCUSSÃO..... 41**

**8. CONCLUSÕES ..... 42**

**9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 42**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A bactéria *Chromobacterium violaceum*

*Chromobacterium violaceum* é uma  $\beta$ -proteobactéria saprófita, Gram-negativa, anaeróbia facultativa, de vida livre e encontrada em amostras de solo e água, em variados ecossistemas de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes. Suas colônias são violetas e regulares, levemente convexas, não gelatinosas, porém variantes irregulares e colônias sem pigmentação também já foram isoladas (DURÁN; MENCK, 2001).

Normalmente considerada como não patogênica, ocasionalmente pode atuar como patógeno oportunista em animais, e no homem pode causar septicemia fatal a partir de lesões da pele, com abscessos no pulmão e no fígado (CARIS et al., 2003). Verificou-se que essa bactéria poderia causar infecções em animais, como búfalo, porcos, macacos, ovelhas e cães. Alguns casos de infecções sérias e mesmo fatais, em humanos, foram reportados em alguns países, inclusive no Brasil. Aparentemente, a incidência de infecção por *C. violaceum* em humanos é baixa (DURÁN; MENCK, 2001).

Essa bactéria é abundantemente encontrada nas margens do rio Negro, o principal afluente do rio Amazonas, e no Brasil, tem sido estudada nas últimas três décadas (VASCONCELOS et al., 2003). O principal foco desses estudos tem se voltado para o pigmento violeta característico produzido pela bactéria, a violaceína. Estudos comprovaram que esse pigmento de cor púrpura exibe atividade tóxica contra patógenos de importância médica, como *Mycobacterium tuberculosis* (SOUZA et al., 1999), *Trypanosoma cruzi* (DURÁN et al., 1994), e *Leishmania* sp. (LEON et al., 2001), além de possuir atividades antiviral (ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2003) e anticâncer (UEDA et al., 1994; MELO et al., 2000), além de conferir proteção contra radiação UV (CALDAS et al., 1978). A violaceína é constituída por três subunidades estruturais: 5-hidroxiindol, 2-oxoindol e 2-pirrolidona. Esse pigmento apresenta coloração violeta, cujas subunidades são formadas pela condensação de duas moléculas modificadas de triptofano (BROMBERG; DURÁN, 2001; AUGUST et al., 2000).

Além da produção de violaceína, *C. violaceum* apresenta outras características fisiológicas importantes, como a produção de cianeto de hidrogênio, antibióticos e exoproteases, além de metabólitos que atuam como substâncias de defesa contra competidores

e/ou predadores, incluindo potenciadores de antibióticos beta-lactâmicos, glicopeptídeos e agentes antitumorais, com alta citotoxicidade para linhagens de câncer de pulmão, mama, cólon e leucemia em humanos (CARIS et al., 2003; DURÁN; MENCK, 2001). Produz ainda homopoliésteres, que podem ser utilizados na formulação de polímeros biodegradáveis, representando uma alternativa viável aos plásticos derivados de petroquímicos (STEINBÜCHEL et al., 1993; VASCONCELOS et al., 2003). Essa bactéria mostrou-se capaz de promover a hidrólise de filmes plásticos e a solubilização de metais pesados através de processos livres de mercúrio, evitando, dessa maneira, a contaminação ambiental (VASCONCELOS et al., 2003).

Alguns trechos do genoma da *C. violaceum*, com interesse biotecnológico, já eram conhecidos antes do início das atividades do Projeto Genoma Brasileiro (Rede Nacional de Sequenciamento de DNA). Entre eles estão os genes envolvidos na biossíntese da violaceína (AUGUST et al., 2000), o gene da fenilalanina hidroxilase (VOLNER et al., 2000), fragmentos genômicos contendo *orfD* (homólogo a SoxR de *Escherichia coli*) (KOLIBACHUCK; DENNIS, 1998) e sequências de genes que codificam RNAs ribossomais 16S e 23S (HARMSSEN; SINGER, 1999). Entretanto, apesar de alguns trechos do genoma da *C. violaceum* terem sido estudados, esses se basearam no conhecimento de uma pequena fração da constituição genética do organismo. Portanto, somente a partir do sequenciamento do genoma completo da estirpe ATCC 12472 da *C. violaceum* foi possível obter um retrato mais detalhado da complexidade molecular requerida para a versatilidade desse organismo, assim como um extenso compêndio de ORFs que significativamente aumentou o potencial biotecnológico dessa bactéria (VASCONCELOS et al., 2003).

O genoma da *C. violaceum* (cuja sequência completa está depositada no GenBank com o número de acesso AE016825) compreende um único cromossomo circular de 4,7 Mb com um conteúdo G + C médio de 64,83%. Existem 4.431 ORFs, uniformemente distribuídas e cobrindo cerca de 90% do genoma, com um comprimento médio de 954 pb (VASCONCELOS et al., 2003). A anotação do genoma revelou, além dos genes relacionados ao metabolismo geral, uma quantidade relativa significativa (em torno de 11%) de ORFs codificando proteínas transportadoras de membrana (GRANGEIRO et al., 2004), as quais devem mediar a interação da *C. violaceum* com os ambientes do solo e da água nos quais ela habita. Além disso, genes relacionados à resposta a condições de estresse, motilidade, patogenicidade e com potencial aplicação em diversas áreas foram identificados (VASCONCELOS et al., 2003).



Além do operon responsável pela síntese do pigmento violaceína, existem muitas outras ORFs codificando para produtos de interesse biotecnológico e médico, como também ORFs codificando para produtos de interesse na agricultura. Dentre esses produtos, podem-se citar várias quitinases que são potenciais agentes de biocontrole contra insetos, fungos e nematóides. Em adição a essas quitinases, identificou-se uma proteína com potencial atividade inseticida e nematicida, codificada pelo gene *cv1887*, similar àquelas produzidas por *Xenorhabdus bovienii* e *Photorhabdus luminescens*.

Em termos biotecnológicos, o conhecimento das sequências dos genes permite desvendar as etapas envolvidas nos processos metabólicos e orientar eventuais melhorias na produtividade de metabólitos. Esse conhecimento abre ainda a possibilidade do desenho de novos fármacos ou de inibidores de processos bioquímicos próprios a uma determinada patogenicidade.

## **1.2. Bactérias como agentes no controle de pragas na agropecuária**

As pragas exercem um papel economicamente importante na vida do homem. Por exemplo, alguns insetos atuam como vetores de certas doenças que atacam o homem, enquanto outros estão diretamente envolvidos na destruição das culturas agrícolas, bem como das plantas cujos produtos são armazenáveis, e plantas para alimentação animal. Ao longo dos anos, vários esforços têm sido realizados para controlar as pragas, incluindo o uso de inseticidas químicos. Entretanto, estes compostos matam uma ampla faixa de organismos incluindo aqueles que são úteis para o homem. Além disso, a longa exposição das pragas a esses inseticidas químicos frequentemente leva à seleção de organismos resistentes. Assim, esses produtos são melhorados ou alterados, com um enorme custo, de forma a superar o desenvolvimento da resistência da praga.

Dessa maneira, inseticidas biológicos são uma alternativa possível, se apropriadamente manejados ou usados como complemento no manejo integrado de pragas. O controle biológico de insetos tem a vantagem de ter um alvo específico, não poluir o ambiente e, até agora, apresentar menor risco de seleção de pragas resistentes (OWUANA, 2001). Predadores de insetos, fungos, bactérias, parasitóides e parasitas, tais como vírus e nematóides, são organismos comumente usados no controle biológico de insetos (ARONSON et al., 1986; OWUANA, 2001).

As bactérias exercem um papel chave no comércio de controle de insetos. As principais espécies de bactérias envolvidas nesse controle pertencem ao grupo dos *Bacillus* formadores de esporos. Esporos de *Bacillus thuringiensis* Berliner controlaram com sucesso pestes agrícolas quando pulverizados sobre a superfície foliar (FERRO et al., 1997) ou quando genes que codificam proteínas inseticidas produzidas por essa bactéria foram usados na produção de plantas transgênicas (PERLAK et al., 1993). Entre as estratégias utilizadas para o controle de pestes na agricultura, estão aquelas que se baseiam no desenvolvimento de culturas transgênicas que expressam proteínas tóxicas para insetos, nematóides e outras pragas (LEE et al., 2004).

Iniciada em 1996, a comercialização de plantas de milho e algodão expressando proteínas Cry de *B. thuringiensis* (BATES et al., 2005) mostra-se ainda como a estratégia mais largamente aplicada no desenvolvimento dessas e de outras culturas transgênicas com resistência a pragas. Essas toxinas têm sido usadas com sucesso no controle de diferentes espécies de díptera, lepidóptera e coleóptera (ARONSON et al., 1986). As proteínas Cry são toxinas cristalinas ( $\delta$ -endotoxinas) produzidas pela bactéria durante a sua fase de esporulação (HOFTE; WHITELEY, 1989) e tem efeito letal sobre insetos saudáveis após a ingestão da bactéria pela larva do inseto. Após a ingestão, as proteases do intestino médio ativam as endotoxinas que formam, então, poros na membrana das células epiteliais do intestino médio, causando lise osmótica e, como consequência, a morte do inseto (KNOWLES et al., 1989).

Entretanto, o uso constante e em larga escala, bem como o desenvolvimento crescente de culturas transgênicas expressando essas toxinas, promovem a seleção de populações de insetos resistentes. Dessa maneira, novas proteínas devem ser exploradas como alternativa à tecnologia *Bt*, para promover a diversificação dos genes utilizados para o controle de pragas (LEE et al., 2004).

Muitos trabalhos já demonstraram o potencial de toxinas produzidas por microorganismos no controle de pragas (BOWEN et al., 1998; LEE et al., 2004; MARTIN et al., 2007b). Alguns desses microorganismos são simbioses de nematóides entomopatogênicos, que causam doenças em várias pragas que provocam danos em diversas culturas. Essas bactérias têm a habilidade de matar insetos devido à produção de um grupo de proteínas tóxicas que são ativas quando administradas por via oral (MORGAN et al., 2001). Por exemplo, toxinas isoladas da bactéria *Photorhabdus luminescens* com atividade inseticida oral tem sido detalhadamente estudadas (BOWEN et al., 1998; GUO et al., 1999).

*Xenorhabdus bovienii* e *Photorhabdus* spp. possuem uma ampla faixa de hospedeiros e são introduzidos no inseto por meio do seu nematóide simbiote (ARONSON et al., 1986). Essas bactérias ocupam o intestino de nematóides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente. Os nematóides, ao invadirem as larvas dos insetos, regurgitam as bactérias no seu interior, que se multiplicam na hemolinfa das larvas, produzindo substâncias tóxicas e causando septicemia, culminando na morte das mesmas. Os nematóides se reproduzem e a progênie se alimenta no interior dos cadáveres das larvas dos insetos, invadindo posteriormente as outras larvas da população (ARONSON et al., 1986; KAYA; GAUGLER, 1993). Embora esses nematóides atuem como agentes inseticidas, a produção, manutenção e distribuição desses organismos para o controle de insetos são laboriosas, onerosas e ineficientes.

Trabalhos recentes demonstram que *Chromobacterium subtsugae* Martin provocou, em ensaios de laboratório, um percentual de mortalidade de 80 a 100% em insetos adultos de *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber e *D. virgifera virgifera* LeConte, e em larvas de *Leptinotarsa decemlineata* Say, insetos da mesma família de *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Chrysomelidae) (MARTIN et al., 2004, 2007a, 2007b). Esses organismos são pragas de culturas de leguminosas (soja *Glycine max* L. Merr. e amendoim *Arachis hypogea* L.), solanáceas (batata *Solanum tuberosum*) e cucurbitáceas (pepino *Cucumis sativus* L. e melões *Cucumis* spp.). Além disso, o inseto heteróptero *Nezara viridula* (L.), praga de culturas de solanáceas, algodão (*Gossypium* spp.), leguminosas (*Phaseolus vulgaris* L.) e outros vegetais, como tomate (*Lycopersicum* spp.), mostrou-se totalmente susceptível nos ensaios com essa bactéria, que causou 100% de letalidade (MARTIN et al., 2007b).

A proteína codificada pelo gene *cv1887* da *C. violaceum* apresenta similaridade com uma proteína nematicida de *X. bovienii* e com proteínas inseticidas de *P. luminescens* (FREIRE, 2007), dois microorganismos que tem propriedades inseticidas já comprovadas experimentalmente, como visto anteriormente. Freire (2007) expressou essa proteína em *E. coli*, e demonstrou que a fração protéica que concentrava a rCV1887 foi capaz de retardar significativamente o tempo médio de desenvolvimento de larvas do caruncho do feijão-de-corda *C. maculatus*, de duas populações. Devido à semelhança estrutural com a proteína CV1887, e pela presença de repetições YD em relativamente grande número, a proteína codificada pelo gene *cv2776* deve possuir também alguma atividade inseticida.

A exploração das espécies de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* como biopesticidas pode ser limitada, visto que elas não sobrevivem na água ou no solo por muito tempo. A bactéria *C. violaceum*, por outro lado, é encontrada na água e no solo, e é considerada uma bactéria de vida livre, mas, por atuar como um patógeno oportunista em animais e até no homem, seu uso como biopesticida também pode ser bastante limitado. Portanto, é importante que a toxicidade detectada em bactérias com essas características possa ser geneticamente transferida para outras bactérias, microorganismos ou plantas para sua devida exploração como agentes de biocontrole de pragas. Para tal fim, é essencial estudar essas toxinas em maiores detalhes, assim como a habilidade para expressar essas proteínas em um hospedeiro heterólogo, com manutenção da sua atividade inseticida.

### 1.3. Proteínas com repetições Tyr-Asp (YD)

As repetições Tyr-Asp (YD) compreendem um motivo de cerca de 20 aminoácidos, com a sequência consenso  $Gx_{3-9}YxYDx_2GR(L, I \text{ ou } V)x_{3-10}G$ , onde x representa qualquer aminoácido (MINET; CHIQUET-EHRISMANN, 2000), que se repetem ao longo de determinadas sequências protéicas, em variados números de cópias. Repetições com esse motivo foram inicialmente detectadas nas sequências de proteínas codificadas pelos elementos de rearranjo (*rhs* - *rearrangement hot spot*) de *Escherichia coli* (ZHAO et al., 1993) e na proteína WAPA (*Wall Associated Protein A*) de *Bacillus subtilis* (FOSTER, 1993).

As teneurinas são as únicas proteínas de eucariotos descritas que apresentam as repetições YD (MINET; CHIQUET-EHRISMANN, 2000). As teneurinas são uma família de proteínas transmembrana conservadas, recentemente estudadas, presentes em vertebrados e em invertebrados. Essas proteínas já foram encontradas em *Drosophila melanogaster* (BAUMGARTNER et al., 1994) e *Caenorhabditis elegans* (DRABIKOWSKI et al., 2005), bem como em galinha, rato e até no homem (TUCKER et al., 2007).

Em *Drosophila*, a teneurina Tem-m participa ativamente dos primeiros estágios da regulação do desenvolvimento embrionário (BAUMGARTNER et al., 1994), bem como nos estágios posteriores do desenvolvimento dos folhetos embrionários e sistema nervoso central e periférico (LEVINE et al., 1997).

Em vertebrados, as repetições YD estão localizadas na porção C-terminal das teneurinas, e existem pelo menos 26 dessas repetições consecutivas, seguidas por uma região

de repetições *YD-like* condensadas (MINET et al., 1999). Minet e colaboradores (1999) demonstraram que proteínas com repetições YD são capazes de reconhecer e se ligar à heparina, e que a interação é favorecida pelos múltiplos domínios presentes nas proteínas. Essa forte interação está relacionada à presença dos aminoácidos arginina (Arg/R) e lisina (Lys/K) dentro da sequência consenso das repetições YD, já que a ligação de uma proteína à heparina envolve a presença de aminoácidos básicos (HILEMAN et al., 1989). Estudos desses autores também sugerem que as repetições YD presentes nessas proteínas podem ser capazes de se ligar à condroitina (MINET et al., 1999), um importante componente estrutural da cartilagem, formado por uma cadeia de N-acetilgalactosamina e ácido glucurônico alternados. Dessa maneira, esses autores propuseram essas repetições como um novo domínio de ligação a carboidratos.

Sete diferentes elementos *rhs* foram descritos para *E. coli* (HILL et al., 1995), e esses elementos podem estar presentes ou não, em diferentes linhagens dessa bactéria. Esses elementos codificam proteínas de elevada massa molecular, mas que até hoje não foram isoladas em laboratório (MINET et al., 1999). Mesmo assim, as janelas de leitura desses genes se mantêm intactas, o que sugere que essas proteínas hipotéticas tenham uma função vital em *E. coli* (HILL et al., 1995). Análises *in silico* dos elementos *rhs* de *E. coli* indicam que a presença dessa sequência codificadora na bactéria é fruto de uma transferência horizontal, evidência que é suportada pelo alto conteúdo G + C presente nas sequências codificadoras dessas proteínas, que são atípicos quando comparados com o restante do genoma da bactéria. Dessa maneira, acredita-se que essas proteínas são essenciais na interação bactéria-hospedeiro (HILL et al., 1995).

As proteínas WAPA de *B. subtilis* também contem repetições YD bastante similares, mas pouco se sabe sobre a sua função (FOSTER, 1993). Essa proteína é encontrada na superfície celular, com a porção N-terminal inserida na parede celular da bactéria e a porção C-terminal, rica em repetições YD, livre na superfície, possivelmente para possibilitar interações com hospedeiros (FOSTER, 1993; MINET et al., 1999).

Uma das toxinas do complexo Tc de *P. luminescens*, TccC possui 9 repetições YD na sua sequência, assim como SepC, uma proteína codificada no plasmídeo pADAP de *Serratia entomophila*, bactéria patogênica para *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). SepC, juntamente com outras duas toxinas, SepA e SepB, são suficientes para causar a doença “âmbar” nesses insetos (HURST et al., 2004).

Grangeiro e colaboradores (resultados não publicados) verificaram a existência de cinco genes codificando proteínas com diferentes números da repetição YD, no genoma da *C. violaceum*: os genes *cv1887* e *cv1238*, codificando proteínas com 12 repetições; *cv1431*, para uma proteína com 16 repetições; e os genes *cv2776* e *cv1429*, para proteínas com 4 e 3 repetições, respectivamente. A proteína codificada pelo gene *cv1887* da *C. violaceum* apresenta similaridade com a proteína nematicida de *X. bovienii* e com proteínas inseticidas de *P. luminescens* (FREIRE, 2007), dois microorganismos que tem propriedades inseticidas já comprovadas experimentalmente, como visto anteriormente.

Outra sequência similar, porém mais distantemente relacionada às repetições YD, é encontrada na toxina A de *Clostridium difficile* (repetição de classe II). A toxina A de *C. difficile* é uma enterotoxina e citotoxina, que causa hemaglutinação em eritrócitos de rato pela ligação das repetições de classe II aos carboidratos da superfície das células sanguíneas (MINET; CHIQUET-EHRISMANN, 2000). Essa toxina também foi capaz de reconhecer e interagir com os carboidratos da superfície de células do epitélio intestinal humano (MINET et al., 1999).

Proteínas com domínios de ligação a carboidratos (lectinas), especialmente as de plantas, exibem caracteristicamente efeitos deletérios sobre o crescimento e desenvolvimento de insetos, fungos e nematóides (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Devido à similaridade entre as repetições YD (presentes nos elementos *rhs*, bem como em CV2776), a proteína WAPA e as repetições presentes na toxina A, e pelo fato de que em todos os casos a presença de elementos que reconhecem e se ligam a carboidratos serem essenciais à sua função, é provável que a propriedade de interação com carboidratos das repetições YD esteja relacionada a potencial ação nematicida e inseticida dessas proteínas. Como as proteínas YD de *C. violaceum* não possuem nenhum outro domínio particular além das repetições YD, a demonstração experimental dessas suas propriedades (ligação a heparina e ação inseticida/nematicida) será uma evidência da atividade de interação a carboidrato como causa do efeito sobre nematóides e pragas.

#### **1.4. Sistemas heterólogos para a produção de proteínas recombinantes**

O uso da tecnologia do DNA recombinante e a produção de proteínas em sistemas heterólogos (bactérias, leveduras e células animais e vegetais) têm fornecido importantes

contribuições no estudo da estrutura, biossíntese e função das proteínas (CARVALHO, 2004), além de permitir a produção de uma proteína ativa através de um meio de cultura relativamente barato ao invés de gasto extensivo com a produção e extração da mesma proteína no organismo de origem (YIN et al., 2007).

Os sistemas heterólogos produzem proteínas com uma sequência de aminoácidos definida e permitem que a relação entre sequência e função da proteína possa ser explorada (NEPOMUCENO, 2008; LUO et al., 2005). A produção de proteínas recombinantes exige que o gene a ser estudado seja clonado num vetor de expressão sob o controle de um promotor, geralmente induzível (SCHUMANN et al., 2004).

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é o microorganismo mais extensivamente utilizado para a expressão heteróloga de proteínas. O uso de *E. coli* como sistema de expressão apresenta como vantagem o fato dessa bactéria ser um organismo de bioquímica, fisiologia e genética relativamente simples e bem caracterizadas, além da disponibilidade de inúmeras linhagens de células e vetores de expressão, que produzem proteínas fusionadas com diversos *tags* moleculares, e que proporcionam uma expressão otimizada para diferentes tipos de proteínas (CHOI et al., 2006; TAMÁS; SHEWRY, 2006; CARVALHO, 2004).

A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* é largamente empregada em laboratórios em todo o mundo. Essa bactéria apresenta baixos requerimentos de carbono e nitrogênio, o que permite um baixo custo e enorme conveniência na produção de proteínas recombinantes. Esse sistema de expressão também apresenta uma alta taxa de crescimento, possibilitando um rápido acúmulo de biomassa, além da capacidade de fermentação contínua em culturas de alta densidade de células, levando, dessa maneira, a um processo simplificado de produção em larga escala (SHADEV et al., 2008; YIN et al., 2007).

Trabalhos relatam rendimentos de 8,5 g de proteína recombinante por litro de meio de cultura para a IGF-1, expressa em corpos de inclusão (JOLY et al., 1998) e 5,2 g de fosfatase alcalina recombinante por litro de cultura (CHOI et al., 2000). Entretanto, esses rendimentos extraordinários são obtidos somente em culturas com alta densidade de células, utilizando fermentadores (YIN et al., 2007).

A rápida produção de proteínas recombinantes em *E. coli* pode ocasionar a formação de agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão (SCHUMANN et al., 2004), que permanecem protegidos da ação proteolítica da célula hospedeira (YIN et al.,

2007). Estas partículas esféricas resultam de uma falha do sistema de reparo ou remoção de proteínas desenoveladas ou enoveladas incorretamente e acumulam-se, permanecendo separadas do citoplasma (SCHUMANN et al., 2004). Para a obtenção de proteínas solúveis, faz-se necessária a aplicação de métodos apropriados de solubilização e renaturação das proteínas recombinantes (MIDDELBERG, 2002). Porém, em alguns casos, a tentativa de ressolubilização promove a desnaturação irreversível da proteína recombinante.

Dessa maneira, a utilização de sistemas procarióticos para expressão de proteínas recombinantes apresenta limitações quando se deseja produzir uma proteína que sofre processamentos co- e/ou pós-traducionais (como glicosilações, clivagens proteolíticas ou formação de pontes dissulfeto). A possível toxicidade da proteína recombinante para a bactéria, a formação de corpos de inclusão, a degradação da proteína por proteases bacterianas e a adição de resíduos de metionina N-terminal são também fatores limitantes (SHARMA, 1986).

Para minimizar essas limitações, outros sistemas de expressão, baseados em organismos eucariontes, têm sido extensivamente estudados e utilizados. O potencial biotecnológico dos sistemas de expressão baseados em leveduras pode ser confirmado devido à similaridade entre os processos bioquímicos, moleculares e genéticos que as leveduras compartilham com os eucariotos superiores e pela sua capacidade de produzir proteínas heterólogas em larga escala, com alto rendimento (YIN et al., 2007). Atualmente, além de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* (CREGG et al., 2000) e *Schizosaccharomyces pombe* (YIN et al., 2007), outras leveduras “não convencionais” também têm sido exploradas como sistemas de expressão heterólogos, tais como *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* (GELLISSEN; HOLLENBERG, 1997) e *Yarrowia lipolytica* (MADZAK et al., 2004).

Além das vantagens de crescimento rápido, meios de cultura simples e baixo custo, como em *E. coli*, o rico sistema compartimentalizado de endomembranas das leveduras permite que proteínas sintetizadas no interior da célula possam ser secretadas para o meio extracelular. Adicionalmente, as leveduras podem produzir proteínas solúveis e com o correto enovelamento, e, para aquelas que necessitam de modificações pós-traducionais, os sistemas baseados em leveduras trazem a vantagem de realizar tais modificações (YIN et al., 2007).

Nesse contexto, a levedura *Pichia pastoris* se destaca pelas seguintes vantagens: a facilidade da manipulação genética e a sua semelhança com a levedura *S. cerevisiae*, um dos sistemas de expressão melhor caracterizado atualmente; a habilidade dessa levedura em produzir proteínas heterólogas em altos níveis, tanto intra como extracelularmente; e a



capacidade de realização das modificações pós-traducionais realizadas por organismos eucariotos, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto ou processamento proteolítico (CEREGHINO; CREGG, 2000).

A expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* baseia-se na sua capacidade de metabolizar metanol, na ausência de qualquer outra fonte de carbono e energia. O primeiro passo no metabolismo do metanol é a oxidação desse álcool em formaldeído, utilizando oxigênio molecular, reação catalisada pela enzima álcool oxidase (AOX), que tem pouca afinidade por oxigênio. Para compensar essa baixa afinidade, a célula produz grandes quantidades da enzima, que pode se acumular, compreendendo até 30% das proteínas celulares totais (GURKAN; ELLAR, 2005). A expressão extracelular de proteínas heterólogas em *P. pastoris* é uma opção particularmente atrativa, pois essa levedura secreta níveis muito baixos de proteínas endógenas. Além disso, utilizando-se um promotor  $P_{AOX}$ , é possível obter a proteína recombinante em altos níveis, o que já torna esse tipo de expressão um passo importante na sua purificação (GURKAN; ELLAR, 2005).

Assim, a levedura metilotrófica *P. pastoris* é um excelente sistema de expressão de proteínas recombinantes (YIN et al., 2007), e já foi reportado, para esse sistema, a expressão de mais de 200 proteínas de uma variedade de organismos, tanto procariotos como eucariotos, como bactérias, fungos, plantas, animais, incluindo o homem, e até de vírus (CREGG et al., 2000). Além disso, trabalhos recentes mostram rendimentos excelentes na expressão de muitas proteínas eucarióticas, biologicamente ativas, em *P. pastoris* (BAUMGARTNER et al., 2002, 2003; ROMANOS et al., 1992).

## 2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transformação genética de plantas, tem possibilitado uma abordagem alternativa no controle de pragas e doenças. Genes que codificam proteínas que interferem com o crescimento e desenvolvimento de insetos, nematóides e fungos, podem ser introduzidos nas culturas de interesse para reduzir sua suscetibilidade a esses agentes nocivos. De fato, desde o início da sua comercialização em 1996, culturas transgênicas contendo características agrônomicas desejáveis têm sido introduzidas em diferentes mercados agrícolas economicamente importantes (CASTLE et al., 2006). Nesse contexto, os genomas microbianos constituem recursos naturais promissores para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos inovadores para a agricultura, na forma de novos genes para o controle de insetos-praga e patógenos (VODOVAR et al., 2006).

A economia brasileira baseia-se fortemente no agronegócio. Entretanto, o potencial biotecnológico de *C. violaceum* para abordar questões ligadas à agricultura ainda não foi explorado. O uso de microorganismos no controle de pragas da agricultura pode ser ecologicamente sustentável e economicamente viável, e *C. violaceum* é um forte candidato para essa exploração (BARRETO et al., 2008).

Apesar da sua adaptação ao meio ambiente, a exploração de *C. violaceum* como biopesticida pode ser bastante limitada ou impossível, já que esta bactéria pode atuar como um patógeno oportunista em animais e no homem. Portanto, é importante que os genes que codificam proteínas potencialmente tóxicas para insetos, fungos e nematóides tenham essas propriedades validadas experimentalmente. Esses genes poderão então ser transferidos para outras bactérias, microorganismos ou plantas para sua devida exploração como agentes de controle de pragas e doenças. Para tal fim, é essencial estudar essas toxinas em maiores detalhes, assim como a habilidade para expressar essas proteínas em hospedeiros heterólogos e verificar a manutenção da suas atividades biológicas nesses sistemas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de um gene de *Chromobacterium violaceum*, que codifica uma proteína com repetições YD (CV2776), como agente no biocontrole de pragas da agricultura.

#### 3.2. Objetivos específicos

Clonar, em dois diferentes sistemas de expressão, a região codificadora do gene *cv2776* de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, que codifica uma proteína com repetições YD;

Determinar, para os dois sistemas de expressão heteróloga, as condições ideais de expressão desse gene e induzir a produção da proteína recombinante (rCV2776);

Avaliar a atividade inseticida para *Callosobruchus maculatus* das frações solúvel e insolúvel obtidas a partir da lise de células de *Escherichia coli* transformadas, expressando a proteína rCV2776;

Avaliar a atividade fungicida para os fungos fitopatogênicos *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* das frações solúvel e insolúvel obtidas da lise de células de *E. coli* expressando a proteína rCV2776;

Contribuir para o conhecimento científico, no que diz respeito à natureza e ao mecanismo de ação das proteínas de bactérias com repetições YD.

## 4. MATERIAIS

### 4.1. Enzimas e anticorpos

Para a realização do trabalho, foram utilizadas as enzimas *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences), T4 DNA ligase (Promega – Madison, WI, USA), e as enzimas de restrição *Sna* BI, *Bgl* II, *Eco*R I, *Xba* I e *Sst* I (Jena Bioscience GmbH, Alemanha), acompanhadas de seus respectivos tampões de reação 10X. Ribonuclease bovina I A, Proteínase K (GE Healthcare – Piscataway, NJ, USA), Lisozima de clara de ovo (USB - Cleveland, OH, USA) e DNase I (Promega) também foram utilizadas em diferentes etapas do desenvolvimento do trabalho.

Anticorpo (IgG) monoclonal de camundongo contra cauda de histidina e IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology – Santa Cruz, CA, USA) foram utilizados nos experimentos de imunodeteção (*Western blotting*).

### 4.2. Cepas de bactérias e levedura, plasmídios e antibióticos

A estirpe ATCC 12472 da *Chromobacterium violaceum* foi adquirida através da distribuidora Interlabdist da ATCC (*American Type Culture Collection*).

A bactéria *Escherichia coli* estirpe TOP10 (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) foi utilizada como hospedeira para os vetores de clonagem e expressão, bem como para os experimentos de expressão nesse sistema, enquanto que a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* estirpe X-33 (Invitrogen) foi utilizada nos experimentos de expressão da proteína recombinante.

O plasmídio pGEM-T *Easy* (Promega) foi usado como vetor de clonagem, enquanto que os plasmídios pBAD/*Myc*-His C e pPICZ $\alpha$ /*Myc*-His A (Invitrogen) foram utilizados como vetores de expressão em bactéria e levedura, respectivamente.

Os antibióticos ampicilina (USB), carbenicilina (USB), estreptomicina (USB) e zeocina (Invitrogen) foram utilizados durante os experimentos. Para os ensaios biológicos da rCV2776 contra fungos fitopatogênicos, foi utilizado meio BDA.

### 4.3. Espécimes usados em bioensaios

Os adultos de *Callosobruchus maculatus*, identificados de acordo com SANTOS (1971), foram originalmente coletados a partir de sementes infestadas, adquiridas no comércio de Fortaleza em janeiro de 2004, e a cultura mantida no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Os fungos fitopatogênicos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* foram cedidos pela profa. Dra. Francisca Nemauro, do Laboratório Biofábrica *Bt* do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

### 4.4. Sistemas e kits

Sistema para purificação de DNA de gel de agarose *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), kit de sequenciamento *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), sistema para purificação de plasmídios *Wizard* (Promega), e kit para clonagem de produtos de PCR (Promega) foram utilizados durante os experimentos de clonagem e sequenciamento dos insertos.

### 4.5. Reagentes e outros materiais

Oligonucleotídeos iniciadores complementares às extremidades 5' e 3' da ORF *cv2776* foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, USA). Os padrões para eletroforese de ácidos nucléicos, DNA  $\lambda$  digerido com *Hind* III e  $\phi$ X-174 RF DNA digerido com *Hae* III, foram obtidos da Invitrogen, e o *Mass Ruler DNA Ladder High Range* foi obtido da Fermentas Life Sciences (Burlington, Canadá).

Padrões para eletroforese de proteínas, *BenchMark Pre-stained* (Invitrogen) e *High Molecular Weight Marker* (GE Healthcare) foram utilizados nos experimentos de SDS-PAGE. Membranas de nitrocelulose Hybond™ C Extra (Amersham Biosciences Corp., USA) e papel de filtro Hybond™ foram utilizados nos experimentos de *Western Blotting*. Leite

desnatado Molico<sup>®</sup> foi obtido no comércio local e utilizado nos experimentos de imunodeteccção.

Para os ensaios biológicos da proteína rCV2776 contra *Callosobruchus maculatus*, foram utilizadas sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) obtidas comercialmente e cápsulas gelatinosas nº 2, para a confecção das sementes artificiais.

Os demais reagentes (reagentes para biologia molecular, para expressão e detecção de proteínas recombinantes, solventes orgânicos, vidrarias, plásticos e outros materiais) eram todos de grau analítico.

#### **4.6. Formulação dos meios de cultura**

##### 4.6.1. Meios de cultura para bactéria

LB (Luria-Bertani) caldo: triptona bacteriológica 1,0%, NaCl 1,0%, extrato de levedura 0,5%, pH 7,5. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos.

LB agar: triptona bacteriológica 1,0%, NaCl 1,0%, extrato de levedura 0,5%, agar bacteriológico 1,5%, pH 7,5. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos.

2xYT (*Yeast extract Triptone*): extrato de levedura 1%, triptona bacteriológica 1,6%, NaCl 0,5%. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos.

SOB: triptona bacteriológica 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, pH 7,5. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos. Resfriar e adicionar MgCl<sub>2</sub> estéril para concentração final de 10 mM.

SOC: meio SOB adicionado de dextrose estéril para concentração final de 40mM.

GYT (*Glycerol Yeast extract Triptone*): glicerol 10%, extrato de levedura 0,125%, triptona bacteriológica 0,25%. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos.

LB *low salt*:: triptona bacteriológica 1,0%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5%, pH 7,5. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos.

#### 4.6.2. Meios de cultura para levedura

YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*): extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2%. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos. Resfriar e adicionar dextrose estéril para concentração final de 2%.

YPDS agar: extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2%, sorbitol 1M, agar bacteriológico 1,5%. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos. Resfriar e adicionar dextrose estéril para concentração final de 2%.

BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*): extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2%, glicerol 1%, preparado em tampão fosfato de potássio 6,0 mM, pH 6,0. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos. Resfriar e adicionar: YNB estéril para concentração final de 1,34%, biotina estéril para concentração final de  $4 \times 10^{-5}$ %.

BMMH (*Buffered Methanol-complex Medium*): extrato de levedura 1%; peptona bacteriológica 2%; preparado em tampão fosfato de potássio 6,0 mM pH 6,0. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos. Resfriar e adicionar: YNB estéril para concentração final de 1,34%, biotina estéril para concentração final de  $4 \times 10^{-5}$ % e metanol para concentração final de 0,5%.

#### 4.6.3. Culturas estoque

Os estoques de células recombinantes em glicerol 10% foram preparados a partir de uma cultura crescida por aproximadamente 16 horas em 5,0 mL de meio de cultura em caldo. Os estoques foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer (-80 °C).

#### 4.6.4. Meio de cultura para ensaios com fungos

BDA (Batata Dextrose Agar): amido de batata 0,4%; dextrose 2%; agar bacteriológico 1,5%.

## **5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

Conteúdo protegido para publicação. Obrigada pela compreensão.



## **6. RESULTADOS**

Conteúdo protegido para publicação. Obrigada pela compreensão.

## 7. **DISCUSSÃO**

Conteúdo protegido para publicação. Obrigada pela compreensão.

## **8. CONCLUSÕES**

Conteúdo protegido para publicação. Obrigada pela compreensão.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAYI, F. A.; WINTOLA, H. U. Suppression of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* (F.) infesting stored cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds with some edible plant product powders. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 9, n. 8, p. 1454-1459. 2006.
- ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; ANTONIO, R. V.; CRECZYNSKI-PAZA, T. B.; BARARDI, C. R.; SIMÕES, C. M. Citotoxicity and potencial antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, n. 6, p. 843-848. 2003.
- ARONSON, A.I.; BECKMAN W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**. v. 50, p. 1-24. 1986.
- AUGUST, P. R.; GROSSMEN, T. H.; MINOR, C.; DRAPER, M. P.; MACNEIL, I. A.; PEMBERTON, J. M.; CALL, K. M.; HOLT, D.; OSBURNE, M. S. Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. n. 2, v. 4; p. 513-519. 2000.
- BARRETO, E. S.; TORRES, A. R.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, A. T. R.; ASTOLFI-FILHO, S.; HUNGRIA, M. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 35: 783-790. 2008.
- BATES, S. L.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**. v. 23, n. 1, p. 57-62. 2005.
- BAUMGARTNER, P.; HARPER, K.; RAEMAEEKERS, R. J. M.; DURIEUX, A.; GATEHOUSE, M. R.; DAVIES, H.; TAYLOR, M. Large-scale production and purification of recombinant *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**. vol. 25, 1291-1285. 2003.
- BAUMGARTNER, P.; RAEMAEEKERS, R. J. M.; DURIEUX, A.; GATEHOUSE, A.; DAVIES, H.; TAYLOR, M. Large-scale production, purification, and characterization of recombinant *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin E-form expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. vol. 26, 394-405. 2002.

- BAUMGARTNER, S.; MARTIN, D.; HAGIOS, C.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Ten-m, a *Drosophila* gene related to tenascin, is a new pair-rule gene. **The EMBO Journal**. 13, 3728-3740. 1994.
- BEZERRA, W. M. **Expressão da ConBr em *Pichia pastoris***. 2004. 44 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2004.
- BEZERRA, W. M.; CARVALHO, C. P. S.; MOREIRA, R. A.; GRANGEIRO, T. B. Establishment of a heterologous system for the expression of *Canavalia brasiliensis* lectin: a model for the study of protein splicing. **Genetics and Molecular Research**. 5 (1): 216-223. 2006.
- BOWEN, D.; ROCHELEAU, T. A.; BLACKBURN, M.; ANDREEV, O.; GOLUBEVA, E.; BHARTIA, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Science**. v. 28, p. 2129-2134. 1998.
- BROMBERG, N.; DURÁN, N. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. **Journal of Molecular Catalysis**. v. 11; p. 463-467. 2001.
- CALDAS, L. R.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, S. M.; TYRRELL, R. M. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. In: International Symposium on Current Tropics Radiology and Photobiology. **Anais of the International Symposium on Current Tropics Radiology and Photobiology 1978**, Rio de Janeiro/Brasil, pp 121-132. 1978.
- CARIS, M. E.; PORTO, L. M.; HAUCK, P.; ANTÔNIO, R. V. Produção de Desoxiviolaceína pela *Chromobacterium violaceum*. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações – **Anais do SINAFERM 2003**, Florianópolis/SC. 2003.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**. 40: 1515-1539. 2002.
- CARVALHO, C. P. S. **Clonagem e expressão do gene da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em *Pichia pastoris* e *Nicotiana tabacum***. 2004. 145 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2004.
- CASTLE, L. A.; WU, G.; McELROY, D. Agricultural input traits: past, present and future. **Current Opinion in Biotechnology**. 17(2): 105-12. 2006.

- CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**. vol. 13, 329–332. 2002.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**. vol. 24, 45-66. 2000.
- CHOI, J. H.; JEONG, K. J.; KIM, S.C.; LEE, S. Y. Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53: 640-645. 2000.
- CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 876-885, 2006.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**. 16: 23-52. 2000.
- DRABIKOWSKI, K.; TRZEBIATOWSKA, A.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Ten-1, an essential gene for germ cell development, epidermal morphogenesis, gonad migration, and neuronal pathfinding in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, 282, 27–38. 2005.
- DURÁN, N., ANTONIO, R.V., HAUN, M.; PILLI, R. A. Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 10: 686–690. 1994.
- DURÁN, N.; MENCK, F. M. *Chromobacterium violaceum*: A review of pharmacological and industrial perspectives. **Clinical Reviews in Microbiology**. v. 27, n. 3; p. 201-222. 2001.
- FÉLIX, W. P. **Produção heteróloga de frutalina em *Pichia pastoris***. 2008. 107 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2008.
- FERRO, D. N.; SLOCOMBE, A. C.; MERCIER, C. T. Colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae): residual mortality and artificial weathering of formulated *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis. **Journal of Economic Entomology**. 90: 574-582. 1997.
- FITCHES, E.; WOODHOUSE, S. D.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia*

*ensifformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**. 47: 777– 787. 2001.

FOSTER, S. J. Molecular analysis of three major wall-associated proteins of *Bacillus subtilis* 168: evidence for processing of the product of a gene encoding a 258 kDa precursor two-domain ligand-binding protein. **Molecular Microbiology**. 8, 299-310. 1993.

FREIRE, E. A. **Proteínas inseticidas de *Chromobacterium violaceum*: clonagem e expressão do gene CV1887 em *Escherichia coli* e avaliação de sua atividade contra *Callosobruchus maculatus***. 2007. 145 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.

GELLISSSEN, G.; HOLLENBERG, C.P. - Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. **Gene**. vol. 190, 87-97. 1997.

GRANGEIRO, T. B.; JORGE, D. M. M.; BEZERRA, W. M.; VASCONCELOS, A. T. R.; SIMPSON, A. J. G. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Genetics and Molecular Research**. 3 (1): 117-133. 2004.

GUO, L.; FATIG III, R. O.; ORR, G. L.; SCHAFFER, B. W.; STRICKLAND, J. A.; SUKHAPINDA, K.; WOODSWORTH, A. T.; PETELL, J. K. *Photobacterium luminescens* W-14 insecticidal activity consists of at least two similar but distinct proteins - purification and characterization of toxin a and toxin b. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 274, (14) 9836-9842. 1999.

GURKAN, C.; ELLAR, D. J. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**. 4:2033. 2005.

HARMSSEN, D., SINGER, C. *Chromobacterium violaceum* strain DMS 30191 16S and 23S ribosomal RNA genes. **NCBI Nucleotide**. AF124618; AJ247211. 1999.

HENNING, A. A. **Patologia de Sementes**. 1. ed. Londrina: Embrapa Soja. v. 1. 43 p. 1997.

HILEMAN, R. E.; FROMM, J. R.; WEILER, J. M.; LINHARDT, R. J. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. **BioEssays**. 20, 156-167. 1989.

HILL, C. W.; FEULNER, G.; BRODY, M. S.; ZHAO, S.; SADOSKY, A. B.; SANDT, C. H. Correlation of Rhs elements with *Escherichia coli* population structure. **Genetics**. 141:15–24. 1995.

- HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**. 53(2):242-55. 1989.
- JANN, B.; JANN, K. Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. **Current topics in microbiology and immunology**. 150, 19-42. 1990.
- JOLLY, J. C.; LEUNG, W. S.; SWARTZ, J. R. Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95: 2773-2777. 1998.
- KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**. 38: 181-206. 1993.
- KIM, Y. C.; JUNG, H.; KIM, K. Y.; PARK, S. K. An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. **European Journal of Plant Pathology**. 120:373–382. 2007.
- KNOWLES, B. H.; BLATT, M. R.; TESTER, M.; HORSNELL, J. M.; CARROLL, J.; MINISTRINA, G.; ELLAR, D. J. A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis israelensis*. **FEBS Letters**. 244, pp. 259–262. 1989.
- KOLIBACHUK, D., DENNIS, D. SoxR homolog [*Chromobacterium violaceum*]. **NCBI-Protein** AAC69613; AF061445 (1998).
- LAEMMLI, U. K. – Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. vol. 22, 680-685. 1970.
- LEE, N. **Molecular Aspects of ara Regulation**. In MILLER, J. H.; REZNIKOFF, W. S. **The Operon**. Cold Spring Harbor Lab. Press.1980.
- LEE, N.; FRANCKLYN, C.; HAMILTON, E. P. Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI2* activates the araBAD operon promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 84, 8814-8818. 1987.
- LEE, P. J.; AHN, J. Y.; KIM, Y. H.; KIM, S. W.; KIM, J. Y.; PARK, J. S.; LEE, J. Cloning and heterologous expression of a novel insecticidal gene (tccC1) from *Xenorhabdus nematophilus* strain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. n. 319, p. 1110-1116. 2004.



- LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E. A.; JORGE, D. M. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornate* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**. 1724: 137 – 145. 2005.
- LEON, L. L., MIRANDA, C. C., SOUZA, A. O., DURÁN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 48(3): 449-50. 2001.
- LEVINE, A.; WEISS, C.; WIDES, R. Expression of the pair-rule gene *odd oz* (*odz*) in imaginal tissues. **Developmental Dynamics**. 209, 1-14. 1997.
- LUO, S.; ZHANGSUN, D.; TANG, K. Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 69, p. 184-191, 2005.
- MACEDO, M. L. CASTRO, M. M.; FREIRE, M. G. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 56: 84– 96. 2004.
- MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARAGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**. 1571: 83– 88. 2002.
- MADZAK, C.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J.M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. **Jornal of Biotechnology**. vol. 109, 63-81. 2004.
- MARTIN, P. A. W.; BLACKBURN, M.; SHROPSHIRE, A. S. Two new bacterial pathogens of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**. 97: 774-780. 2004.
- MARTIN, P. A. W.; GUNDERSEN-RINDAL, D.; BLACKBURN, M.; BUYER, J. *Chromobacterium subtsugae* sp. Nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 57: 993-999. 2007a.
- MARTIN, P. A. W.; HIROSE, E.; ALDRICH, J. R. – Toxicity of *Chromobacterium subtsugae* to southern green bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm

- (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**. 100 (3): 680-684. 2007b.
- MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURÁN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in fibroblast cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**. 36: 539–543. 2000.
- METTANOVICH, D.; GASSER, B.; HOHENBLUM, H.; SAUER, M. Stress in recombinant protein producing yeasts. **Journal of Biotechnology**. 113: 121-135. 2004.
- MIDDELBERG, A. P. J. Preparative protein refolding. **Trends in Biotechnology**. vol. 20, n 10, p. 437- 443. 2002.
- MINET, A. D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Phylogenetic analysis of teneurin genes and comparison to the rearrangement hot spot elements of *E. coli*. **Gene**. 257: 87–97. 2000.
- MINET, A. D.; RUBIN, B. P.; TUCKER, R. P.; BAUMGARTNER, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *ten-m*, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. **Journal of Cell Science**. 112, 2019–2032. 1999.
- MORGAN, J.A.; SERGEANT, M.; ELLIS, D.; OUSLEY, M.; JARRETT, P. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. **Applied and Environmental Microbiology**. 67 (5), 2062-2069. 2001.
- NEPOMUCENO, D. R. **Clonagem e expressão de uma lectina de *Artocarpus incisa* L. (frutalina) em *Escherichia coli***. Fortaleza, 2008. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 95 p.
- OWUAMA C. I. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. vol. 17, no5, pp. 505-515. 2001.
- PERLAKJ, F. J. Genetically improved potato protection from damage by Colorado potato beetle. **Plant Molecular Biology**. v. 22, p. 313-321. 1993.
- ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. – Foreign gene expression in yeast – A review. **Yeast**. vol. 8, 432-488. 1992.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory Manual**. 2ª ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989.

- SANTOS, J. H. R. **Aspectos da biologia do *Callosobruchus maculatus* sobre sementes de *Vigna sinensis***. 1971. (Dissertação de Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP. p. 05, 1971.
- SAUVION, N.; NARDON, C.; FEBVAY, G.; GATEHOUSE, A. M.; RAHBE, Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**. 50:1137– 1150. 2004.
- SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 442-453, 2004.
- SERGEANT, M., JARRETT, P., OUSLEY, M.; MORGAN, J. A. W. Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(6): p. 3344–3349. 2003.
- SHADEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 307:249–264. 2008.
- SHARMA, S. K. – On the recovery of genetically engineered proteins from *Escherichia coli*. **Separation Science and Technology**. vol. 21, n. 8, 701-726. 1986.
- SHIRATA, A.; TSUKAMOTO, T.; YASUI, H.; HAYASAKA, S.; KOJIMA, A.; KATO, H. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. **Japan Agricultural Research Quarterly**. 34: 131-140. 2000.
- SOUZA, A. O.; AILY, D. C. G.; SATO, D. N.; DURÁN, N. Atividade da violaceína in vitro sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, Brasil, v. 58, n. 1, p. 59-62. 1999.
- STEINBÜCHEL, A.; DEBZI, E. M.; MARCHESSAULT, R. H.; TIMM, A. Synthesis and production of poly (3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 39: 443–449. 1993.
- TAMÁS, L.; SHEWRY, P. R. Heterologous expression and protein engineering of wheat gluten proteins. **Journal of Cereal Science**. 43: 259-274. 2006.
- TUCKER, R. P.; KENZELMANN, D.; TRZEBIATOWSKAB, A.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: Transmembrane proteins with fundamental roles in

development. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 39: 292–297. 2007.

UEDA, H.; NAKAJIMA, H.; HORI, Y.; GOTO, T.; OKUHARA, M. Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. **Biosciences, Biotechnology, and Biochemistry**. 58, 1579–1583. 1994.

VASCONCELOS, A. T. R.; ALMEIDA, D. F.; HUNGRIA, M.; GUIMARÃES, C. T.; ANTÔNIO, R. V.; ALMEIDA, F. C.; ALMEIDA, L. G. P.; ALMEIDA, R.; ALVES-GOMES, J. A.; ANDRADE, E. M.; ARARIPE, J.; ARAÚJO, M. F. F.; ASTOLFI, S.; AZEVEDO, V.; BAPTISTA, A. J.; BATAUS, L. A. M.; BATISTA, J. D.; BELO, A.; VAN DEN BERG, C.; BOGO, M.; BONATTO, S.; BORDIGNON, J.; BRÍGIDO, M. M.; BRITO, C. A.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CARDOSO, D. D.; CARNEIRO, N. P.; CAVADA, B. S.; CHUEIRE, L. M. O.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CUNHA, N. C.; FAGUNDES, N.; FALCÃO, C. L.; FANTINATTI, F.; FARIAS, L. P.; FELIPE, M. S. S.; FERRARI, L. P.; FERRO, J. A.; FERRO, M. T.; FRANCO, G. R.; FREITAS, N. S. A.; FURLAN, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; GOMES, E. A.; GONÇALVES, P. R.; GRANGEIRO, T. B.; GRATTAPAGLIA, D.; GRISARD, E. C.; HANNA, E. S.; JARDIM, S. N.; LAURINO, J.; LEOI, L. C. T.; LIMA, L. F. A.; LOUREIRO, M. D.; LYRA, M. D. C. P.; MADEIRA, H. M. F.; MANFIO, G. P.; MARANHÃO, A. Q.; MARTINS, W. S.; DI MAURO, S. M. Z.; MEDEIROS, S. R. B.; MEISSNER, R. D.; MOREIRA, M. A. M.; NASCIMENTO, F. F.; NICOLAS, M. F.; OLIVEIRA, J. G.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXÃO, R. F. C.; PARENTE, J. A.; PEDROSA, F. D. P.; PENA, S. D. J.; PEREIRA, J. O.; PEREIRA, M.; PINTO, L. S. C.; PINTO, L. S.; PORTO, J. I. R.; POTRICH, D. P.; RAMALHO-NETO, C. E.; REIS, A. M. M.; RIGO, L. U.; RONDINELLI, E.; SANTOS, E. B. P.; SANTOS, F. R.; SCHNEIDER, M. P. C.; SEUANEZ, H. N.; SILVA, A. M. R.; SILVA, A. L. D.; SILVA, D. W.; SILVA, R.; SIMÕES, I. D.; SIMON, D.; SOARES, C. M. D.; SOARES, R. D. A.; SOUZA, E. M.; SOUZA, K. R. L.; SOUZA, R. C.; STEFFENS, M. B. R.; STEINDEL, M.; TEIXEIRA, S. R.; URMENYI, T.; VETTORE, A.; WASSEM, R.; ZAHA, A.; SIMPSON, A. J. G. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100 (20): 11660-11665. 2003.

VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA J.T. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**. 44(4):385-403. 2004.

VODOVAR, N.; VALLENET, D.; CRUVEILLER, S.; ROUY, Z.; BARBE, V.; ACOSTA, C.; CATTOLICO, L.; JUBIN, C.; LAJUS, A.; SEGURENS, B.; VACHERIE, B.; WINCKER, P.; WEISSENBAACH, J.; LEMAITRE, B.; MEDIGUE, C.; BOCCARD, F. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. **Nature Biotechnology**. 24(6):673-9. 2006.

- VOLNER, A.; SAM, M.; HAN, A. Y. *Chromobacterium violaceum* phenylalanine hydroxylase: Cloning, purification, and iron-dependent catalysis. **Abstracts of papers - American Chemical Society**. 219, U848-U848. 2000.
- WARNER, S. A. J. **Genomic DNA isolation and Lambda Library construction**. In: FOSTER, G.D.; TWELL, D. - **Plant Gene Isolation. Principles and Practice**. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England. 1996. p 51-73.
- WEITZMAN, S.; SCOTT, V.; KEEGSTRA, K. Analysis of glycopeptides as borate complexes by polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**. 97, 438-449. 1979.
- YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**. 127: 335-347. 2007.
- ZHAO, S.; SANDT, C. H.; FEULNER, G.; VLAZNY, D. A.; GRAY, J. A.; HILL, C. W. Rhs elements of *Escherichia coli* K-12: Complex composites of shared and unique components that have different evolutionary histories. **Journal of Bacteriology**. 175, 2799-2808. 1993.