

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Produção Heteróloga de Violaceína por**  
*Escherichia coli*

**ANDRÉ LUIS RODRIGUES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Santa Catarina como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA/UFSC)  
Co-orientador: Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima (CTTMar/UNIVALI)

**Florianópolis-SC**  
**2007**

**André Luis Rodrigues**

**Produção Heteróloga de Violaceína por *Escherichia coli***

**Área de Concentração**  
**Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Orientador

---

Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima  
Co-Orientador

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Banca examinadora:**  
**Florianópolis - SC, julho de 2007**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto - presidente (orientador)

---

Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima - co-orientador

---

Profª. Dra. Regina Vasconcellos Antônio - membro interno

---

Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti - membro externo

Rodrigues, André Luis

**Produção Heteróloga de Violaceína por *Escherichia coli***  
**120 p.**

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Violaceína - 2. Expressão heteróloga - 3. *Escherichia coli* -  
4. *Chromobacterium violaceum*

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica, e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLAB) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e nos Laboratórios de Genética Molecular, e Biotecnologia Básica do Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar da Universidade do Vale do Itajaí.

Dedico este trabalho aos meus pais e a Deus

## **Agradecimentos**

---

Agradeço aos professores, colegas, amigos, à minha namorada e família pelo apoio e amizade; e ao CNPq pelo apoio financeiro.

# Sumário

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>2</b>
1.1. Introdução e Motivação .....	2
1.2. Justificativa.....	4
<b>CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
2.1. Objetivos Gerais .....	5
2.2. Objetivos Específicos .....	5
<b>CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
3.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	6
3.1.1. Aspectos gerais.....	6
3.1.2. Produção de violaceína por <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	8
3.2. Produção Heteróloga de Violaceína por <i>Escherichia coli</i> .....	11
3.3. Promotor <i>araBAD</i> .....	15
3.3.1. Regulação da transcrição do operon <i>araBAD</i> .....	17
3.3.2. Aplicações do promotor P <sub>BAD</sub> .....	18
3.4. Linguagem de Programação Perl.....	19
<b>CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1. Procedimentos Computacionais .....	21
4.1.1. Obtenção das seqüências nucleotídicas .....	21
4.1.2. Determinação dos sítios de restrição presentes no plasmídio e no operon <i>vioABCD</i> .....	22
4.1.3. Busca por sítios de restrição parcialmente conservados no operon <i>vioABCD</i> ...	23
4.1.4. Desenho de iniciadores para clonagem direcional do operon <i>vioABCD</i> e do gene <i>vioE</i> .....	23
4.2. Procedimentos Experimentais .....	24
4.2.1. Amplificação do operon <i>vioABCD</i> por PCR.....	24
4.2.2. Extração de plasmídios.....	25
4.2.3. Digestão enzimática do amplicon <i>vioABCD</i> e do plasmídio pBADMycHisB...	27
4.2.4. Ligação enzimática do amplicon <i>vioABCD</i> ao plasmídio pBADMycHisB .....	28
4.2.5. Transformação da <i>E. coli</i> DH10B com o produto da ligação do amplicon <i>vioABCD</i> ao plasmídio pBADMycHisB (plasmídio pBvioABCD).....	29
4.2.6. Extração, digestão enzimática e desfosforilação do plasmídio pBvioABCD ....	30
4.2.7. Amplificação e digestão enzimática do gene <i>vioE</i> .....	31

4.2.8. Ligação do gene <i>vioE</i> ao plasmídio pBvioABCD e transformação da <i>E. coli</i> DH10B.....	32
4.2.9. Determinação do meio de cultura e da concentração de L-arabinose para indução da produção de violaceína em <i>Escherichia coli</i> TOP10 (pBvioABCDE).....	33
4.2.10. Avaliação da instabilidade da produção de violaceína por <i>E. coli</i> .....	34
4.2.11. Avaliação da instabilidade do plasmídio pBvioABCDE em <i>E. coli</i> TOP10.....	36
4.2.12. Análise da violaceína produzida por <i>E. coli</i> TOP10 (pBvioABCDE).....	37
4.2.13. Cinética de crescimento e produção de violaceína em <i>Escherichia coli</i> TOP10 (pBvioABCDE).....	39
<b>CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>40</b>
5.1. Procedimentos Computacionais .....	40
5.1.1. Determinação dos sítios de restrição presentes no plasmídio pBADMyHisB e no operon <i>vioABCD</i> .....	40
5.1.2. Busca por sítios de restrição parcialmente conservados.....	40
5.1.3. Desenho de iniciadores para clonagem direcional do operon <i>vioABCD</i> no plasmídio pBADMyHisB .....	43
5.1.4. Desenho de iniciadores para clonagem do gene <i>vioE</i> no plasmídio pBvioABCD .....	44
5.2. Procedimentos Experimentais .....	47
5.2.1. Amplificação do operon <i>vioABCD</i> por PCR.....	47
5.2.2. Obtenção do plasmídio pBvioABCD.....	48
5.2.3. Clonagem do gene <i>vioE</i> .....	54
5.2.4. Determinação do meio de cultura e da concentração de L-arabinose para indução da produção de violaceína em <i>Escherichia coli</i> TOP10 (pBvioABCDE).....	59
5.2.5. Avaliação da instabilidade da produção de violaceína em <i>E. coli</i> TOP10 (pBvioABCDE).....	61
5.2.6. Avaliação da instabilidade do plasmídio pBvioABCDE em <i>E. coli</i> TOP10.....	69
5.2.7. Análise da violaceína produzida por <i>E. coli</i> TOP10 (pBvioABCDE).....	72
5.2.8. Cinética de crescimento e produção de violaceína em <i>Escherichia coli</i> TOP10 (pBvioABCDE).....	74
<b>CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>87</b>
7.1. Seqüência Nucleotídica do Plasmídio pBADMyHisB .....	87
7.2. Operon <i>vioABCD</i> da Bactéria <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 .....	87
7.3. Gene <i>vioE</i> da Bactéria <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472.....	88
7.4. Determinação dos Sítios de Restrição Presentes no Plasmídio e no Operon <i>vioABCD</i> .....	88
7.5. Busca por Sítios de Restrição Parcialmente Conservados no Operon <i>vioABCD</i> .....	89
7.6. Programa para Localização de Sítios de Restrição Parcialmente Conservados .....	90

7.7. Avaliação dos Quadros Abertos de Leitura .....	97
7.8. Desenho de Iniciadores para Clonagem Direcional do Operon <i>vioABCD</i> e do Gene <i>vioE</i> .....	99
7.9. Meios de Cultura e Soluções .....	102
7.9.1. Meio de cultura LB.....	102
7.9.2. Soluções de ampicilina e L-arabinose.....	102
7.9.3. Solução tampão TEB.....	103
7.10. Obtenção de Células Competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	103
7.11. Procedimentos de Transformação .....	104
7.12. Eletroforese em Gel de Agarose.....	104

## Índice de Figuras

---

- Figura 1. Estrutura química da violaceína. Modificado a partir de Antonio e Creczynski-Pasa (2004). ..... 9
- Figura 2. Esquema da via metabólica de biossíntese da violaceína proposta por August *et al.* (2000). Figura obtida a partir de Oliveira (2006). ..... 12
- Figura 3. Via metabólica de biossíntese da violaceína proposta por Sanchez *et al.* (2006). O grupamento R na molécula de ácido 3-indol pirúvico corresponde a um grupamento imina ou cetona. O *1,2 shift* indicado pelo \* consiste na alteração de uma das moléculas de ácido 3-indol pirúvico indicada pelos carbonos marcados com ● e ■ na prodeoxiviolaceína. .... 14
- Figura 4. Via metabólica de biossíntese da violaceína proposta por Balibar e Walsh (2006). ..... 16
- Figura 5. Mecanismo de controle da transcrição do operon *araBAD* e do gene *araC*. A) Conformações da proteína AraC. B) Organização do operon *araBAD* e do gene *araC* em *E. coli*. C) Promotores P<sub>BAD</sub> e P<sub>C</sub> nas formas reprimidas e ativas. Ilustração modificada a partir de Moat *et al.* (2002). ..... 18
- Figura 6. Plasmídio pBADMycHisB. .... 21
- Figura 7. Esquema do experimento de repiques em meio sólido. Todos os repiques foram realizados em meio de cultura LB sólido suplementado com ampicilina 100 µg/mL. Nas culturas induzidas foi adicionado L-arabinose 0,01% (m/v) ao meio de cultura. No primeiro repique, a cultura inóculo da bactéria *Escherichia coli* (pBvioABCDE) (tratamento 1) foi inoculada nos tratamentos 2 e 3, e estes foram incubados por 24 h a 37°C. No segundo repique, a cultura do tratamento 2 foi inoculada no tratamento 4, e a cultura do tratamento 3 foi inoculada nos tratamentos 5 e 6. Os tratamentos inoculados foram incubados por 24 h a 37°C. No terceiro repique a cultura do tratamento 4 foi inoculada nos tratamentos 7 e 8, a cultura do tratamento 5 foi inoculada no tratamento 9 e a cultura do tratamento 6 foi inoculada no tratamento 10. Os tratamentos inoculados foram incubados por 24 h a 37°C. 37
- Figura 8. Resultados da busca pelo sítio de restrição ggtacc da enzima *KpnI* na seqüência de DNA contida no gene *vioA* e região à montante. Foram encontrados quatro sítios com mutações em duas posições. .... 41
- Figura 9. Resultados da avaliação dos quadros abertos de leitura do gene *vioA* e do plasmídio pBvioABCD. A avaliação dos quadros de leitura foi realizada por meio do alinhamento da proteína VioA codificada pelo gene *vioA* intacto e da codificada pelo plasmídio pBvioABCD. O primeiro aminoácido do gene *vioA* foi substituído no pBvioABCD e cinco aminoácidos foram adicionados na região à montante deste gene. As seqüências marcadas em cinza indicam que a partir do segundo aminoácido do gene *vioA*, as seqüências protéicas do pBvioABCD e do gene *vioA* utilizam o mesmo quadro de leitura. A seta indica o aminoácido inicial do gene *vioA* no pBvioABCD. .... 42

- Figura 10. Plasmídio pBvioABCD. Este plasmídio foi criado pela ligação dos genes *vioABCD* ao plasmídio pBADMycHisB. .... 43
- Figura 11. Plasmídio pBvioABCDE. Este plasmídio foi obtido pela ligação do gene *vioE* ao plasmídio pBvioABCD. .... 46
- Figura 12. Gel de eletroforese dos produtos das reações de PCR do operon *vioABCD*. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. Os tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem às reações de PCR realizadas com iniciadores externos em temperaturas de extensão de 68, 69,6, 71,3, 72,8 e 74,1°C, respectivamente. O tratamento 6 é o produto da PCR com iniciadores internos. .... 48
- Figura 13. Gel de eletroforese do operon *vioABCD* e do plasmídio pBADMycHisB. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. 1) Operon *vioABCD* digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI*. 2) Plasmídio pBADMycHisB digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI*. .... 49
- Figura 14. Gel de eletroforese dos produtos das reações de digestão dos plasmídios extraídos dos microrganismos transformantes com as ligações do operon *vioABCD* ao plasmídio pBADMycHisB. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. 1-6) Colônias transformantes. Os microrganismos transformantes dos quais foram extraídos os plasmídios estão ordenados em ordem crescente de diâmetro de colônias nas colunas 1-6. .... 51
- Figura 15. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *vioC* a partir do DNA dos plasmídios transformantes com a ligação do operon *vioABCD* ao plasmídio pBADMycHisB. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. 1-3) Plasmídio da coluna 1 da Figura 14 utilizado como DNA molde. 4-6) Plasmídio da coluna 2 da Figura 14 utilizado como DNA molde. 7) Controle positivo. .... 52
- Figura 16. Esquema ilustrando as regiões que foram seqüenciadas no plasmídio a partir do qual foi possível a amplificação do gene *vioC*. .... 53
- Figura 17. Gel de eletroforese do produto da amplificação do operon *vioABCD* a partir do plasmídio seqüenciado. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. 1) Plasmídio seqüenciado utilizado como DNA molde na PCR. 2) Controle positivo. .... 54
- Figura 18. Gel de eletroforese do plasmídio pBvioABCD e do amplicon *vioE*. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. 1) Plasmídio pBvioABCD digerido com *KpnI*. 2) Amplicon *vioE*. .... 55
- Figura 19. Colônias transformantes da bactéria *E. coli* DH10B com o plasmídio resultante da ligação do gene *vioE* ao plasmídio pBvioABCD (tratamento 1:2 (vetor:inserto) cultivado em meio suplementado com 0,001% (m/v) de L-arabinose). .... 56
- Figura 20. Resultado da transformação da bactéria *E. coli* TOP10 com o plasmídio pBvioABCDE em meio de cultura LB contendo 0,01% (m/v) de L-arabinose e 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. .... 58

- Figura 21. Avaliação do meio de cultura e concentração de indutor para a produção de violaceína em *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE). (—■—) Meio LB + 1% (v/v) de glicerol. (—▲—) Meio LB. As culturas foram incubadas por 20 h a 37°C e 150 rpm..... 59
- Figura 22. Avaliação da influência da concentração de glicerol na produção de violaceína por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio LB contendo 1% (m/v) de L-arabinose..... 61
- Figura 23. Fenótipo das colônias de *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivadas em meio de cultura LB suplementado com L-arabinose. A) Colônias observadas a olho nu. B) Colônias observadas ao microscópio óptico. As colônias numeradas de 1-4 representam as colônias classificadas como escuras; de 5-18 como colônias mistas; e de 19-20 como brancas..... 62
- Figura 24. Influência da concentração de indutor e dos repiques na produção de violaceína e na morfologia das colônias. As barras em cores ■, ■ e □ representam as UFC com colorações escura, mista e branca, respectivamente. ▲ representa a concentração de violaceína das culturas que foram avaliadas quanto à pigmentação das UFC. A) Meio de cultura sem suplementação de L-arabinose. B) Meio de cultura suplementado com L-arabinose 0,001% (m/v). C) Meio de cultura suplementado com L-arabinose 1% (m/v). ... 63
- Figura 25. Resultados do experimento de repiques em meio de cultura sólido. A) As características dos fenótipos observados nas culturas são indicadas pelos sinais -, +, \*, \*\*, #a e #b associados ao respectivo tratamento. B) Características das culturas obtidas nos diferentes tratamentos. Os sinais -, +, \*, \*\*, #a e #b indicados nas figuras, referem-se aos sinais associados aos números dos tratamentos em A. Os sinais + e - indicam os tratamentos onde ocorreram produção e ausência de produção de violaceína, respectivamente. No tratamento indicado pelo sinal \*, o início da estria de diluição apresentou ausência de produção de violaceína e a região final da estria apresentou colônias produtoras e colônias não produtoras de violaceína. O tratamento indicado pelo sinal \*\* apresentou produção de violaceína reduzida em relação aos tratamentos +. Os inóculos dos tratamentos contendo os sinais #a e #b foram obtidos a partir das regiões indicadas pelas setas branca e cinza da figura indicada pelo sinal \*, respectivamente. O tratamento indicado pelo sinal #a apresentou ausência de produção de violaceína no início da estria de diluição e produção na região final da estria. O tratamento indicado pelo sinal #b apresentou uma pequena região não produtora de violaceína no início da estria de diluição, e no restante da cultura observou-se uma população mista de colônias brancas, esverdeadas e escuras..... 66
- Figura 26. Resultados do experimento de repiques em meio de cultura líquido. O inóculo foi obtido a partir de uma cultura da bactéria *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio de cultura LB suplementado com ampicilina. Este foi inoculado em meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina e L-arabinose, e cultivado por 24 h a 37°C a 150 rpm. Este primeiro repique foi utilizado para inocular o segundo repique no mesmo meio de cultura e com as mesmas condições de cultivo, e assim sucessivamente foram realizados repiques utilizando a cultura anterior como inóculo. Dessa forma foram obtidos quatro repiques. Foi verificada a formação de pigmentos somente na cultura obtida no primeiro repique. .... 70

- Figura 27. Gel de eletroforese do plasmídeo pBvioABCDE digerido com a enzima de restrição *RsaI*. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ *HindIII*. 1) Plasmídeo pBvioABCDE digerido com a enzima *RsaI*, extraído a partir da cultura inóculo da bactéria *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio de cultura LB suplementado com ampicilina. 2) Plasmídeo pBvioABCDE digerido com a enzima *RsaI*, extraído a partir da cultura obtida no quarto repique da bactéria *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina e L-arabinose. .... 71
- Figura 28. Cromatografia de camada delgada em sílica gel G60 do extrato de violaceína produzida por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE). Foi utilizado metanol 99,9% (v/v) como eluente..... 73
- Figura 29. Espectro de UV-VIS do extrato bruto da violaceína extraída da *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE). ..... 73
- Figura 30. Culturas avaliadas no experimento de análise cinética de crescimento e produção de violaceína em *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE). A) Adição de L-arabinose na quinta hora de cultivo. B) Sem adição de L-arabinose. C) Adição de L-arabinose no início do cultivo. 74
- Figura 31. Cinética de crescimento e produção de violaceína para *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio de cultura LB suplementado com 3% (m/v) de glicerol e 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. A) Tratamento sem suplementação de L-arabinose. B) Tratamento com suplementação de 1% (m/v) de L-arabinose a partir da quinta hora de cultivo. C) Tratamento com suplementação de 1% (m/v) de L-arabinose desde o início da cultura. Os símbolos ■ e ♦ representam a massa seca e a concentração de violaceína, respectivamente. .... 75

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1. Sítios de restrição parcialmente conservados localizados pelo programa desenvolvido.....	41
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos obtidos para os iniciadores adiante e reverso selecionados para a amplificação dos genes <i>vioABCD</i> . .....	44
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos dos iniciadores desenhados para a amplificação do gene <i>vioE</i> . .....	45
Tabela 4. Resultados da transformação da <i>E. coli</i> DH10B com o plasmídio resultante da ligação do gene <i>vioE</i> ao plasmídio pBvioABCD. ....	56

## Resumo

---

RODRIGUES, André Luis. **Produção Heteróloga de Violaceína por *Escherichia coli***. 2007. 120p. Dissertação de Mestrado – Pós-graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

A violaceína é um pigmento formado pela união de duas moléculas modificadas do aminoácido L-triptofano. Este pigmento apresenta propriedades interessantes como tripanocida e antitumoral. Dentre os microrganismos produtores de violaceína encontra-se a bactéria *Chromobacterium violaceum*. Os genes necessários à síntese de violaceína em *C. violaceum* estão organizados em um operon conhecido como *vioABCDE*. A clonagem e expressão dos genes *vioABCDE* de *C. violaceum* sob controle do promotor *araBAD* foi realizada em *Escherichia coli* visando avaliar a estabilidade, rendimento e produtividade da produção heteróloga de violaceína neste microrganismo. Os resultados indicam que um dos fatores responsáveis pela instabilidade da produção de violaceína em *E. coli* está relacionado às alterações que podem ser causadas aos genes *vioABCDE* devido à produção desta molécula. Apesar da instabilidade observada, foi possível a obtenção de um rendimento e produtividade de violaceína bruta de 22,06 mg/gMS e 10,71  $\mu\text{mol/gMS}\cdot\text{h}$ , respectivamente.

## Abstract

---

RODRIGUES, André Luis. **Heterologous production of violacein in *Escherichia coli***. 2007. 120p. Dissertation (Masters Degree in Chemical Engineering) – Post-Graduation Program in Chemical Engineering, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

Violacein is a pigment formed by the condensation of two modified tryptophan molecules. This pigment presents interesting properties such as antitumoral and trypanocidal activities. Among the violacein producers is the bacterium *Chromobacterium violaceum*. Violacein biosynthesis in *C. violaceum* is controlled by five genes organized in an operon known as *vioABCDE*. Aiming to evaluate stability, yield and productivity of heterologously produced violacein, the *vioABCDE* operon was cloned under control of *araBAD* promoter and expressed in *Escherichia coli*. The results indicate one of the factors that mediates violacein production instability in *E. coli* are mutations that occur in the *vioABCDE* genes during violacein production. In spite of observed instability, it was possible to achieve yield and productivity for crude violacein production in shake flasks of 22.06 mg/gDW and 10.71  $\mu\text{mol/gDW}\cdot\text{h}$ , respectively.

# **CAPÍTULO 1 - Introdução, Motivação e Justificativa**

---

## **1.1. Introdução e Motivação**

A grande quantidade de recursos investidos em pesquisa visando o descobrimento de medicamentos reflete o interesse das empresas farmacêuticas em suprir a demanda por estes produtos. Um dos métodos utilizados para a descoberta de novas drogas consiste na avaliação da atividade biológica de compostos extraídos a partir de plantas, animais e microrganismos. Os compostos que apresentam atividades biológicas que podem ser úteis no combate a doenças são selecionados para a realização de novos estudos. Um dos objetivos destes estudos consiste na elucidação do mecanismo utilizado pelo composto para exercer uma dada atividade biológica de interesse. Dessa forma, é possível descobrir-se novos alvos para a criação de drogas específicas para o tratamento de doenças, além de avaliar se um dado composto pode ser utilizado como agente terapêutico. Compostos que apresentam efeitos colaterais podem então sofrer modificações de forma a apresentar somente a atividade necessária ao tratamento da doença.

A violaceína é um pigmento violeta que apresenta atividades biológicas como tripanocida e antitumoral. Devido às suas propriedades biológicas a violaceína tem sido estudada visando a elucidação dos seus mecanismos de ação. Para a realização destes estudos torna-se necessário o contínuo fornecimento desta molécula. Dessa forma, estudos vêm sendo realizados objetivando o melhoramento dos processos de produção do pigmento visando suprir as necessidades geradas na realização de pesquisas.

As metodologias de mutação e seleção de linhagens foram implementadas com sucesso no melhoramento de microrganismos para a produção de certos compostos. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante surgiram novas possibilidades para o melhoramento de microrganismos proporcionando avanços nos processos de produção. Esta tecnologia tornou possível a obtenção de produtos completamente novos, além de proporcionar um novo método para a obtenção de antigos produtos. Alguns trabalhos relatam a produção heteróloga de violaceína por meio da expressão de genes de *C. violaceum* em *Escherichia coli*. A realização de mutações e expressão dos genes

necessários à biossíntese de violaceína em *E. coli* demonstrou que alterações próximas da região promotora permitiam o surgimento de colônias com tamanho muito reduzido e com fenótipo fortemente escuro (August *et al.*, 2000). A interpretação destes resultados sugeriu que ocorreram mutações nas regiões responsáveis pelo controle da expressão dos genes de biossíntese da violaceína. Possivelmente, podem ter surgido mutantes constitutivos devido às alterações na região promotora, fato que poderia explicar o tamanho reduzido das colônias e sua intensa pigmentação. Sabe-se que a violaceína apresenta atividade antimicrobiana, logo, a expressão constitutiva dos genes necessários à biossíntese em *E. coli* pode ter inibido o crescimento normal das colônias devido à alta concentração deste pigmento na célula. Outra hipótese para a explicação do tamanho reduzido das colônias está ligada ao fato do gasto extra de energia e/ou metabólitos desviados para a produção de violaceína, culminando com a diminuição da disponibilidade destes para o crescimento celular.

O surgimento de colônias com tamanho reduzido e com fenótipo fortemente escuro sugere que se a bactéria *E. coli* é capaz de gerar altas concentrações intracelulares de violaceína de forma a inibir seu próprio crescimento, é interessante que este microrganismo seja estudado visando avaliar o rendimento e a produtividade deste pigmento por via heteróloga. Além disso, este estudo possibilitaria o esclarecimento de dúvidas quanto à inibição do crescimento normal das colônias durante a produção de violaceína, bem como quanto à instabilidade do fenótipo característico da produção de violaceína verificada em trabalhos anteriores. Avaliando sob o ponto de vista de obtenção de violaceína, o fato da produção heteróloga desta molécula culminar com a inibição do crescimento da *E. coli* poderia ser contornado pela utilização de promotores controláveis. Assim, torna-se possível a indução da produção de violaceína somente no momento apropriado, evitando-se o acúmulo intracelular desta molécula, fato que parece estar relacionado à instabilidade da produção em *E. coli*.

A bactéria *E. coli* é um dos microrganismos mais estudados, e este conhecimento contribui para a aplicação de ferramentas de engenharia metabólica, como a análise de fluxos metabólicos, visando o redirecionamento dos fluxos metabólicos para a otimização da produção de violaceína e/ou metabólitos intermediários da via de biossíntese deste pigmento. A obtenção de linhagens de *E. coli* com características otimizadas para produção

de violaceína poderia se tornar um meio alternativo de fornecimento desta molécula para a realização de estudos visando avaliar os seus potenciais terapêuticos.

## **1.2. Justificativa**

A violaceína é um pigmento muito estudado devido a suas diversas aplicações. Dentre as características interessantes que este pigmento apresenta, podem-se destacar as atividades bactericida, tripanocida, antifúngica, antiviral, antitumoral e sua potencial utilização como corante para nylon e outros materiais (Duran e Menck, 2001). Além disso, dois metabólitos intermediários na via metabólica de biossíntese da violaceína, o cromoviridans e desoxicromoviridans, apresentam capacidade de reter metais como ferro, cobre, zinco e cobalto. Esta propriedade poderia ser explorada visando o tratamento de regiões contaminadas por metais pesados. Todas estas características justificam a relevância dos estudos sobre a biossíntese da violaceína e seus intermediários.

## CAPÍTULO 2 - Objetivos

---

### 2.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho é a produção heteróloga de violaceína pela bactéria *Escherichia coli* utilizando os genes do operon *vio* provenientes da bactéria *Chromobacterium violaceum*.

### 2.2. Objetivos Específicos

Para atingir este objetivo, este trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Desenvolvimento de um programa em linguagem Perl para localização de sítios de restrição parcialmente conservados;
- Amplificação do operon *vioABCD* da bactéria *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472;
- Clonagem do operon *vioABCD* no plasmídio pBADMycHisB;
- Amplificação e clonagem do gene *vioE* no plasmídio pBvioABCD;
- Avaliação da estabilidade do plasmídio pBvioABCDE em *E. coli*;
- Avaliação da produção de violaceína pela bactéria *Escherichia coli* TOP10 (pBvioABCDE);

## **CAPÍTULO 3 - Revisão Bibliográfica**

---

### **3.1. *Chromobacterium violaceum***

#### **3.1.1. Aspectos gerais**

O primeiro relato da bactéria *Chromobacterium violaceum* ocorreu em 1882, quando Boisbaudran verificou a presença de um pigmento violeta em um preparado à base de farinha (Boisbaudran, 1882). Apesar de publicado somente em 1882, a descoberta de Boisbaudran foi feita em 1867. Independentemente, Bergonzini descobriu por acidente, em 1880, o surgimento de uma coloração violeta em uma solução controle de ovoalbumina bovina que não havia sido descartada após um experimento (Duran e Menck, 2001). Após a realização de testes, verificou-se que a coloração violeta na solução surgiu por meio do crescimento de um microrganismo ainda desconhecido, o qual foi chamado de *Cromobacterium violaceum* (Bergonzini, 1881). Posteriormente, em 1881 Zimmerman (1881) alterou o termo *Cromobacterium* para *Chromobacterium* o qual é utilizado atualmente. No Brasil o primeiro relato da bactéria *C. violaceum* ocorreu em 1976 na cidade de Manaus (Duran *et al.*, 2001).

O gênero *Chromobacterium* consiste de microrganismos Gram-negativos, oxidase e catalase positivos com formato de bacilo e extremidades arredondadas. Movimentam-se por meio de um único flagelo polar e quatro flagelos laterais. Estes flagelos diferem na forma de coloração, forma de movimentação e características antigênicas (Sneath, 1984). Microrganismos deste gênero são anaeróbios facultativos e produzem colônias violetas em meio sólido. Quando cultivados em meio líquido, um anel violeta é formado na superfície do meio. A melhor faixa de temperatura para crescimento está no intervalo entre 30 e 35°C, a temperatura mínima está entre 10 e 15°C e, a temperatura máxima entre 40 e 44°C. Estes microrganismos são quimiorganotróficos e utilizam principalmente carboidratos como fonte de carbono. Nitrito e nitrato são reduzidos gerando uma quantidade variável de gás. Apresentam resistência à benzilpenicilina e ao agente vibriostático O/129 (fosfato de 2,4

diamino-6, diisopropil-pteridina). A porcentagem de CG no DNA da linhagem ATCC 12472 deste microrganismo é de 64,83% (Vasconcelos *et al.*, 2003).

A *C. violaceum* é encontrada principalmente no solo e na água onde ocorre como um dos componentes menos representativos da população de microrganismos (Sneath, 1956). Este microrganismo é encontrado em climas temperados mas ocorre principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. O seu papel na rizosfera de plantas não está completamente esclarecido, embora tenha-se verificado que a inoculação de sementes de milho com *C. violaceum* pode aumentar significativamente o rendimento em peso seco da planta (Hussain e Vancura, 1970).

Os primeiros relatos de infecções causadas por *C. violaceum* em animais e humanos datam de 1905 e 1927, respectivamente (Sneath *et al.*, 1953; Woolley, 1905). Foram reportadas infecções em animais como macacos, porcos, cães e ovelhas (Duran *et al.*, 2001). As vias de contaminação são geralmente a exposição de lesões da pele à água ou solo contaminados (Lee *et al.*, 1999) e por via oral (Petrillo *et al.*, 1984). Nos diferentes casos verificados os sintomas foram abscessos viscerais e subcutâneos (Richard, 1993; Roberts *et al.*, 1997). Embora infecções por *C. violaceum* possam resultar em diarreia com subsequente recuperação do paciente, na maioria dos casos a infecção é fatal para homens e animais (Chen *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2004), ocorrendo principalmente em crianças (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Os sintomas da infecção podem variar e usualmente conduzem à septicemia seguida de morte, porém foi reportado um caso de septicemia em que o paciente sobreviveu devido ao tratamento com ciprofloxacina e amikacina (Ray *et al.*, 2004). A realização de um estudo visando comparar a atividade antimicrobiana de 25 agentes em linhagens clínicas de *C. violaceum*, demonstrou que a ciprofloxacina, norfloxacina e perfloxacina apresentam elevada atividade contra *C. violaceum* (Aldridge *et al.*, 1988). A virulência das linhagens de *C. violaceum* parece não estar associada com a pigmentação deste microrganismo, pois foram isoladas linhagens pigmentadas e não pigmentadas a partir de pacientes contaminados (Lee *et al.*, 1999). Têm-se indícios de que as linhagens virulentas são protegidas contra o sistema imune devido à elevada produção das enzimas superóxido dismutase e catalase (Brito *et al.*, 2004).

Por meio da análise dos dados resultantes do seqüenciamento do genoma deste microrganismo foi possível o estudo dos genes que provavelmente estariam envolvidos

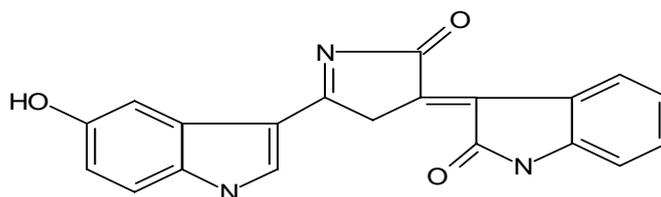
com a patogenicidade da *C. violaceum*. Além disso, o seqüenciamento do genoma da *C. violaceum* permitiu avaliar vários outros genes com potencial para aplicações biotecnológicas (Vasconcelos *et al.*, 2003).

Vários estudos demonstraram o potencial biotecnológico que a *C. violaceum* apresenta em diversas áreas. Como exemplo, pode-se citar o estudo da produção de plásticos biodegradáveis, também conhecidos como polihidroxicanoatos (PHAs). Este estudo demonstrou que *C. violaceum* é capaz de produzir poli-3-hidroxi-*butirato* e poli-3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato** (Kolibachuk *et al.*, 1999). Além da possibilidade de substituição dos plásticos de origem petroquímica, os PHAs apresentam propriedades que os tornam materiais interessantes para aplicações biomédicas (Anderson e Dawes, 1990). A produção de celulose também foi verificada em *C. violaceum* (Recouvreux, 2004). Este polímero apresenta aplicações biomédicas, como a produção de curativos para queimaduras. Outra característica interessante da *C. violaceum* é sua capacidade de atuar na extração de ouro a partir de minérios. Foi demonstrado que este microrganismo foi capaz de solubilizar todo o ouro contido em lâminas de vidro (Campbell *et al.*, 2001). Esta bactéria pode ser cultivada com a utilização de materiais de baixo custo, elevando a viabilidade do processo de biolixiviação (Carepo *et al.*, 2004). Outro potencial verificado em *C. violaceum* foi a produção de enzimas hidrolíticas. A atividade quitinolítica de *C. violaceum* foi testada, demonstrando seu potencial para produção de quitinases (Chernin *et al.*, 1998). Estas enzimas podem ser utilizadas para o controle de insetos, fungos e nematódeos (Patil *et al.*, 2000). Dentre todas as características da *C. violaceum*, a principal é a produção de um pigmento chamado violaceína, que apresenta diversas propriedades interessantes, como descrito em maiores detalhes a seguir.

### **3.1.2. Produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum***

A violaceína é um pigmento violeta produzido por algumas espécies de microrganismos. Sua estrutura química é formada pela união de duas moléculas modificadas do aminoácido L-triptofano, conforme apresentado na Figura 1. Devido ao distinto fenótipo que confere ao microrganismo produtor, estes são facilmente isolados pela

formação de colônias violetas. A bactéria *C. violaceum* foi o primeiro microrganismo



**Figura 1.** Estrutura química da violaceína. Modificado a partir de Antonio e Creczynski-Pasa (2004).

produtor de violaceína relatado (Boisbaudran, 1882). Outro exemplo de microrganismo produtor de violaceína é a bactéria *Janthinobacterium lividum* (Pantarella *et al.*, 2006).

A produção de violaceína em *C. violaceum* ocorre por meio da expressão dos genes *vioABCDE* (Balibar e Walsh, 2006; Sanchez *et al.*, 2006). Estes genes estão organizados na forma de um operon no genoma da *C. violaceum*. Os detalhes relacionados à via metabólica de biossíntese da violaceína serão descritos no próximo item. A regulação da expressão dos genes de biossíntese de violaceína em *C. violaceum* ocorre por meio de um mecanismo conhecido como *quorum sensing*.

O mecanismo *quorum sensing* é um tipo de controle da expressão gênica que pode atuar simultaneamente em vários genes. Os microrganismos que apresentam este tipo de controle produzem moléculas sinalizadoras que são secretadas no meio. À medida que a população cresce, a concentração destas moléculas sinalizadoras aumenta. Quando a concentração destas moléculas, que são capazes de difundir-se livremente para o interior dos microrganismos, atinge uma dada concentração intracelular, a proteína receptora desta adquire a conformação ativa. A forma ativa da proteína receptora atua como um indutor da expressão dos genes sob controle do mecanismo *quorum sensing*. Dessa forma, o controle da expressão gênica depende da densidade celular (Zhang e Dong, 2004). Em *C. violaceum* a proteína receptora da molécula sinalizadora e a enzima produtora desta molécula são codificadas pelos genes *cviR* e *cviI*, respectivamente (Taylor, 1997). Na linhagem ATCC 31532 da *C. violaceum* a molécula sinalizadora é a N-hexanoil-L-homoserina lactona, e na linhagem ATCC 12472 são as moléculas N-hexanoil-L-homoserina lactona, N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona e (N-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (Oliveira,

2006). Outra forma de controle da produção de violaceína parece estar relacionada à repressão catabólica (Oliveira, 2006). Dessa forma, a produção de violaceína em *C. violaceum* é reprimida quando esta é cultivada em meio de cultura contendo glicose.

Dentre as aplicações biotecnológicas que a violaceína apresenta, pode-se citar a sua atividade tripanocida (Duran e Menck, 2001) e antibacteriana (Duran *et al.*, 1983). Verificou-se que a violaceína exibe atividade contra *Leishmania amazonensis*, o agente causador da leishmaniose (Leon *et al.*, 2001). A leishmaniose é uma doença potencialmente fatal que afeta 12 milhões de pessoas no mundo. A violaceína também apresenta potencial como agente anti-viral (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2003) além de ser capaz de induzir células leucêmicas à apoptose (Ferreira *et al.*, 2004). Outro fator importante verificado é o efeito genotóxico que a violaceína apresenta (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2006). Esta é uma característica importante, tendo em vista que esta molécula ou modificações desta podem tornar-se futuros agentes terapêuticos.

Devido às propriedades da violaceína, estudos relacionados à otimização da produção deste pigmento têm sido desenvolvidos visando suprir as necessidades de fornecimento desta molécula para a realização de pesquisas. Reilly e Pyne (1927) foram capazes de obter 6 mg/L de violaceína em uma cultura realizada durante três semanas. Um fator importante verificado para a produção de violaceína foi a oxigenação da cultura e a origem da peptona utilizada no meio de cultura (Tobie, 1935). Dessa forma, foi possível a obtenção de 25 mg/L de violaceína em culturas de *C. violaceum* e produtividade de 4 nmol/mL·h (Tobie, 1935). Foi relatado que a produção de violaceína por *C. violaceum* BB-78 pode ser elevada utilizando-se meio de cultura líquido com a adição de L-triptofano, ausência de luz e pH 7 a 28°C por 24 h (Riveros *et al.*, 1989). A otimização da produção de violaceína por meio do uso de planejamentos fatoriais resultou na obtenção de um fator de conversão e produtividade de 0,023 g/gMS e 34,79 nmol/mL·h, respectivamente (Mendes *et al.*, 2001). Outro fator que aumenta o rendimento da produção de violaceína em culturas de *C. violacem* é a utilização de glicerol como fonte de carbono (Oliveira, 2006). A avaliação da produção de violaceína a partir de microrganismos isolados do mar demonstrou que uma espécie de *Pseudoalteromonas* sp. é capaz de produzir grandes quantidades de violaceína. Este microrganismo, conhecido como *Black Beauty* é capaz de produzir 2,1 g/L violaceína bruta em um cultivo de 96 h. Este microrganismo foi

patenteado (Tan *et al.*, 2004) visando aplicações da violaceína como corante para tecidos, plásticos e alimentos.

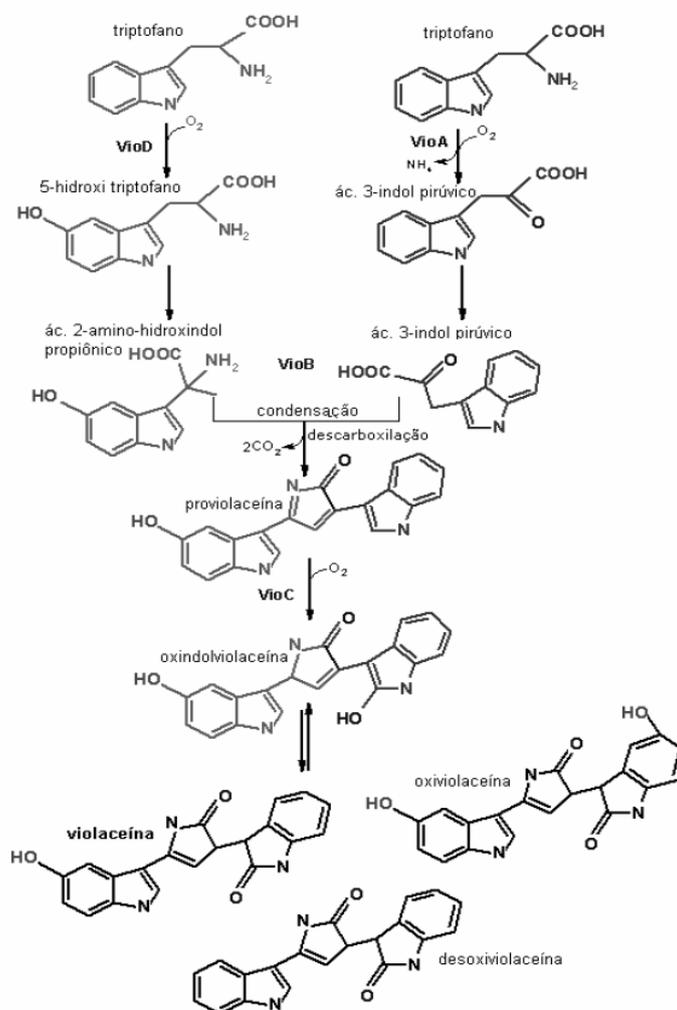
### 3.2. Produção Heteróloga de Violaceína por *Escherichia coli*

Um dos primeiros trabalhos que relatam a produção heteróloga de violaceína por *E. coli* foi realizado por Pemberton *et al.* (1991). Neste trabalho foi realizada a clonagem de um fragmento de DNA de 14,5 kpb da *C. violaceum*. Quando expresso em *E. coli* e em várias outras bactérias Gram-negativas, verificou-se acentuada produção do pigmento. Após esta constatação comprovou-se que existia compatibilidade entre os códigos genéticos da *E. coli* e *C. violaceum*, além da disponibilidade dos metabólitos necessários à biossíntese de violaceína.

Durante a realização de estudos relacionados à biossíntese de violaceína, Momen e Hoshino (2000) isolaram um fragmento de DNA com 9 kpb da *C. violaceum* que foi expresso em *E. coli*. As proteínas das células desta cultura foram extraídas possibilitando a criação de um sistema contendo as enzimas necessárias à biossíntese da violaceína. Por meio da adição de L-triptofano a estes extratos foi possível obter violaceína com uma concentração 40 vezes superior à obtida a partir de culturas de *C. violaceum*.

O primeiro estudo de caracterização dos genes da via metabólica de produção de violaceína de *C. violaceum* demonstrou que um fragmento de 8 kpb de *C. violaceum* clonado em *E. coli* possuía quatro genes necessários à produção de violaceína (August *et al.*, 2000). Estes genes, conhecidos como *vioA*, *vioB*, *vioC* e *vioD*, foram classificados como monoxigenases nucleotídeo dependentes. Foi verificado que a desativação dos genes *vioA* e *vioB* impossibilitava a produção de violaceína em *E. coli*, e a inativação dos genes *vioC* e *vioD* resultava na produção dos precursores da violaceína. Observou-se que as colônias produtoras de violaceína apresentavam fenótipos variáveis. A maioria das colônias era violeta, sugerindo que as mutações realizadas por meio da inserção de transposons no DNA contendo os genes *vioA*, *vioB*, *vioC* e *vioD* não afetou o funcionamento destes. Entretanto, foram observadas colônias extremamente pequenas e fortemente pigmentadas, consideradas prováveis super-produtoras de violaceína. Estas colônias super-produtoras de violaceína, quando repicadas sucessivamente, geravam culturas com grande quantidade de

colônias brancas não produtoras do pigmento, sugerindo que a elevada concentração intracelular de violaceína poderia exercer efeito tóxico para a célula. Foi observado que as mutações que geravam estas colônias super-produtoras de violaceína não afetaram os genes *vioB*, *vioC*, e *vioD*. Estas mutações estavam localizadas próximas ao gene *vioA*. Por meio da análise dos mutantes obtidos foi proposta uma via metabólica para a biossíntese da violaceína, conforme apresentado na Figura 2. Segundo o esquema proposto, a enzima VioA seria uma triptofano 2-monoxigenase que atuaria no início da via de biossíntese da violaceína, convertendo L-triptofano em ácido 3-indol pirúvico. A enzima VioB seria uma



**Figura 2.** Esquema da via metabólica de biossíntese da violaceína proposta por August *et al.* (2000). Figura obtida a partir de Oliveira (2006).

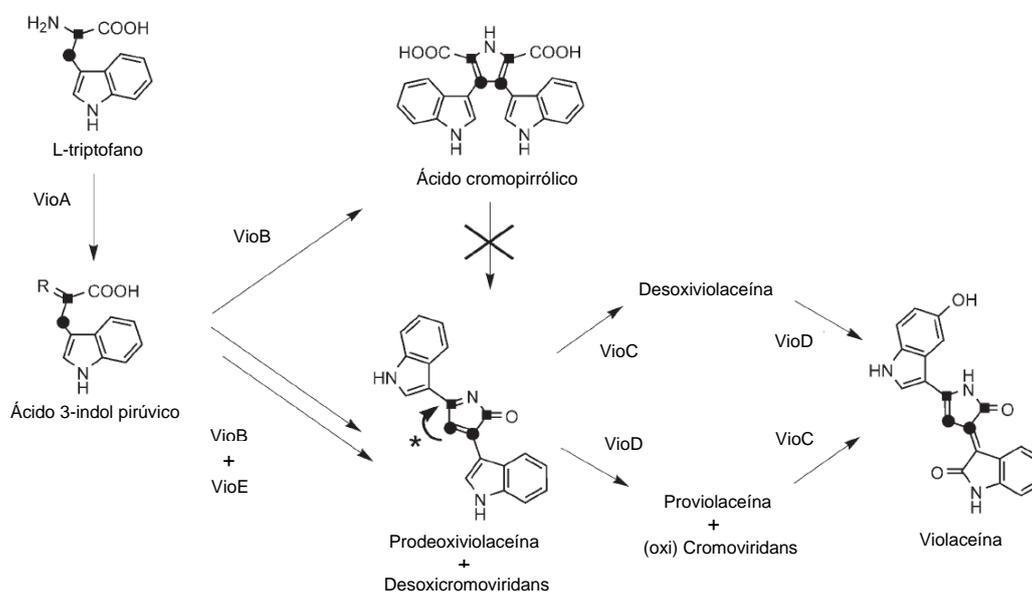
poliketídico sintase que atuaria na modificação da porção do anel indólico do L-triptofano e na condensação de duas moléculas modificadas de L-triptofano. A enzima VioC seria uma monoxigenase responsável pela oxigenação da proviolaceína à desoxiviolaceína, e a enzima VioD seria responsável pela conversão do L-triptofano em 5-hidroxi triptofano.

A produção heteróloga de violaceína em *E. coli* também foi possível a partir do DNA proveniente de amostras ambientais (Brady *et al.*, 2001). A partir do isolamento de uma amostra de DNA ambiental e construção de uma biblioteca com a utilização de cosmídios, foi possível o isolamento de uma colônia com pigmentação escura. Por meio do seqüenciamento do DNA do cosmídio desta colônia verificou-se que esta possuía um fragmento de DNA de 6,7 kpb contendo genes similares a *vioA*, *vioB*, *vioC* e *vioD* de *C. violaceum*. Mutações realizadas neste cosmídio por meio da inserção de transposons permitiram a obtenção de colônias com fenótipos distintos, como colônias com coloração azul escuro e verde. Observou-se que o crescimento de colônias com forte pigmentação azul escura ocorria devido às mutações realizadas na região à montante do gene *vioA*, e as mutações que geravam colônias verdes se localizavam no gene *vioC* e na região final do gene *vioB*. A caracterização dos pigmentos das colônias escuras demonstrou que estes eram violaceína e desoxiviolaceína.

As vias metabólicas de biossíntese da violaceína e de indocarbazóis possuem características semelhantes, como a fusão de duas moléculas de L-triptofano. Estas características motivaram Sanchez *et al.* (2006) no estudo de combinações dos genes das vias metabólicas de produção de violaceína e indocarbazóis visando a obtenção de novos agentes antitumorais. Apesar da não obtenção de novos compostos antitumorais, descobriu-se que um pequeno quadro de leitura situado à montante do gene *vioD* em *C. violaceum*, a *ORF* (*open reading frame*) CV3270 é essencial para a produção de violaceína em *E. coli*. Foi constatado que esta *ORF* codifica uma proteína importante na via de biossíntese de violaceína, exercendo papel fundamental na realização do *1,2 shift* do anel indólico da molécula de L-triptofano, como apresentado na Figura 3. Esta *ORF* foi nomeada de gene *vioE*. Dessa forma, a ausência do gene *vioE* impossibilita a produção violaceína em *E. coli*. Nesse estudo, foi obtido um plasmídio contendo os genes do operon *vioABCDE* sob controle do promotor *lac*. Culturas da *E. coli* portadora deste plasmídio realizadas em meio de cultura contendo indutor para a expressão dos genes *vioABCDE*, geraram colônias

descritas como hiper-produtoras de violaceína. Da mesma forma observada por August *et al.* (2000), repiques sucessivos destas colônias em meio de cultura contendo indutor, geravam colônias brancas não produtoras de violaceína devido ao provável efeito tóxico desta molécula. A partir deste estudo foi proposta uma nova via de biossíntese da violaceína, conforme apresentado na Figura 3.

Na via proposta por Sanchez *et al.* (2006) não está presente o intermediário 5-hidroxi triptofano descrito por August *et al.* (2000). Um dos fatores que sugerem que o intermediário 5-hidroxi triptofano faça parte da via metabólica de biossíntese da violaceína deve-se à capacidade que a *C. violaceum* possui de produzir este composto (Letendre *et al.*, 1974), e devido à incorporação deste à molécula de violaceína. As características da enzima responsável pela síntese de 5-hidroxi triptofano e as da VioD, baseando-se na comparação de seqüências, sugerem que estas não se tratam da mesma proteína (Sanchez *et al.*, 2006). Foi verificado que a taxa de incorporação do 5-hidroxi triptofano na molécula de violaceína foi de 8% contra 42% verificada para a incorporação do L-triptofano (Hoshino *et al.*, 1987).



**Figura 3.** Via metabólica de biossíntese da violaceína proposta por Sanchez *et al.* (2006). O grupamento R na molécula de ácido 3-indol pirúvico corresponde a um grupamento imina ou cetona. O 1,2 shift indicado pelo \* consiste na alteração de uma das moléculas de ácido 3-indol pirúvico indicada pelos carbonos marcados com ● e ■ na pródeoxiviolaceína.

Se o L-triptofano fosse convertido em 5-hidroxi triptofano na via metabólica de biossíntese da violaceína em *C. violaceum*, como sugerido por August *et al.* (2000), poderia se esperar que as taxas de incorporação do 5-hidroxi triptofano na violaceína estivessem mais próximas das taxas observadas para o L-triptofano. Além disso, a maior parte do 5-hidroxi triptofano é convertida em oxiviolaceína, um composto normalmente não encontrado em *C. violaceum* (Hoshino e Ogasawara, 1990). Dessa forma conclui-se que a incorporação do 5-hidroxi triptofano na violaceína deve-se às altas concentrações deste composto adicionadas ao meio de cultura. Nestas condições, a maior parte do 5-hidroxi triptofano é convertida em oxiviolaceína, um metabólito que não ocorre naturalmente em *C. violaceum*. Baseado nestes argumentos, Sanchez *et al.* (2006) propuseram que o 5-hidroxi triptofano não faz parte da via de biossíntese de violaceína, embora possa ser incorporado neste pigmento devido à flexibilidade das enzimas.

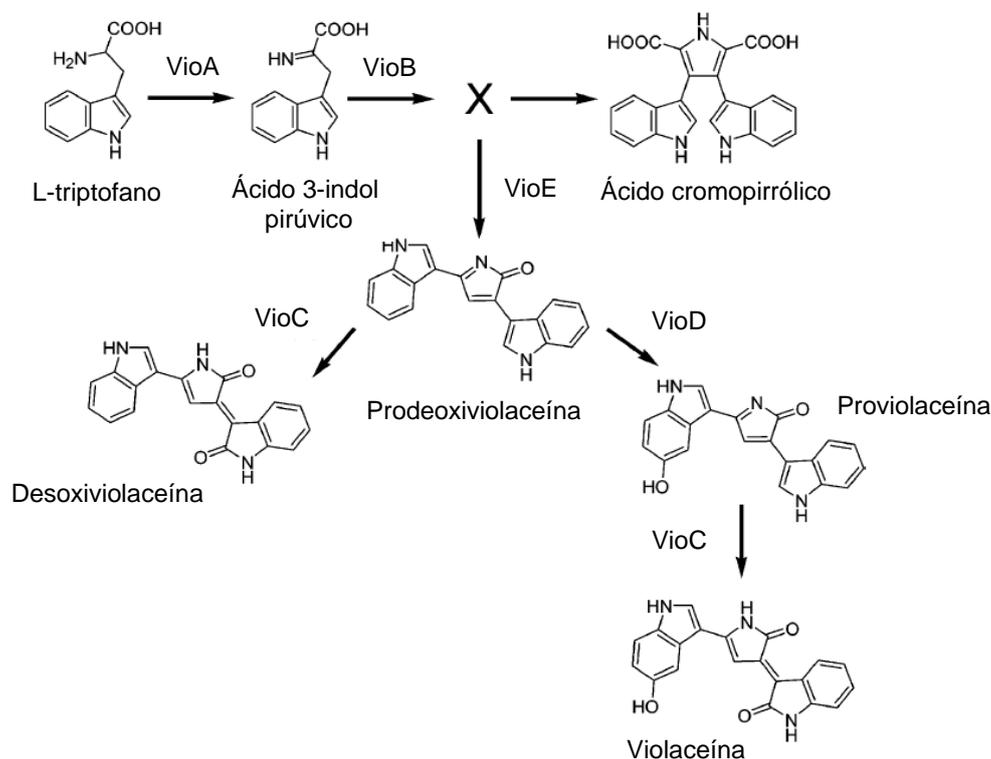
Por meio da expressão heteróloga dos genes *vioABCDE*, Balibar e Walsh (2006) foram capazes de produzir e purificar as enzimas VioA-E. A partir das enzimas purificadas foi possível reconstituir a via de biossíntese da violaceína *in vitro* (Figura 4). Foi constatado que a flavo enzima VioA e a heme proteína VioB atuam em conjunto na oxidação e dimerização do L-triptofano, gerando um intermediário desconhecido que é convertido no ácido cromopirrólico. Na presença da enzima VioE, este intermediário sofre o *1,2 shift* do anel indólico gerando a prodesoxiviolaceína. A enzima VioD hidroxila um dos anéis indólicos na posição 5 gerando proviolaceína, que então sofre ação da enzima VioC no outro anel indólico na posição 2 gerando violaceína, conforme apresentado na Figura 4. A reação realizada pela enzima VioE foi analisada por Asamizu *et al.* (2007). Verificou-se que após a ação da enzima VioB, a forma imina do ácido 3-indol pirúvico gera um composto desconhecido que pode converter-se espontaneamente em ácido cromopirrólico, ou pode ser convertido em prodeoxiviolaceína pela ação da VioE.

### 3.3. Promotor *araBAD*

O metabolismo da L-arabinose em *E. coli* ocorre por meio da via metabólica codificada pelos genes *araB*, *araA* e *araD*. Estes genes estão organizados no genoma da *E. coli* na forma de um operon conhecido por *araBAD*. Os genes *araB*, *araA* e *araC* codificam

as enzimas L-ribuloquinase, L-arabinose isomerase e L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase, respectivamente. O catabolismo da L-arabinose inicia-se com seu transporte para o interior da célula por meio dos sistemas de transporte da L-arabinose codificados pelos genes *araE* e *araFGH* (Khlebnikov *et al.*, 2000). No interior da célula a L-arabinose é convertida em L-ribulose pela enzima L-arabinose isomerase. A L-ribulose é convertida em L-ribulose 5-fosfato pela L-ribuloquinase e finalmente a L-ribulose 5-fosfato é convertida em D-xilulose 5-fosfato pela L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase. Este último produto é então metabolizado na via das pentoses.

O promotor *araBAD*, também conhecido como  $P_{BAD}$ , controla a transcrição dos genes *araBAD*. A transcrição a partir desse promotor é controlada por uma proteína reguladora codificada pelo gene *araC*. Este gene localiza-se à montante do operon *araBAD*. Os mecanismos de regulação da transcrição dos genes *araBAD* a partir do  $P_{BAD}$  estão descritos em maiores detalhes no próximo item.



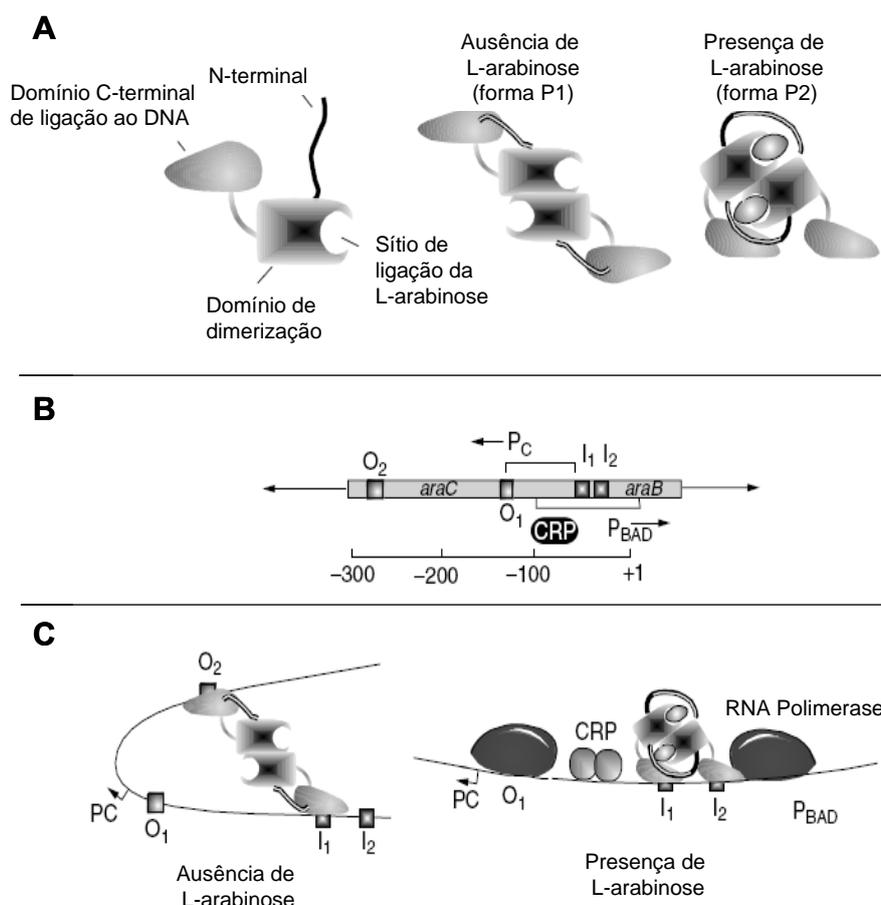
**Figura 4.** Via metabólica de biossíntese da violaceína proposta por Balibar e Walsh (2006).

### 3.3.1. Regulação da transcrição do operon *araBAD*

O operon *araBAD* situa-se à jusante do gene *araC*. A transcrição destes ocorre de forma divergente, conforme está esquematizado na Figura 5B. A regulação da transcrição dos genes do operon *araBAD* a partir do promotor  $P_{BAD}$  esta sujeita a duas formas de controle em *E. coli*. Estes controles ocorrem por meio da proteína regulatória AraC e da repressão catabólica.

A proteína AraC apresenta-se na forma dimérica *in vivo*. Este dímero pode estar na conformação P1 ou P2, dependendo das condições intracelulares, conforme apresentado na Figura 5A. Na ausência de L-arabinose a proteína AraC adquire a forma P1 e atua como repressora dos promotores  $P_{BAD}$  e do promotor do seu próprio gene (promotor  $P_C$ ). Na forma P1 a proteína AraC liga-se preferencialmente no operador *araO*<sub>2</sub> e no sítio *araI*<sub>1</sub> (Figura 5B) curvando o DNA. Dessa forma ocorre a repressão da transcrição do operon *araBAD* e do gene *araC* devido ao impedimento da ligação da proteína AraC na forma P2 para ativação da transcrição, como demonstra a Figura 5C. Quando a concentração de AraC estiver muito elevada, também pode ocorrer a repressão do gene *araC* pela ligação desta proteína no operador *araO*<sub>1</sub>. Na presença de L-arabinose e ausência de glicose, a L-arabinose é transportada para o interior da célula por meio dos transportadores codificados pelos genes *araE* e *araFGH*. A presença de L-arabinose no interior da célula faz com que a proteína AraC adquira a forma P2. Na forma P2, esta proteína atua como ativadora da transcrição do promotor  $P_C$  e dos promotores  $P_{BAD}$  e  $P_E$  (Khlebnikov *et al.*, 2002). A forma P2 da AraC possui maior afinidade pelos sítios *araI*<sub>1</sub> e *araI*<sub>2</sub>, e ao ligar-se a estes sítios esta proteína induz a transcrição dos genes *araBAD*.

O metabolismo da L-arabinose em *E. coli* também está sujeito à repressão catabólica. Dessa forma, quando outra fonte de carbono e energia preferencial estiver disponível, como a glicose, o catabolismo da L-arabinose será reprimido devido à ausência de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). Na ausência de uma fonte de carbono preferencial e na presença de L-arabinose, os níveis intracelulares de cAMP tornam-se elevados. O cAMP pode então ligar-se a proteína ativadora do catabolismo (proteína CAP ou CRP), e este complexo induz a transcrição do promotor  $P_{BAD}$ .



**Figura 5.** Mecanismo de controle da transcrição do operon *araBAD* e do gene *araC*. A) Conformações da proteína AraC. B) Organização do operon *araBAD* e do gene *araC* em *E. coli*. C) Promotores  $P_{BAD}$  e  $P_C$  nas formas reprimidas e ativas. Ilustração modificada a partir de Moat *et al.* (2002).

### 3.3.2. Aplicações do promotor $P_{BAD}$

Características como a rápida indução na presença de L-arabinose e rápida repressão na ausência desta molécula tornaram o promotor  $P_{BAD}$  alvo de estudos visando aplicações onde é necessário se ter o controle dos níveis de expressão dos genes estudados. A análise do promotor  $P_{BAD}$  demonstrou que este pode ser reprimido rapidamente, permitindo o estudo das conseqüências que a ausência súbita da produção de certas proteínas pode ocasionar na fisiologia dos organismos. Entretanto, foi verificado que o nível de repressão fornecido pelo  $P_{BAD}$  pode não ser completo, permitindo que o gene em estudo ainda possa ser expresso em níveis muito baixos (Guzman *et al.*, 1995). Este efeito ocorre principalmente em células que sofreram repressão após um período de forte indução

com elevadas concentrações de L-arabinose. Nos casos em que as células de *E. coli* foram induzidas com baixas concentrações de L-arabinose, a posterior repressão do promotor  $P_{BAD}$  atinge maiores níveis (Guzman *et al.*, 1995).

Vetores que utilizam o promotor  $P_{BAD}$  juntamente com o gene *araC* permitem que este sistema seja utilizado para a expressão de diversos genes. Um vetor contendo o  $P_{BAD}$  e o gene *araC* de *E. coli* foi expresso com sucesso em *Agrobacterium tumefaciens*. Nesta bactéria, o nível de controle da expressão com o promotor  $P_{BAD}$  foi significativo, porém não tanto quanto o nível observado em *E. coli* (Newman e Fuqua, 1999).

Estudos sobre o  $P_{BAD}$  relatam que os níveis de expressão dos genes sob controle deste promotor estariam diretamente relacionados à concentração de L-arabinose utilizada no meio de cultura (Guzman *et al.*, 1995), contudo, verificou-se posteriormente que o promotor  $P_{BAD}$  estava sujeito a uma forma de regulação conhecida como indução autocatalítica (Siegele e Hu, 1997). Neste tipo de indução, o controle da transcrição do gene da proteína transportadora do substrato, no caso do  $P_{BAD}$  os genes *araE* e *araFGH*; também estaria sob controle da mesma molécula que estas proteínas transportam para o interior da célula. Dessa forma, os genes de transporte da L-arabinose estariam ativos somente quando uma dada concentração de L-arabinose fosse atingida no interior da célula. Ao atingir esta concentração, a célula passaria a expressar as proteínas de transporte da L-arabinose, e os níveis intracelulares desta molécula se elevariam, induzindo assim o promotor  $P_{BAD}$  e os promotores dos genes de transporte. Esta forma de controle gera populações de células nas quais uma fração está completamente induzida e outra não está induzida. As células que atingirem o limiar de L-arabinose necessário para ativar a expressão dos genes de transporte serão capazes de induzir o  $P_{BAD}$ , e as demais células permanecerão não induzidas (Khlebnikov *et al.*, 2002).

### 3.4. Linguagem de Programação Perl

A linguagem de programação *Practical Extraction and Report Language*, conhecida como Perl, foi criada por Larry Wall. Dentre as linguagens de programação, a Perl foi selecionada para o desenvolvimento de programas de bioinformática devido às suas características. Além de esta linguagem ser eficiente do ponto de vista do programador, o

que significa obter um programa funcional com a utilização de poucas linhas de código; esta possui ferramentas especialmente desenvolvidas para a análise padrões em seqüências de texto. Esta é a principal característica necessária para análise da grande quantidade de informações contidas seqüências de DNA obtidas por meio dos projetos de seqüenciamento (Gibas e Jambeck, 2001).

A Perl tem sido utilizada por várias instituições de pesquisa e universidades para o desenvolvimento de programas visando solucionar problemas específicos na área das ciências da vida. Dessa forma, muitos programas foram desenvolvidos para diversas aplicações e, frequentemente, vários destes foram criados visando solucionar o mesmo problema. Dentro desse contexto, foi desenvolvido o projeto Bioperl (Stajich *et al.*, 2002). O projeto Bioperl consiste de um conjunto de módulos escritos em Perl, desenvolvidos para solucionar problemas em diversas áreas da biologia, como por exemplo, o armazenamento e análise de seqüências de proteínas e de DNA. A idéia básica do projeto Bioperl consiste em evitar que programas desenvolvidos para uma determinada tarefa sejam reescritos, mas que os programas já existentes sejam organizados e disponibilizados gratuitamente por meio da internet, de forma que estes sejam utilizados, eventualmente melhorados e novamente disponibilizados. Dessa forma, por meio da colaboração da comunidade internacional de biólogos, bioinformatas, cientistas da computação, etc.; foi criada uma base de dados pública que disponibiliza módulos para as mais diversas aplicações. Dentre os módulos desenvolvidos existem ferramentas específicas para o alinhamento local e global de seqüências de DNA, ferramentas para a extração de informações de arquivos contendo resultados do Blast (Altschul *et al.*, 1990), entre outras.

O interpretador da linguagem Perl pode ser adquirido gratuitamente por meio da internet na página <http://www.perl.com>. Neste endereço existem tutoriais para auxiliar os interessados em desenvolver programas nesta linguagem. Os módulos e tutoriais sobre o projeto Bioperl podem ser obtidos na página <http://www.bioperl.org>. Uma introdução a linguagem Perl para aplicações em bioinformática pode ser obtida em Tisdall (2001), e para estudos avançados em Tisdall (2003).

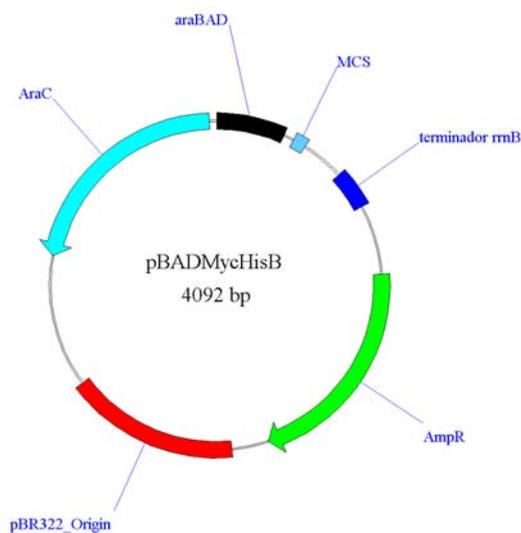
## CAPÍTULO 4 - Materiais e Métodos

---

### 4.1. Procedimentos Computacionais

#### 4.1.1. Obtenção das seqüências nucleotídicas

A seqüência nucleotídica do plasmídio pBADMycHisB foi obtida no site da empresa Invitrogen no endereço <http://www.invitrogen.com> (item 7.1). Este plasmídio, esquematizado na Figura 6, foi selecionado por permitir a substituição do promotor de um dado gene, pelo promotor *araBAD* ( $P_{BAD}$ ). O  $P_{BAD}$  localiza-se à montante do sítio de restrição múltipla do plasmídio pBADMycHisB permitindo o controle da expressão de genes inseridos neste plasmídio. Este promotor pode ser induzido a iniciar a transcrição, por meio da adição do carboidrato L-arabinose ao meio de cultura onde se cultiva o



**Figura 6.** Plasmídio pBADMycHisB.

microrganismo portador deste plasmídio. Assim, é possível controlar a expressão de genes inseridos no plasmídio pBADMycHisB por meio da utilização de diferentes concentrações de L-arabinose no meio de cultura.

As seqüências nucleotídicas do operon *vioABCD* e do gene *vioE* da bactéria *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (itens 7.2 e 7.3) foram obtidas no site do *Brazilian Genome, Virtual Institute of Genomic Research* no endereço [www.brgene.lncc.br](http://www.brgene.lncc.br) e no *National Center for Biotechnology Information* no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Todas as seqüências nucleotídicas obtidas foram convertidas para o formato *fasta* para posterior utilização.

#### **4.1.2. Determinação dos sítios de restrição presentes no plasmídio e no operon *vioABCD***

O desenho dos iniciadores usados para a amplificação do operon *vioABCD* foi realizado utilizando-se como DNA alvo um amplicon obtido anteriormente pela amplificação da seqüência nucleotídica do operon *vioABCD* de *C. violaceum* ATCC 12472. Este amplicon possui 6986 pb, com 114 pb à montante da região -1 do gene *vioA* e 132 bp à jusante do terminador de tradução do gene *vioD*. Os iniciadores adiante e reverso utilizados para a obtenção deste amplicon foram 5'ACGAAAGGCAGCATCCCGATTCC3' e 5'GCGCTCGTAGTCGAACCAGCAGTAG 3', respectivamente (Demétrio, 2006).

Com intuito de avaliar quais enzimas de restrição poderiam ser utilizadas para a clonagem direcional do operon *vioABCD* no plasmídio pBADMycHisB, foram verificados os sítios de restrição que ocorrem no sítio de restrição múltipla desse plasmídio. Para realizar esta tarefa foi utilizado o programa Jellyfish 1.5., como descrito no item 7.4. Este procedimento também foi realizado com a seqüência nucleotídica do operon *vioABCD*, porém foram selecionados os sítios para enzimas de restrição que ocorreram fora dos quadros abertos de leitura dos genes do operon *vioABCD*, pois estes são os prováveis sítios para enzimas de restrição que poderiam viabilizar a inserção desse operon no plasmídio pBADMycHisB.

### **4.1.3. Busca por sítios de restrição parcialmente conservados no operon *vioABCD***

Com intuito de encontrar sítios de restrição parcialmente conservados no operon *vioABCD* e regiões à montante e jusante desta seqüência de DNA, foi desenvolvido um programa (item 7.6) em linguagem de programação Perl. A localização destes sítios de restrição permitiu avaliar a possibilidade do desenho de iniciadores portadores de mutações. Assim, seria possível inserir as mutações necessárias para reconstrução do sítio de restrição no amplicon obtido a partir da amplificação do DNA alvo, possibilitando a utilização deste na clonagem direcional do operon *vioABCD* no plasmídio pBADMycHisB. Os procedimentos realizados nesta etapa estão descritos em maiores detalhes no item 7.5.

Posteriormente foram avaliados os ajustes dos quadros abertos de leitura. Após as clivagens enzimáticas nas posições dos sítios de restrição parcialmente conservados e dos intactos obtidos neste e no item 4.1.2, o quadro de leitura do gene *vioA* destas seqüências foi avaliado em relação ao quadro de leitura do promotor P<sub>BAD</sub> do plasmídio pBADMycHisB, como descrito no item 7.7.

### **4.1.4. Desenho de iniciadores para clonagem direcional do operon *vioABCD* e do gene *vioE***

O programa Oligo 6.68 foi utilizado para o desenho de iniciadores utilizados para a amplificação do operon *vioABCD* e do gene *vioE*. Os parâmetros físico-químicos dos iniciadores foram determinados de forma a satisfazer as recomendações da literatura (Sambrook e Russell, 2001). Os procedimentos realizados para o desenho de iniciadores estão descritos em maiores detalhes no item 7.8. Optou-se pela utilização da PCR em duas temperaturas (Beckedorff, 2006).

## 4.2. Procedimentos Experimentais

Os detalhes para a obtenção dos meios de cultura e das soluções utilizadas nos procedimentos experimentais estão descritos em detalhes nos Anexos.

### 4.2.1. Amplificação do operon *vioABCD* por PCR

Com intuito de clonar o operon *vioABCD* da bactéria *C. violaceum* ATCC 12472 no plasmídio pBADMyHisB, foi necessária a amplificação deste operon por meio da reação em cadeia da polimerase aninhada (PCR aninhada). As primeiras reações de PCR foram compostas por 20 ng da extração do DNA genômico da bactéria *C. violaceum* ATCC 12472 (a extração do DNA genômico da bactéria *C. violaceum* ATCC 12472 foi realizada com o kit GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation, Amersham Biosciences EUA, segundo o protocolo do fabricante), 60 mM de Tris-SO<sub>4</sub> pH 8,9, 18 mM de sulfato de amônio, 500 nM do iniciador adiante 5'ACGAAAGGCAGCATCCCGATTCC3', 500 nM do iniciador reverso 5'GCGCTCGTAGTCGAACCAGCAGTAG3', 0,25 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, EUA), 200 nM de dNTPs, 2 mM de sulfato de magnésio, 4,975% (v/v) de dimetil sulfoxido (Sigma-Aldrich, EUA) e quantidade suficiente de água ultra pura para completar 20 µL. Foram realizadas cinco reações de PCR, nas quais foram utilizadas diferentes temperaturas de extensão. O programa utilizado no termociclador (Mastercycler Gradient, eppendorf Alemanha) foi de 94°C por 3 min para a desnaturação inicial, e 40 ciclos de 94°C por 30 s e temperaturas de extensão de 68, 69,6, 71,3, 72,8, e 74,1°C por 8,5 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 17 s e o resfriamento a 10°C. Os produtos das reações foram avaliados por meio de uma eletroforese em gel de agarose como descrito no item 7.12 e acondicionados a -20°C.

O produto destas reações de PCR foi posteriormente utilizado como DNA molde para uma nova reação de PCR, visando a obtenção de grande quantidade do amplicon do operon *vioABCD* flanqueado por sítios de restrição inseridos pelo uso de iniciadores contendo as mutações apropriadas. Para tanto, foram realizadas 30 reações de PCR. Cada reação foi composta de 1 µL do produto das reações de PCR descritas acima, diluído três vezes, 60 mM de Tris-SO<sub>4</sub> pH 8,9, 18 mM de sulfato de amônio, 500 nM do iniciador

adiante, 500 nM do iniciador reverso (determinados no item 4.1.4), 0,25 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, EUA), 200 nM de dNTPs, 2 mM de sulfato de magnésio, 4,975% (v/v) de dimetil sulfoxido (Sigma-Aldrich, EUA) e quantidade suficiente de água ultra pura para 20  $\mu$ L. O programa utilizado no termociclador (Mastercycler gradient, eppendorf Alemanha) foi de 94°C por 3 min para a desnaturação inicial, e 25 ciclos de 94°C por 30 s e 69°C por 8,5 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 17 s, os tubos foram resfriados a 10°C até o momento em que os produtos das reações foram reunidos em um único tubo que foi acondicionado a -20°C.

O produto das reações de PCR foi avaliado por meio de uma eletroforese em gel de agarose como descrito no item 7.12, porém foi utilizado tampão TEB (item 7.9.3) em vez de tampão TAE, e condições de corrida de 90 min a 60 V e 60 mA. Este produto foi então purificado com o kit GFX<sup>TM</sup> DNA and Gel Band Purification, Amersham Biosciences EUA, conforme o protocolo do fabricante. Uma alíquota de 1  $\mu$ L deste produto, foi avaliada por meio de uma eletroforese para verificação da concentração do DNA, como descrito anteriormente.

#### 4.2.2. Extração de plasmídios

A bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$  portadora do plasmídio pBADMycHisB, de agora em diante referida como *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBADMycHisB), foi inoculada em uma placa de Petri contendo meio de cultura LB sólido suplementado com 100  $\mu$ g/mL do antibiótico ampicilina. O inóculo foi obtido a partir de um estoque conservado a -80°C. A placa de Petri inoculada foi incubada a 37°C por 24 h. Após este período, uma colônia isolada da *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBADMycHisB) foi inoculada em um frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Esta cultura foi incubada em uma estufa com agitação orbital a 37°C e 150 rpm por 24 h. Alíquotas de 1,5 mL desta cultura foram adicionadas a microtubos de 1,5 mL previamente autoclavados (20 min a 121°C, 1,5 atm) e precipitadas por centrifugação a 14000-g por 1 min em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados, e aos precipitados de cada um dos microtubos foram adicionados 100  $\mu$ L de solução I. Esta solução é composta de 50 mM de D-glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8 e 10 mM de EDTA.

Os precipitados foram ressuspensos, e a cada um dos tubos foram adicionados 200  $\mu$ L da solução II. Os tubos foram invertidos por sete vezes. A solução II é composta de 0,1 M de NaOH e 0,5% (m/v) de SDS. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso, pela mistura de partes iguais de soluções de 0,2 M de NaOH e 1% (m/v) de SDS. Após a adição da solução II, o conteúdo dos microtubos se tornou esbranquiçado. Posteriormente, a cada um dos microtubos foram adicionados 200  $\mu$ L da solução III, composta de 3 M de acetato de potássio e 11,5% (v/v) de ácido acético. Os microtubos foram então invertidos por sete vezes, e incubados em gelo por 5 min. Após este período, foram adicionados 500  $\mu$ L de LiCl 5 M a cada um dos tubos e estes foram invertidos cinco vezes. Os tubos foram centrifugados a 14000·g por 10 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, foram transferidos 900  $\mu$ L do sobrenadante de cada um dos microtubos, para novos microtubos de 1,5 mL, livres das enzimas DNAase, RNAse e pirogênicos, e previamente autoclavados (20 min a 121°C, 1,5 atm). Com intuito de precipitar o DNA plasmidial, a cada um dos microtubos foram adicionados 600  $\mu$ L de isopropanol, e estes foram invertidos por dez vezes e então centrifugados a 14000·g por 10 min à temperatura ambiente. Os sobrenadantes dos seis tubos foram descartados, e ao precipitado formado em cada um dos tubos foi adicionado 1 mL de etanol 70% (v/v) previamente resfriado a 0°C, e o conteúdo de cada um dos tubos foi misturado por inversão 5 vezes. Os microtubos foram novamente centrifugados a 14000·g por 2 min a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados, os microtubos foram colocados abertos em posição invertida sobre uma camada de papel toalha para que secassem. Posteriormente, a cada um dos microtubos foram adicionados 40  $\mu$ L de tampão TE (10 mM de Tris HCl e 1 mM de EDTA, pH 8) e 2,5  $\mu$ L de RNAse A (4 mg/mL). Os tubos foram então incubados em uma estufa a 55°C por 15 min, e finalmente armazenados a -20°C. Foram realizadas dezoito extrações.

O produto das extrações do plasmídeo pBADMycHisB foi reunido em um único microtubo e então purificado com a utilização do kit GFX<sup>TM</sup> DNA and Gel Band Purification, Amersham Biosciences EUA, conforme o protocolo do fabricante. Uma alíquota de 2  $\mu$ L do plasmídeo pBADMycHisB purificado, foi avaliada por meio de uma eletroforese para verificação da pureza e concentração deste, como descrito no item 7.12. Foi utilizado tampão TEB (item 7.9.3) em vez do tampão TAE na eletroforese, e condições de 60 V e 60 mA por 90 min. Uma estimativa da concentração do plasmídeo

pBADMyHisB foi obtida por meio da comparação intensidade da banda formada por este, em relação as bandas do marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII.

#### 4.2.3. Digestão enzimática do amplicon *vioABCD* e do plasmídio pBADMyHisB

Visando clonar o amplicon *vioABCD* no plasmídio pBADMyHisB, estes foram digeridos enzimaticamente com as enzimas de restrição determinadas no item 4.1.4. Inicialmente foi realizada a digestão do plasmídio pBADMyHisB. A reação de digestão foi composta de 12  $\mu$ g do plasmídio pBADMyHisB, 20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 120 U de *Xho*I (Invitrogen, EUA) e água ultra pura suficiente para completar 240  $\mu$ L. A reação de digestão foi incubada a 37°C por 6 h. Após o período, o produto da digestão enzimática foi purificado com o kit GFX™ DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, EUA) conforme o protocolo do fabricante. Uma alíquota de 1  $\mu$ L do produto da reação de digestão do plasmídio pBADMyHisB foi avaliada por meio de uma eletroforese em gel de agarose. Após a avaliação da concentração e especificidade do produto da reação de digestão, o plasmídio pBADMyHisB digerido com a enzima de restrição *Xho*I, de agora em diante nomeado de pBADMyHisB\_*Xho*I, foi digerido enzimaticamente com a enzima de restrição *Kpn*I. Para tanto, foi realizada uma reação de digestão contendo 8  $\mu$ g do pBADMyHisB\_*Xho*I, 20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 80 U de *Kpn*I (Invitrogen, EUA) e quantidade suficiente de água ultra pura para completar 120  $\mu$ L. A reação foi incubada a 37°C por 4 h. Posteriormente, o produto da reação de digestão enzimática foi purificado com o kit e avaliado por meio de eletroforese.

A digestão enzimática do amplicon *vioABCD* foi realizada de forma semelhante a do plasmídio pBADMyHisB. Na primeira etapa da digestão a reação foi composta de 8,4  $\mu$ g do amplicon *vioABCD*, 10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de KCl, 0,1 mg/mL de BSA, 84 U da enzima *Xho*I (Fermentas, Canadá) e água ultra pura suficiente para completar 240  $\mu$ L. A reação foi incubada a 37°C por 6 h. O produto da reação de digestão foi purificado e a concentração do DNA e especificidade da digestão enzimática foram avaliadas por meio de uma eletroforese em gel de agarose. Na segunda etapa da reação de digestão, o amplicon *vioABCD*\_XhoI foi digerido com a enzima de restrição

*KpnI*. A reação foi composta por 7,5 µg do amplicon *vioABCD\_XhoI*, 20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 45 U de *KpnI* (Invitrogen, EUA) e quantidade suficiente de água ultra pura para completar 120 µL. A reação foi incubada a 37°C por 4 h. O produto da reação de digestão foi purificado com a utilização do kit GFX™ DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, EUA), conforme o protocolo do fabricante. A concentração e especificidade da digestão foram avaliadas por meio de uma eletroforese em gel de agarose, como descrito acima, e condições de eletroforese de 70 V e 70 mA por 30 min.

#### **4.2.4. Ligação enzimática do amplicon *vioABCD* ao plasmídio pBADMyHisB**

Foram realizados seis tratamentos nas reações de ligação. Em cada reação foram utilizadas diferentes relações de plasmídio e inserto. As relações utilizadas foram: 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:0 (controle) de plasmídio e inserto, respectivamente. Cada reação foi composta de 0,5 U de T4 DNA ligase, 50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de ATP, 1 mM de DDT, 5% (m/v) de polietilenoglicol 8000, 12 ng do plasmídio pBADMyHisB digerido com *XhoI* e *KpnI* como descrito no item 4.2.3, diferentes massas do operon *vioABCD* digerido obtido no item 4.2.3 e quantidade suficiente de água ultra pura para completar 20 µL. As massas do operon *vioABCD* digerido utilizadas foram 10,875 ng, 21,75 ng, 43,5 ng, 65,25 ng, 87 ng e 0 ng, para as reações com proporções de 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:0 (controle), respectivamente. Os cálculos realizados para a determinação da massa de DNA correspondente a determinada quantidade de moléculas foram baseados no número de nucleotídeos presentes no vetor e no amplicon.

Antes da adição da T4 DNA Ligase e do ATP, cada uma das reações de ligação foi aquecida a 45°C por 5 min e resfriada a 0°C por 5 min. Após a adição da T4 DNA Ligase e do ATP, as reações foram incubadas a 14°C por 18 h até o momento em que foram utilizadas nos procedimentos de transformação.

#### **4.2.5. Transformação da *E. coli* DH10B com o produto da ligação do amplicon *vioABCD* ao plasmídio pBADMyHisB (plasmídio pBvioABCD)**

Aliquotas de 10 µL dos produtos das reações de ligação foram utilizados para transformar células competentes da bactéria *E. coli* DH10B. Os procedimentos de obtenção de células competentes e transformação foram realizados como descrito nos itens 7.10 e 7.11 dos Anexos, respectivamente, porém as células transformantes foram inoculadas em meio de cultura com suplementação de 0,1 ou 0,005% (m/v) de L-arabinose. Após o período de incubação foi avaliado o surgimento de colônias com coloração roxa indicando produção de violaceína.

Posteriormente foram realizados experimentos visando avaliar se a inserção dos genes no plasmídio ocorreu corretamente. Foram selecionados seis transformantes que foram cultivados e tiveram seus plasmídios extraídos, como descrito no item 4.2.2. Aliquotas dos produtos das extrações foram digeridas com a enzima de restrição *HindIII* visando avaliar o comprimento dos plasmídios que mais se aproximava do comprimento previsto computacionalmente para o produto da ligação do operon *vioABCD* ao plasmídio pBADMyHisB. As reações de digestão foram compostas de 5 µL dos plasmídios extraídos, 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de NaCl, 5 U de *HindIII* e quantidade suficiente de água ultra pura para 10 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 1,5 h. Os produtos das digestões enzimáticas foram avaliados por meio de uma eletroforese em gel de agarose, como descrito no item 7.12. Foi utilizado tampão TEB (item 7.9.3) em vez do tampão TAE na eletroforese.

Os plasmídios que apresentaram comprimentos próximos ao verificado computacionalmente pela ligação do operon *vioABCD* ao plasmídio pBADMyHisB foram utilizados como DNA molde em uma reação de PCR para a amplificação do gene *vioC*. Este teste foi realizado para avaliar a presença do gene *vioC* no plasmídio pBADMyHisB como indicio da inserção do operon *vioABCD* neste plasmídio. Cada reação de PCR foi composta por 0,5 µL dos produtos das extrações dos plasmídios descritas acima e diluições de 1:9 e 1:19. Como controle positivo, foi utilizado como DNA alvo 0,5 µL do produto da primeira reação de PCR realizada com o operon *vioABCD*, descrito no item 4.2.1. Foram

utilizados 500 nM do iniciador adiante 5'GCTGATGTTTCGCGATGATGG3', 500 nM do iniciador reverso 5'GGCTGAATCCGCAGTTCCTG3' (Demétrio, 2006), 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de dNTPs, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3,98% (v/v) de dimetil sulfoxido e quantidade suficiente de água ultra pura para completar 10 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 94°C por 3 min, 25 ciclos de 94°C por 30 s e 69°C por 3,75 min, extensão final a 72°C por 6 min e resfriamento a 10°C até o momento em que os tubos foram acondicionados a -20°C. Posteriormente, alíquotas de 5 µL do produto das reações de PCR foram avaliados por meio de uma eletroforese em gel de agarose, como descrito no item 7.12. Foi utilizado tampão TEB (item 7.9.3) em vez do tampão TAE na eletroforese.

Os plasmídios dos transformantes a partir dos quais foi possível a amplificação do gene *vioC*, foram selecionados para serem seqüenciados (seqüenciamento realizado pela empresa Macrogen, Coréia). Os iniciadores utilizados nas reações de seqüenciamento foram o BAD adiante 5'ATGCCATAGCATTTCATCC3' e o BAD reverso 5'GATTTAATCTGTATCAGG3' (Invitrogen). Dessa forma, foi possível avaliar se a inserção do amplicon *vioABCD* ocorreu de forma correta no plasmídio pBADMyHisB. Os plasmídios em que foi verificada a inserção correta, foram finalmente utilizados como DNA alvo para a amplificação do operon *vioABCD* com iniciadores internos, como descrito no item 4.2.1. Os produtos das amplificações foram avaliados por meio de uma eletroforese em gel de agarose (item 7.12) para a avaliação da formação de produtos com o comprimento esperado para o operon *vioABCD*. O plasmídio a partir do qual foi possível a amplificação de um fragmento com o tamanho esperado para o operon *vioABCD* foi nomeado de pBvioABCD. A *E. coli* DH10B portadora deste plasmídio foi adicionada de 25% (v/v) de glicerol, congelada em nitrogênio líquido e estocada a -80°C.

#### **4.2.6. Extração, digestão enzimática e desfosforilação do plasmídio pBvioABCD**

O plasmídio pBvioABCD foi extraído da *E. coli* DH10B obtida na etapa anterior com o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA) segundo o protocolo do fabricante. O produto da extração foi avaliado por meio de uma eletroforese em gel de

agarose, como descrito no item 7.12. Foi utilizado tampão TEB (item 7.9.3) em vez do tampão TAE na eletroforese. Este plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição *KpnI*, visando a posterior inserção do gene *vioE* à jusante do gene *vioD*. A reação de digestão foi composta por 10 µg do plasmídeo pBvioABCDE, 20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 60 U de *KpnI* (Invitrogen, EUA) e quantidade suficiente de água para completar 120 µL. A reação foi incubada por 3 h a 37°C. Posteriormente, o produto da reação de digestão foi purificado com a utilização do kit GFX<sup>TM</sup> DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, EUA) e a concentração do plasmídeo digerido foi avaliada por meio de uma eletroforese em gel de agarose, como descrito acima. Para melhorar a eficiência (evitar o reanelamento) da ligação do gene *vioE* ao pBvioABCD, este plasmídeo foi desfosforilado com a utilização da enzima fosfatase alcalina. A reação de desfosforilação foi composta de 5,3 µg do plasmídeo pBvioABCDE digerido com a enzima *KpnI*, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de fosfatase alcalina (Fermentas, Canadá) e quantidade suficiente de água para 60 µL. A reação foi incubada a 37°C por 30 min, e então purificada com o kit GFX<sup>TM</sup> DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, EUA). A concentração do plasmídeo desfosforilado foi avaliada por meio de uma eletroforese em gel de agarose.

#### 4.2.7. Amplificação e digestão enzimática do gene *vioE*

Visando obter quantidade suficiente do gene *vioE* para clonagem no plasmídeo pBvioABCD, este gene foi amplificado por meio uma PCR a partir do DNA genômico da *C. violaceum* ATCC 12472. A reação de PCR foi composta por 1 µL da extração do DNA genômico de *C. violaceum* diluído 20 vezes, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl, 500 nM do iniciador *vioE* adiante 5'GCGCTGGTACCTGCAACGCTGAGGAG3', 500 nM do iniciador *vioE* reverso 5'CGAAAGGTACCCCGTTTTTCTGCCCGAT3', 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA), 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 4,975% (v/v) de dimetil sulfóxido e água suficiente para 20 µL. Foram realizadas 20 reações de PCR. O programa utilizado no termociclador foi de 95°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s e 68°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 5 min. O produto da PCR foi avaliado por meio de eletroforese em gel agarose, como descrito no item 7.12, e purificado por meio

do kit GFX™ DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences EUA). Foi utilizado tampão TEB (item 7.9.3) em vez do tampão TAE na eletroforese. Após a purificação, a concentração do amplicon contendo a *ORF* do gene *vioE* foi avaliada por meio de uma eletroforese em gel de agarose. A *ORF* do gene *vioE* foi então digerida com a enzima de restrição *KpnI*. A reação de digestão foi composta de 6,975 µg do gene *vioE* obtido na PCR, 20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 40 U de *KpnI* (Invitrogen, EUA) e quantidade suficiente de água para completar 120 µL. A reação foi incubada por 4 h a 37°C, e então purificada com o kit GFX™ DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, EUA). A concentração do amplicon *vioE* digerido foi avaliada por meio de uma eletroforese.

#### **4.2.8. Ligação do gene *vioE* ao plasmídio pBvioABCD e transformação da *E. coli* DH10B**

Visando obter o plasmídio resultante da inserção da *ORF* do gene *vioE* no plasmídio pBvioABCD foram realizadas reações de ligação com proporções de vetor e inserto de 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3, respectivamente. As reações foram compostas de 213 ng de pBvioABCD digerido com *KpnI* e desfosforilado, 50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de ATP, 1 mM de DDT, 5% (m/v) de polietilenoglicol 8000 e 1 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen, EUA). As reações com proporções de 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3, foram adicionadas de 0, 12,26, 24,52 e 36,78 ng do amplicon *vioE* digerido com *KpnI*, respectivamente. Os volumes das reações de ligação foram ajustados para 20 µL com água ultra pura e estas foram incubadas por 18 h a 14°C. Após o período, alíquotas de 10 µL do produto das reações de ligação foram utilizadas para transformar a *E. coli* DH10B, como descrito no item 7.11. O produto da transformação foi inoculado em meio de cultura LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e concentrações de L-arabinose de 0, 0,1, 0,01 ou 0,001% (m/v). Os meios inoculados foram incubados a 37°C por 21 h. Após o período foi avaliado o surgimento de colônias transformantes capazes de produzir violaceína de forma a alterar a pigmentação original da *E. coli* DH10B. As colônias transformantes cultivadas em meio de cultura sem L-arabinose, foram repicadas em duas placas mestras numeradas contendo meio de cultura LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. Em

uma das placas foi adicionado 0,01% (m/v) de L-arabinose. Dessa forma foi possível determinar qual colônia apresentou maior intensidade de pigmentação devido à produção de violaceína, e a partir da cultura não induzida, pode-se fazer um estoque dessa bactéria garantindo que nesta nunca ocorreu indução para produção de violaceína. As culturas foram incubadas a 37°C por 21 h, e então foi avaliada a produção de violaceína no meio de cultura que foi suplementado com L-arabinose. A colônia na qual se observou maior intensidade de pigmentação no meio de cultura contendo L-arabinose, foi repicada a partir do meio sem suplementação de L-arabinose em 5 mL de meio de cultura LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina, e incubada a 37°C por 21 h e 150 rpm. Uma alíquota de 750 µL de desta cultura foi adicionada de 250 µL de glicerol estéril e congelada em nitrogênio líquido. Após o congelamento as células foram armazenadas a -80°C. O restante da cultura foi utilizado para a extração do plasmídio pBvioABCDE (kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA)). Uma alíquota de 1 µL da extração do plasmídio pBvioABCDE foi utilizada para transformar a bactéria *E. coli* TOP10, como descrito no item 7.11. Esta bactéria, referida como *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi estocada a -80°C, como descrito acima.

#### **4.2.9. Determinação do meio de cultura e da concentração de L-arabinose para indução da produção de violaceína em *Escherichia coli* TOP10 (pBvioABCDE)**

A bactéria *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi cultivada em diferentes concentrações de L-arabinose e em diferentes meios de cultura com intuito de se determinar a concentração de indutor apropriada à síntese de violaceína. Para tanto, este microrganismo foi inoculado em meio de cultura LB sólido, suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubado a 37°C por 18 h. Uma colônia isolada desta cultura foi inoculada em 5 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e cultivada a 37°C por 24 h a 150 rpm. Alíquotas de 50 µL desta cultura foram utilizadas como inóculo. Foram utilizados os meios de cultura LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, e meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina acrescido de 1% (v/v) de glicerol. Cada

alíquota do inóculo foi adicionada a 5 mL dos diferentes meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de L-arabinose. Foram realizados quatro tratamentos em triplicata, nos quais foram adicionados 0, 0,01, 0,1 e 1% (m/v) de L-arabinose a cada um dos dois meios de cultura utilizados. Os tubos foram incubados a 37°C por 20 h a 150 rpm. Após o cultivo, a massa seca e a concentração de violaceína foram determinadas. Para a determinação da massa seca, 3 mL de cada cultura foram precipitados a 10000·g por 3 min. Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de água destilada e novamente precipitados a 10000·g por 3 min. O sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Os precipitados foram secos a 85°C até peso constante. Antes da avaliação da massa seca dos tubos contendo os precipitados, estes foram acondicionados em dessecador por 1 h e posteriormente pesados em balança analítica (AB204, Mettler Toledo). Para a avaliação da concentração de violaceína do extrato bruto, 750 µL das culturas foram precipitados em microtubos de 1,5 mL por centrifugação a 10000·g por 3 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em 100 µL de etanol e 50 mg de sílica, e agitados por 1 min. Posteriormente, 900 µL de etanol foram adicionados a cada um dos tubos. Cada tubo foi agitado por 1 min e novamente centrifugado a 10000·g por 3 min. Amostras de 500 µL dos sobrenadantes contendo o extrato bruto de violaceína foram avaliados em espectrofotômetro a 575 nm. A concentração de violaceína de cada amostra foi determinada com auxílio do coeficiente de extinção desta em etanol ( $\epsilon = 2,97 \cdot 10^{-2} \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Rettori, 1996).

#### **4.2.10. Avaliação da instabilidade da produção de violaceína por *E. coli***

A avaliação da instabilidade da produção de violaceína por *E. coli* contendo o plasmídeo pBvioABCDE (*E. coli* TOP10 (pBvioABCDE)) foi realizada por meio de quatro repiques deste microrganismo, em meios de cultura líquidos com diferentes concentrações de L-arabinose. Para cada um dos repiques, foi avaliada a massa seca, concentração de violaceína, a porcentagem e morfologia das colônias produtoras de violaceína.

Inicialmente a *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi inoculada em meio de cultura LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, a partir de um estoque conservado a -

80°C, e incubada a 37°C por 24 h. Uma colônia isolada dessa cultura foi inoculada em 6 mL de meio de cultura LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 3% (v/v) de glicerol, e cultivada a 37°C por 24 h e 150 rpm. Alíquotas de 60 µL desta cultura foram utilizadas como inóculo para o primeiro repique. Foram realizados três tratamentos por repique, nos quais foram utilizadas diferentes concentrações de L-arabinose. Cada tratamento consistiu de três replicas contendo 6 mL de meio de cultura LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 3% (v/v) de glicerol e L-arabinose nas concentrações de 0; 0,001 ou 1% (m/v). Os três tratamentos do primeiro repique foram cultivados por 24 h a 37°C e 150 rpm. Após o período, as culturas obtidas foram utilizadas como inóculo para o segundo repique em meios de cultura com as mesmas composições. Dessa forma, foram realizados repiques sucessivos das culturas de cada tratamento totalizando quatro repiques.

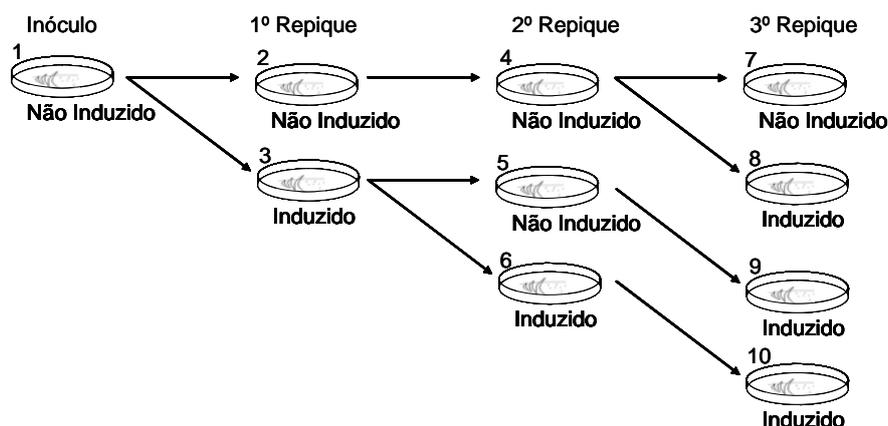
Para cada um dos repiques foram avaliadas as concentrações de violaceína e massa seca de cada um dos tratamentos, como descrito no item 4.2.9. A avaliação da porcentagem de colônias produtoras de violaceína dos repiques foi realizada da seguinte forma. Amostras de 100 µL das culturas de cada repique foram diluídas serialmente em solução de 0,85% (m/v) de NaCl, e alíquotas de 200 µL das diluições foram inoculadas em meio de cultura LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 3% (v/v) de glicerol e 0,01% (m/v) de L-arabinose, e cultivadas por 24 h a 37°C. Após o período, o número de colônias produtoras de violaceína foi avaliado. A morfologia das colônias foi avaliada por meio de microscópio óptico em aumento de 40×.

A avaliação da instabilidade do plasmídeo pBvioABCDE durante a produção de violaceína em *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi realizada inicialmente por meio de repiques sucessivos deste microrganismo em meio de cultura LB sólido com adição de ampicilina 100 µg/mL. A bactéria *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi inoculada em meio de cultura LB sólido suplementado com ampicilina 100 µg/mL e incubada por 24 h a 37°C. Esta cultura foi utilizada como inóculo para o primeiro repique. Foram realizados três repiques em meio de cultura suplementado com L-arabinose 0,01% (m/v), sem suplementação de L-arabinose e em meio de cultura com suplementação alternada de L-arabinose 0,01% (m/v) entre os repiques, como apresentado na Figura 7. As culturas do primeiro repique foram usadas como inóculo para o segundo repique, e as culturas do segundo repique foram utilizadas como inóculo para o terceiro. Cada uma das culturas dos

repiques 1, 2 e 3 foi incubada por 24 h a 37°C. Os 10 tratamentos obtidos nos três repiques, foram identificados pela numeração sobre as placas de Petri apresentadas na Figura 7. A pigmentação das colônias obtidas em cada um dos tratamentos foi avaliada visualmente.

#### **4.2.11. Avaliação da instabilidade do plasmídeo pBvioABCDE em *E. coli* TOP10**

A avaliação da instabilidade da produção de violaceína por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) em meio de cultura líquido foi realizada da seguinte forma. Inicialmente, este microrganismo foi inoculado em meio de cultura LB sólido suplementado com ampicilina 100 µg/mL e incubado por 24 h a 37°C. Uma colônia isolada desta cultura foi inoculada em 5 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubada por 24 h a 37°C e agitação de 150 rpm. Posteriormente, 50 µL da cultura obtida foram inoculados em 5 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina 100 µg/mL e L-arabinose 0,1% (m/v) e a cultura foi incubada por 24 h a 37°C e 150 rpm. O procedimento de coletar uma alíquota de 50 µL da última cultura em meio líquido obtida, inocular esta em 5 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 0,1% (m/v) de L-arabinose e incubar por 24 h a 37°C e 150 rpm, foi realizado por mais três vezes, totalizando quatro repiques. Cada uma das culturas dos quatro repiques realizados foi avaliada visualmente quanto à produção de violaceína. O perfil de digestão dos plasmídios obtidos a partir da cultura utilizada como inóculo e da cultura obtida no quarto repique, foram avaliados por meio da digestão destes com a enzima restrição *RsaI* e posterior avaliação do produto da digestão em uma eletroforese em gel de agarose (item 7.12). A extração de plasmídios foi realizada com o kit PureLink™



**Figura 7.** Esquema do experimento de repiques em meio sólido. Todos os repiques foram realizados em meio de cultura LB sólido suplementado com ampicilina 100 µg/mL. Nas culturas induzidas foi adicionado L-arabinose 0,01% (m/v) ao meio de cultura. No primeiro repique, a cultura inóculo da bactéria *Escherichia coli* (pBvioABCDE) (tratamento 1) foi inoculada nos tratamentos 2 e 3, e estes foram incubados por 24 h a 37°C. No segundo repique, a cultura do tratamento 2 foi inoculada no tratamento 4, e a cultura do tratamento 3 foi inoculada nos tratamentos 5 e 6. Os tratamentos inoculados foram incubados por 24 h a 37°C. No terceiro repique a cultura do tratamento 4 foi inoculada nos tratamentos 7 e 8, a cultura do tratamento 5 foi inoculada no tratamento 9 e a cultura do tratamento 6 foi inoculada no tratamento 10. Os tratamentos inoculados foram incubados por 24 h a 37°C.

Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA) segundo o protocolo do fabricante. Os plasmídios extraídos a partir da cultura inóculo e da cultura do quarto repique, foram novamente transformados em *E. coli* TOP10, e o produto da transformação foi inoculado em meio de cultura LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 0,01% (m/v) de L-arabinose e incubado por 18 h a 37°C. As colônias transformantes obtidas foram avaliadas visualmente quanto à produção de violaceína.

#### 4.2.12. Análise da violaceína produzida por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE)

A violaceína produzida pela *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi extraída, purificada por cromatografia de camada delgada e analisada por meio de espectrometria no UV-VIS. Para tanto, um estoque desta bactéria conservada à -80°C foi inoculado em meio de cultura LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e cultivada por 24 h a 37°C. Uma colônia isolada desta cultura foi inoculada em 10 mL de meio de cultura LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e cultivada por 24 h a 37°C a 150 rpm. Cinco mililitros desta cultura foram inoculados em 500 mL de meio de cultura LB suplementado com 100 µg/mL

de ampicilina, 3% (m/v) de glicerol e 1% (m/v) de L-arabinose a 37°C por 24 h 150 rpm. Após o período, a produção de pigmentos foi avaliada visualmente, e então a cultura foi precipitada por centrifugação a 4000·g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi congelado. O precipitado congelado foi então liofilizado a -45°C sob vácuo de 0,25 mBar (LP3, Jouan) e armazenado ao abrigo da luz.

O extrato bruto contendo a violaceína foi obtido da seguinte forma. O precipitado de células liofilizado foi acondicionado em um tubo de fundo cônico de 50 mL, adicionado de 20 mL de acetato de etila (Oliveira, 2006) e submetido a um agitador de tubos por 1 min. O tubo foi centrifugado a 4000·g por 10 min, e a fase superior contendo a violaceína foi transferida para outro tubo. Este procedimento foi realizado várias vezes até que o precipitado celular tornou-se claro. O extrato bruto contendo violaceína foi adicionado de água ultra pura (relação de 1:1 dos volumes de água ultra pura e do extrato contendo violaceína) e submetido ao agitador de tubos por 1 min. Em seguida este foi centrifugado a 4000·g por 10 min e a fase superior contendo o extrato bruto de violaceína foi transferida para um novo tubo e acondicionada a -20°C.

Este foi então purificado por meio de cromatografia de camada delgada. Foram utilizadas placas de sílica gel (Merck, 60 F<sub>254</sub>) de 6 × 10 cm. A fase móvel utilizada foi metanol 99,9% (v/v) (Oliveira, 2006). A amostra foi aplicada na placa por meio de um tubo capilar. Foram adicionadas várias alíquotas do extrato bruto da violaceína de forma a se formar uma linha de coloração homogênea. A lâmina foi então incubada em uma cuba previamente saturada com metanol. Após a realização deste procedimento a banda de coloração violeta obtida foi cortada da placa e seu conteúdo foi raspado em um novo tubo de fundo cônico. Este material foi solubilizado em 3 mL de etanol 96% (v/v) e centrifugado a 5000·g por 3 min. O sobrenadante contendo a violaceína foi transferido para um novo tubo que foi acondicionado a -20°C.

O extrato alcoólico da violaceína purificada por cromatografia em camada delgada foi então avaliado por meio de espectrometria de UV-VIS. Foi utilizado um espectrofotômetro UV - 160A (Shimadzu). Os parâmetros utilizados na análise foram: início da varredura em 200 nm e final em 800 nm, em intervalos de 5 nm. O espectro obtido foi comparado aos dados da literatura (Rettori, 1996).

#### **4.2.13. Cinética de crescimento e produção de violaceína em *Escherichia coli* TOP10 (pBvioABCDE)**

A cinética de crescimento e produção de violaceína da *Escherichia coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi realizada da seguinte forma. Inicialmente, esta bactéria foi inoculada em meio de cultura LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina a partir de um estoque conservado a -80°C, e incubada a 37°C por 24 h. Uma colônia isolada desta cultura foi inoculada em 30 mL de meio de cultura LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, e incubada a 37°C por 18 h e 150 rpm. Alíquotas de 2 mL desta cultura foram utilizadas como inóculo para os tratamentos realizados. Foram realizados três tratamentos em triplicata. Cada tratamento foi composto por 200 mL de meio de cultura LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 3% (m/v) de glicerol. O primeiro tratamento foi suplementado com 1% (m/v) de L-arabinose no início da cultura, o segundo foi suplementado com 1% (m/v) de L-arabinose na quinta hora de cultivo e o terceiro não recebeu suplementação de L-arabinose. Os tratamentos foram incubados a 37°C por 33 h e 150 rpm. Amostras foram coletadas de cada tratamento, em diferentes intervalos. Foram realizadas análises da massa seca e da concentração de violaceína para cada amostra coletada, como descrito no item 4.2.9.

## **CAPÍTULO 5 - Resultados e Discussões**

---

### **5.1. Procedimentos Computacionais**

#### **5.1.1. Determinação dos sítios de restrição presentes no plasmídio pBADMyHisB e no operon *vioABCD***

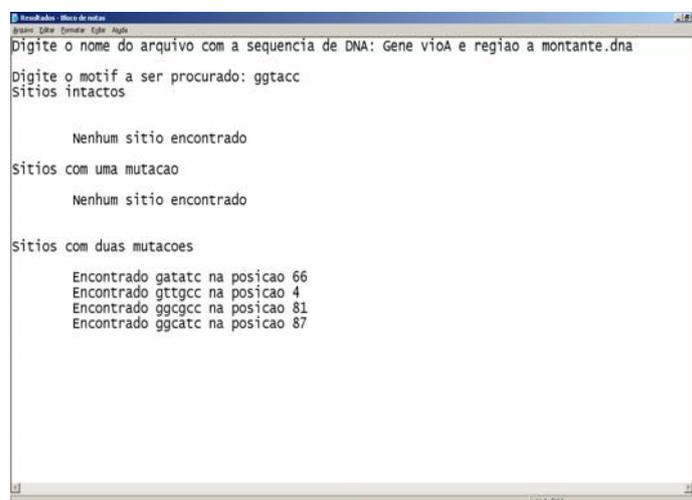
Como resultado da busca por sítios de restrição no sítio de restrição múltipla do plasmídio pBADMyHisB foram encontradas as posições dos sítios de restrição descritos pelo fabricante. Na seqüência nucleotídica do operon *vioABCD* e regiões adjacentes não foram encontrados os sítios de restrição para as enzimas *KpnI* e *XhoI*. Verificou-se também que existiam apenas três enzimas que apresentam um único local de corte no operon *vioABCD*, as enzimas *HindIII*, *SacI* e *XbaI*. Este fato sugeriu que estas enzimas poderiam ser prováveis candidatas para a clonagem do operon *vioABCD* no plasmídio pBADMyHisB, contudo, o local de corte destas enzimas situa-se na região codificante do *vioABCD*, impedindo a clonagem do operon inteiro. Dessa forma, partiu-se para uma abordagem diferente para a seleção de sítios de restrição. Foram procurados sítios de restrição não intactos, mas parcialmente conservados, como descrito no item 5.1.2.

#### **5.1.2. Busca por sítios de restrição parcialmente conservados**

Os únicos sítios de restrição presentes no sítio de restrição múltipla do plasmídio pBADMyHisB que não apresentavam mais de um local de clivagem e não estavam localizados nas regiões codificantes do operon *vioABCD* foram os sítios de restrição para as enzimas *KpnI* e *XhoI*. Dessa forma, estes dois sítios de restrição foram selecionados para a busca por sítios de restrição parcialmente conservados.

As seqüências de DNA GGTACC e CTCGAG são as seqüências dos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas de restrição *KpnI* e *XhoI*, respectivamente. Estes dois sítios de restrição e suas variações foram procurados nas seqüências de DNA do gene *vioA* e sua região à montante e da região à jusante do gene *vioD*. Nestas regiões estão as

seqüências descritas no item 4.1.3. A Figura 8 apresenta um dos resultados gerados pelo programa.



**Figura 8.** Resultados da busca pelo sítio de restrição ggtacc da enzima *KpnI* na seqüência de DNA contida no gene *vioA* e região à montante. Foram encontrados quatro sítios com mutações em duas posições.

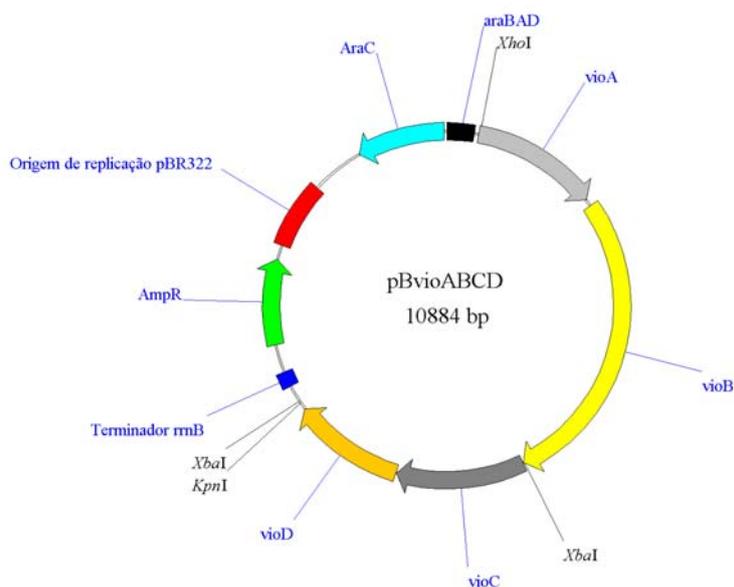
Todos os resultados da busca por sítios de restrição parcialmente conservados estão apresentados na Tabela 1. As combinações de pares de sítios de restrição parcialmente conservados foram testadas visando avaliar o ajuste dos quadros de leitura.

**Tabela 1.** Sítios de restrição parcialmente conservados localizados pelo programa desenvolvido.

Seqüências avaliadas	Sítios parcialmente conservados localizados nas regiões dos genes <i>vioA</i> e <i>vioD</i> <sup>a</sup>			
	<i>KpnI</i> , GGTACC		<i>XhoI</i> , CTCGAG	
	Alteração em uma posição	Alterações em duas posições	Alteração em uma posição	Alterações em duas posições
Gene <i>vioA</i> e região à montante		GATATC (66) GTTGCC (4) GGCGCC (81) GGCATC (87)		TTCGCG (45) CGTGAG (20) CGCGCG (9) CGCGAT (47)
Região à jusante do gene <i>vioD</i>	GGAACC (21)	CGTACT (65) GCTGCC (33) GGGAAC (20)	CTGGAG (45) CTGGAG (69)	

<sup>a</sup> As posições dos sítios localizados estão indicadas pelos números entre parênteses.





**Figura 10.** Plasmídeo pBvioABCD. Este plasmídeo foi criado pela ligação dos genes *vioABCD* ao plasmídeo pBADMycHisB.

### 5.1.3. Desenho de iniciadores para clonagem direcional do operon *vioABCD* no plasmídeo pBADMycHisB

Os iniciadores adiante e reverso selecionados para a amplificação do *vioABCD* por meio da PCR foram 5'AGGACATTCTCGAGGAAGCATTCTTCCGATATCTG3' e 5'ACTCCGGTACCACACATAGGCGCTGCTC3', respectivamente. O iniciador adiante possui duas mutações que permitiram a inserção do sítio para a enzima de restrição *XhoI*. O iniciador reverso possui duas mutações que permitiram a inserção do sítio para a enzima de restrição *KpnI*. Os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *XhoI* e *KpnI* estão sublinhados nos iniciadores adiante e reverso, respectivamente.

A análise computacional dos parâmetros físico-químicos dos iniciadores demonstrou que não ocorreu formação de estruturas secundárias, como apresentado na Tabela 2. A porcentagem de CG dos iniciadores ficou dentro dos limites sugeridos na literatura. A diferença das  $T_m$ 's dos iniciadores adiante e reverso foi de 0,3°C, assegurando que a ligação dos iniciadores ao DNA molde ocorra praticamente simultaneamente. Este fato contribuiu para não ocorrência de produtos inespecíficos. O programa sugeriu a

realização de um PCR com temperatura de extensão de 70°C e de desnaturação de 94°C. As temperaturas sugeridas pelo programa foram utilizadas nos primeiros experimentos de amplificação dos genes *vioABCD*.

**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos obtidos para os iniciadores adiante e reverso selecionados para a amplificação dos genes *vioABCD*.

Iniciadores	Comprimento (nt)	T <sub>m</sub> (°C)	CG (%)	Diferença da T <sub>m</sub> entre produto e iniciador (°C)	Diferença da T <sub>m</sub> entre os iniciadores (°C)	Formação de estruturas secundárias
Adiante	35	85,0	45,7	12,4	0,3	N. D. <sup>a</sup>
Reverso	28	85,3	60,7	12,1		N. D. <sup>a</sup>

<sup>a</sup>N. D. = Não detectada.

#### 5.1.4. Desenho de iniciadores para clonagem do gene *vioE* no plasmídio pBvioABCD

Com intuito de se obter um plasmídio capaz de expressar os cinco genes necessários à biossíntese da violaceína foi realizado o desenho de iniciadores para a amplificação do gene *vioE*. A amplificação deste gene permitiu sua posterior inserção no plasmídio pBvioABCD. Os cinco genes do operon *vio* não foram clonados de uma única vez porque no momento em que este estudo estava sendo realizado ainda não se tinha conhecimento da existência do gene *vioE*, como explicado em maiores detalhes no item 5.2.2.

O sítio para a enzima de restrição *KpnI* foi o selecionado para a clivagem do DNA visando a inserção do gene *vioE* no plasmídio pBvioABCD. O iniciador reverso utilizado para a amplificação dos genes *vioABCD* (item 5.1.3), foi desenhado de forma a se ligar na região à jusante do gene *vioD*. Como o gene *vioE* ocorre imediatamente à jusante do gene *vioD*, este iniciador se ligou em uma região interna do gene *vioE*, fazendo com que a região inicial do gene *vioE* fosse inserida no plasmídio pBvioABCD. Devido a este fato, optou-se por desenhar um iniciador adiante para que o gene *vioE* se ligasse no final do gene *vioD*. Este iniciador foi projetado de forma que a região do início do gene *vioE* que foi incluída no plasmídio pBvioABCD não interferisse na expressão do gene *vioE* completo que seria inserido à montante. Assim, foi possível inserir o terminador do gene *vioD* à montante do

amplicon contendo o gene *vioE*, para que o início do gene *vioE* presente no plasmídeo pBvioABCD possuísse um terminador de tradução. Isso impediria que a região inicial do gene *vioE* presente no plasmídeo pBvioABCD fosse reconhecida pelo ribossomo, que traduziria este início juntamente com o gene *vioE* intacto inserido à jusante, evitando a formação de uma proteína quimérica. A posição de ligação do iniciador adiante do gene *vioE* foi determinada de forma que, após a inserção do amplicon contendo o gene *vioE* no pBvioABCD, os quadros de leitura do fragmento inicial do gene *vioE* presente no pBvioABCD e do final do gene *vioD* presente no início do amplicon contendo o gene *vioE* fossem os mesmos. Dessa forma, existe a possibilidade de que a construção resultante expresse um pequeno peptídeo formado pelos aminoácidos do início do gene *vioE* e os do final do gene *vioD*. Esta estratégia permitiu que todos os genes do plasmídeo pBvioABCDE, resultante da ligação do gene *vioE* ao pBvioABCD, apresentassem todos os elementos necessários à correta expressão.

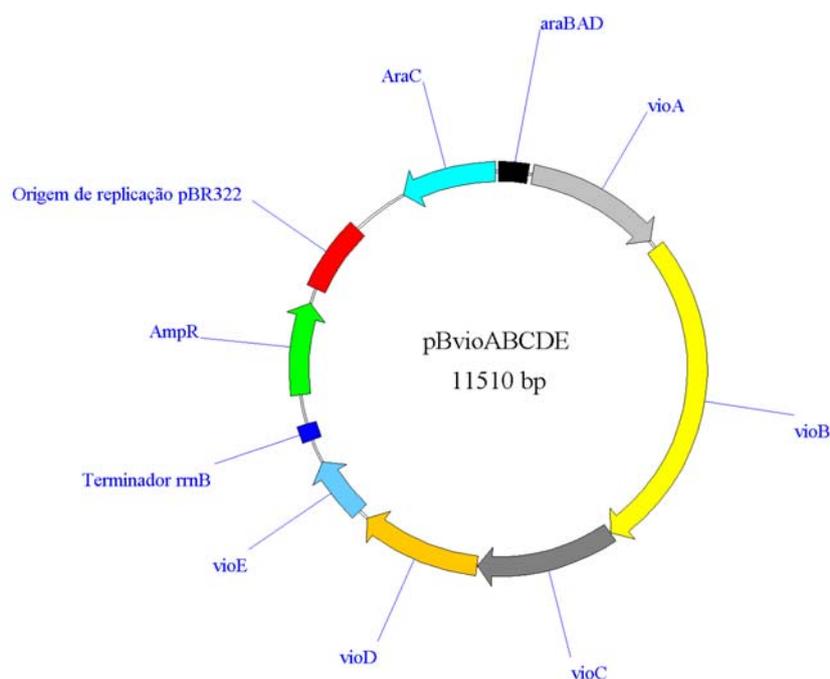
Os iniciadores adiante e reverso utilizados para a amplificação do gene *vioE* foram 5'GCGCTGGTACCTGCAACGCTGAGGAG3' e 5'CGAAAGGTACCCCGTTTTTCTGCCCGAT3', respectivamente. O sítio de restrição da enzima *KpnI* está sublinhado nos iniciadores. Os resultados dos parâmetros físico-químicos avaliados para estes iniciadores ficaram dentro das recomendações da literatura, como apresentado na Tabela 3. Foi necessária a inserção de cinco mutações no iniciador adiante do gene *vioE* para permitir o posicionamento correto deste gene no plasmídeo pBvioABCD. Como resultado da inserção do gene *vioE* no plasmídeo pBvioABCD foi obtido o plasmídeo pBvioABCDE, apresentado na Figura 11.

**Tabela 3.** Parâmetros físico-químicos dos iniciadores desenhados para a amplificação do gene *vioE*.

Iniciadores	Comprimento (nt)	T <sub>m</sub> (°C)	CG (%)	Diferença da T <sub>m</sub> entre produto e iniciador (°C)	Diferença da T <sub>m</sub> entre os iniciadores (°C)	Formação de estruturas secundárias
Adiante	26	86,5	65,4	11,3	1,0	N. D. <sup>a</sup>
Reverso	28	85,5	53,6	12,3		N. D. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> N. D. = Não detectada.

A utilização de apenas uma enzima de restrição tornou possível a ligação do gene *vioE* ao plasmídio pBvioABCD em duas orientações possíveis. Uma orientação permitiu que o gene *vioE* fosse traduzido apropriadamente, e que o fragmento do gene *vioE* presente no final do gene *vioD* não interferisse na tradução do gene *vioE* completo inserido à montante, a outra orientação possível fez com que o gene *vioE* fosse aparentemente funcional. Entretanto, existia a possibilidade de que o fragmento do gene *vioE* previamente amplificado com o operon *vioABCD* também pudesse ser utilizado como início para tradução de uma proteína formada pelo início do gene *vioE*, e que aproximadamente 75% dos nucleotídeos da porção final do gene *vioE* completo fosse inserido à montante. Esta proteína seria traduzida em um quadro de leitura diferente do utilizado pelo gene *vioE*



**Figura 11.** Plasmídio pBvioABCDE. Este plasmídio foi obtido pela ligação do gene *vioE* ao plasmídio pBvioABCD.

intacto. Pela análise das simulações computacionais, esta proteína quimérica possuiria 171 aminoácidos. A tradução simultânea desta proteína e da proteína codificada pelo gene *vioE* completo faria com que os ribossomos se chocassem, fazendo-os se desligar do complexo ou paralisando a transcrição. Um evento mais raro seria que uma das proteínas conseguisse ser traduzida, e no caso desta proteína ser codificada pelo gene *vioE* intacto, provavelmente

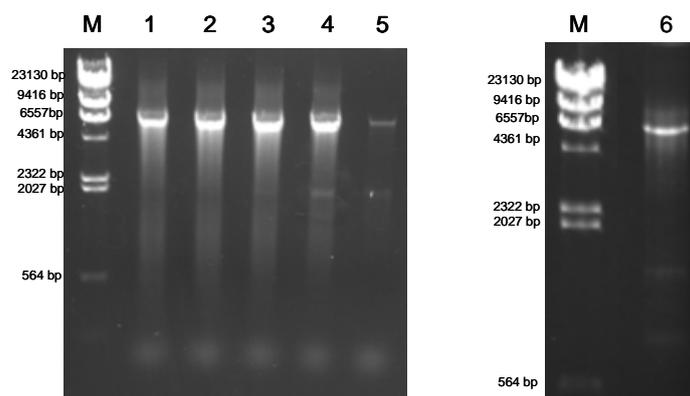
esta não estaria presente em concentração suficiente para alterar o fenótipo da colônia para a coloração roxa indicando produção de violaceína ou compostos semelhantes.

## 5.2. Procedimentos Experimentais

### 5.2.1. Amplificação do operon *vioABCD* por PCR

Por meio da amplificação do operon *vioABCD* por PCR foi possível a obtenção de produtos com o tamanho esperado para o operon *vioABCD*, como apresentado na Figura 12. A utilização de um gradiente de temperatura na reação de PCR demonstrou que a faixa de temperatura de extensão que maximiza a amplificação do operon *vioABCD* encontra-se abaixo de 72,8°C. Nas reações realizadas com temperaturas de extensão de 68, 69,6, 71,3 e 72,8°C, ocorreu formação de rastros, possivelmente devido à degradação do DNA (Sambrook e Russell, 2001). Nas reações com temperaturas de extensão de 72,8 e 74,1°C foi observada a formação de produtos inespecíficos com aproximadamente 2 kpb.

Os produtos das reações de PCR do operon *vioABCD* foram utilizados como DNA molde para as reações de PCR com iniciadores internos. Foram realizadas diluições de cada um dos tratamentos, e estas foram utilizadas nas reações de PCR. A diluição do DNA molde que apresentou os melhores resultados na PCR com iniciadores internos foi a de 1:6, do tratamento realizado com temperatura de extensão de 72,8°C. Por isso, esta diluição foi utilizada como DNA molde nas reações de PCR com iniciadores internos.

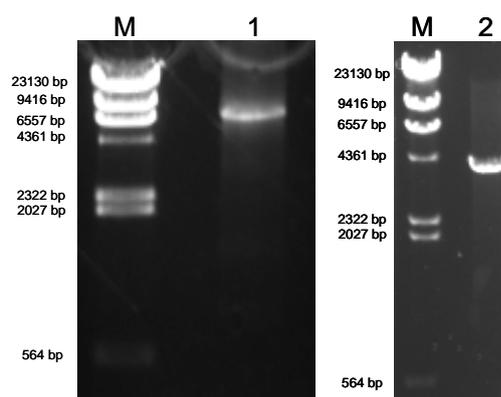


**Figura 12.** Gel de eletroforese dos produtos das reações de PCR do operon *vioABCD*. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*Hind*III. Os tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem às reações de PCR realizadas com iniciadores externos em temperaturas de extensão de 68, 69,6, 71,3, 72,8 e 74,1°C, respectivamente. O tratamento 6 é o produto da PCR com iniciadores internos.

O produto da segunda reação de PCR com iniciadores internos apresentou o tamanho esperado para o operon *vioABCD*, como mostrado na Figura 12. Foi observada a formação um pequeno rastro indicativo da degradação de DNA ou amplificação inespecífica, e a formação de dois produtos inespecíficos com comprimento entre 2 e 0,5 kpb. Os 550  $\mu$ L do produto desta PCR foram purificados e ressuspensos em 110  $\mu$ L de água ultra pura. Após a purificação, a concentração deste foi estimada em aproximadamente 80 ng/ $\mu$ L pela comparação da intensidade da fluorescência das bandas no gel de eletroforese.

### 5.2.2. Obtenção do plasmídeo pBvioABCD

Após a digestão e purificação do amplicon *vioABCD* com as enzimas de restrição *Xho*I e *Kpn*I foram obtidos aproximadamente 50  $\mu$ L deste amplicon na concentração de aproximadamente 75 ng/ $\mu$ L, como apresentado na Figura 13. No caso do plasmídeo pBADMyHisB foi obtido o mesmo volume após a digestão e purificação, porém a concentração estimada foi de 150 ng/ $\mu$ L (Figura 13). Posteriormente, o amplicon *vioABCD* e o plasmídeo pBADMyHisB digeridos e purificados foram ligados enzimaticamente visando a obtenção do plasmídeo pBvioABCD, esquematizado na Figura 10.



**Figura 13.** Gel de eletroforese do operon *vioABCD* e do plasmídeo pBADMycHisB. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. 1) Operon *vioABCD* digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI*. 2) Plasmídeo pBADMycHisB digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI*.

A partir da soma dos pesos moleculares de cada nucleotídeo foi possível o cálculo dos pesos moleculares do plasmídeo pBADMycHisB e do amplicon *vioABCD* digeridos. Os pesos moleculares obtidos para o plasmídeo pBADMycHisB e para o amplicon *vioABCD* digeridos foram de 2513791,2 e 4208022,2 g/mol, respectivamente. Pela análise dos pesos moleculares e das concentrações do plasmídeo pBADMycHisB e do amplicon *vioABCD* digeridos, foi possível determinar a concentração molar destas seqüências nucleotídicas. Assim, foi possível determinar os volumes das soluções destas moléculas a serem utilizados para se obter as proporções de vetor e inserto selecionadas para as reações de ligação. Os produtos das reações de ligação foram então utilizados nas transformações da *E. coli* DH10B.

Pela análise das colônias transformantes obtidas não foram verificadas colônias com coloração roxa, indicativo da produção de violaceína. Entretanto, o número de transformantes obtidos nas culturas do controle negativo foi muito menor do que foi verificado para os outros tratamentos. No controle negativo, o qual consistiu da transformação da *E. coli* DH10B com a reação de ligação do plasmídeo pBADMycHisB digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI*, foi obtida uma colônia transformante no meio de cultura suplementado com 0,1% (m/v) de L-arabinose e nenhuma no meio de cultura suplementado com 0,005% (m/v) de L-arabinose. Isto indica que a maior parte do plasmídeo pBADMycHisB foi digerido com as duas enzimas de restrição utilizadas. Como as extremidades geradas pelas enzimas de restrição não são complementares, a ligação do plasmídeo não ocorre, resultando na ausência de colônias transformantes. Nos diferentes

tratamentos de ligação do vetor e inserto, as médias dos números de transformantes dos tratamentos cultivados em meios de cultura suplementados com 0,1 e 0,005% (m/v) de L-arabinose foram de 7,6 e 7,2 UFC, respectivamente. Os números máximos de transformantes verificados foram de 15 UFC no tratamento com relação de 1:2 de vetor e inserto cultivado em meio de cultura suplementado com 0,1% (m/v) de L-arabinose, e 12 UFC no tratamento com relação de 1:3 cultivado em meio de cultura contendo 0,005% (m/v) de L-arabinose.

Como o número de transformantes dos diferentes tratamentos das reações de ligação foi muito maior do que os verificados no controle negativo, inicialmente suspeitou-se que fragmentos menores provenientes de produtos inespecíficos da PCR, que foram digeridos juntamente como operon *vioABCD*, poderiam estar se inserindo no plasmídeo pBADMycHisB. Isto resultaria em um número maior de transformantes nos tratamentos, porém nenhum transformante com coloração roxa indicando a produção de violaceína foi detectado. Outra possibilidade considerada foi o fato da enzima de restrição *KpnI* apresentar *star activity*<sup>1</sup> gerando fragmentos menores que poderiam se ligar ao plasmídeo pBADMycHisB.

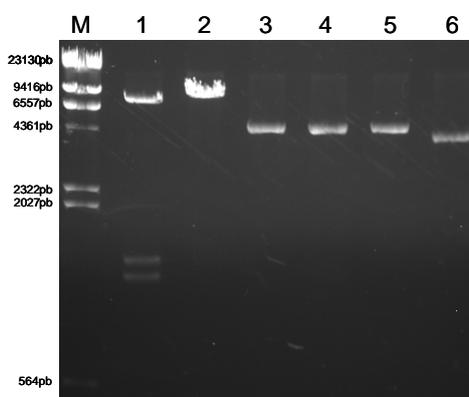
Visando avaliar o comprimento dos fragmentos de DNA que se ligaram ao plasmídeo pBADMycHisB, foram selecionadas seis colônias transformantes que foram cultivadas, tiveram os plasmídios extraídos, digeridos com a enzima de restrição *HindIII* e avaliados por meio de uma eletroforese em gel de agarose. Os microrganismos transformantes foram selecionados para a extração de plasmídios com base no diâmetro de sua colônia. Considerando que as colônias transformantes que contêm a inserção correta dos genes *vioABCD* no plasmídeo pBADMycHisB foram cultivadas simultaneamente com colônias que possuem este plasmídeo ligado a um fragmento menor, supõe-se que as colônias que estão com o fragmento intacto do operon *vioABCD* estejam em desvantagem em relação às colônias que possuem fragmentos menores inseridos. As colônias com fragmentos menores gastam menos energia para replicar o plasmídeo de forma a possuir cópias suficientes do gene que codifica a enzima  $\beta$ -lactamase para a degradação do

---

<sup>1</sup> *Star activity* é uma propriedade de certas enzimas de restrição que consiste na perda da capacidade de reconhecer o sítio de restrição específico da enzima quando esta atua em condições diferentes das recomendadas pelo fabricante. Como resultado a enzima cliva o DNA em diferentes posições gerando fragmentos de diferentes comprimentos.

antibiótico ampicilina; já as colônias que possuem o inserto correto contendo todos os genes *vioABCD* gastariam mais energia para replicar um plasmídio maior e obter cópias suficientes do gene para a  $\beta$ -lactamase. Dessa forma foram selecionadas as seis menores colônias transformantes para a extração e digestão dos plasmídios.

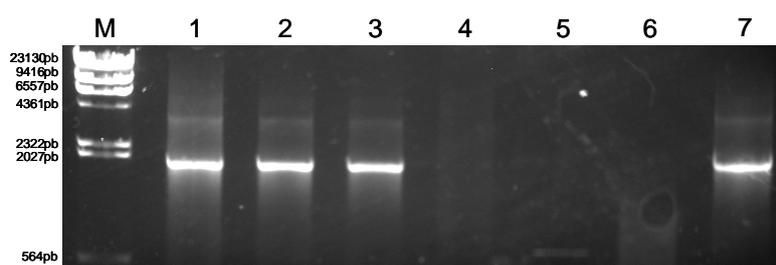
A análise por eletroforese da digestão dos plasmídios extraídos das colônias transformantes demonstrou uma correlação negativa entre o diâmetro da colônia transformante e o comprimento do seu plasmídio. Na Figura 14 a numeração das colunas do gel está disposta em ordem crescente em relação ao diâmetro das colônias selecionadas. Na coluna 1, a soma dos comprimentos das bandas geradas após a digestão do plasmídio indica que este tem comprimento próximo ao previsto para a ligação do pBADMycHisB ao operon *vioABCD*. O plasmídio da coluna 2 tem comprimento em torno de 9 kpb. Os plasmídios das colunas 3, 4 e 5 tem comprimento em torno de 4,3 kpb, e o da coluna 6 em torno de 4 kpb. Os plasmídios das colunas 1 e 2 foram então selecionados para servir de DNA molde na amplificação do gene *vioC*, pois ambos apresentaram comprimentos próximos ao esperado.



**Figura 14.** Gel de eletroforese dos produtos das reações de digestão dos plasmídios extraídos dos microrganismos transformantes com as ligações do operon *vioABCD* ao plasmídio pBADMycHisB. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII. 1-6) Colônias transformantes. Os microrganismos transformantes dos quais foram extraídos os plasmídios estão ordenados em ordem crescente de diâmetro de colônias nas colunas 1-6.

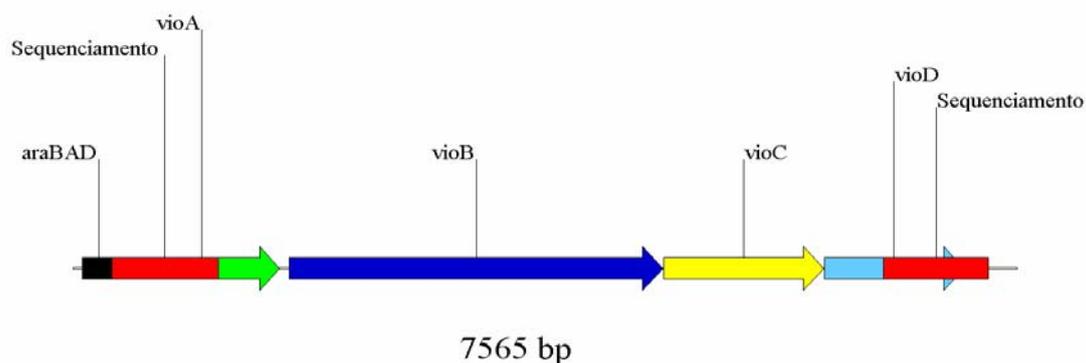
Pela análise computacional do gene *vioC* constatou-se que o comprimento do produto da amplificação deste gene por PCR foi de 1879 bp. O resultado da amplificação do gene *vioC* utilizando-se como DNA molde os plasmídios das colunas 1 e 2 do gel de agarose apresentado na Figura 14, demonstrou que somente a partir do plasmídio da coluna

1 foi possível a amplificação do gene *vioC*, como apresentado na Figura 15. As colunas 1, 2 e 3 da Figura 15 correspondem às diluições do plasmídio da coluna 1 da Figura 14 que foram utilizadas nas reações de PCR; as colunas 4, 5 e 6 correspondem às do plasmídio 2 da Figura 14, e a coluna 7 corresponde ao controle positivo. Assim, como a amplificação do gene *vioC* foi possível somente a partir do plasmídio da coluna 1 da Figura 14, este foi selecionado para ser seqüenciado.



**Figura 15.** Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *vioC* a partir do DNA dos plasmídios transformantes com a ligação do operon *vioABCD* ao plasmídio pBADMycHisB. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. 1-3) Plasmídio da coluna 1 da Figura 14 utilizado como DNA molde. 4-6) Plasmídio da coluna 2 da Figura 14 utilizado como DNA molde. 7) Controle positivo.

O seqüenciamento das regiões à montante e à jusante do plasmídio descrito acima demonstrou que a inserção do operon *vioABCD* no plasmídio pBADMycHisB ocorreu como previsto pelas simulações computacionais. As regiões seqüenciadas estão localizadas no início do gene *vioA* e no final do gene *vioD*, como ilustrado na Figura 16. Na região seqüenciada próxima ao gene *vioA* constatou-se que o códon inicial do promotor *araBAD* estava no mesmo quadro de leitura do gene *vioA*, assegurando a transcrição correta deste e dos demais genes do operon *vioABCD*. Na região seqüenciada próxima do gene *vioD* verificou-se que este gene estava intacto e inserido da mesma forma prevista pelas simulações computacionais.

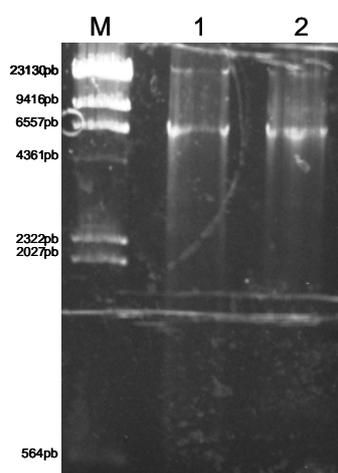


**Figura 16.** Esquema ilustrando as regiões que foram seqüenciadas no plasmídeo a partir do qual foi possível a amplificação do gene *vioC*.

Dessa forma, foi obtido um plasmídeo a partir da qual era possível se amplificar o gene *vioC*, e que possuía as regiões próximas dos genes *vioA* e *vioD* organizadas da mesma forma prevista pelas simulações computacionais. Contudo, ainda não se sabia se as regiões entre o final do gene *vioA* e o gene *vioB*, e parte do gene *vioD* estavam presentes neste plasmídeo. Visando esclarecer esta questão, foi realizada uma reação de PCR utilizando-se este plasmídeo como DNA molde, e os iniciadores internos que foram usados para amplificar o operon *vioABCD*. O amplicon *vioABCD* obtido por PCR com iniciadores externos foi utilizado como controle positivo na reação de PCR. Apesar dos iniciadores internos utilizados para amplificar o operon *vioABCD* não serem complementares nas regiões 5' com o plasmídeo utilizado como DNA molde, o fato de se utilizar um plasmídeo como DNA molde favoreceu a reação, pois a extensão de DNA alvo para a ligação dos iniciadores ficou muito mais reduzida em relação ao DNA genômico da *C. violaceum* utilizado anteriormente, reduzindo a formação de produtos inespecíficos.

Por meio da reação de PCR foi possível a obtenção de um fragmento de DNA com o mesmo comprimento do amplicon *vioABCD* amplificado com os iniciadores internos descritos no item 4.2.1, como apresentado na Figura 17. Dessa forma, constatou-se que o plasmídeo utilizado apresentava características que permitiam supor que este apresentava todos os elementos previstos pela simulação computacional da inserção do operon *vioABCD* no plasmídeo pBADMyHisB. Este plasmídeo foi nomeado de pBvioABCD. Apesar disso, não foi possível obter-se colônias roxas da *E. coli* DH10B portadora desse plasmídeo quando esta foi cultivada em meio de cultura com diferentes concentrações do indutor L-arabinose para a expressão dos genes *vioABCD*. Inicialmente suspeitou-se que a

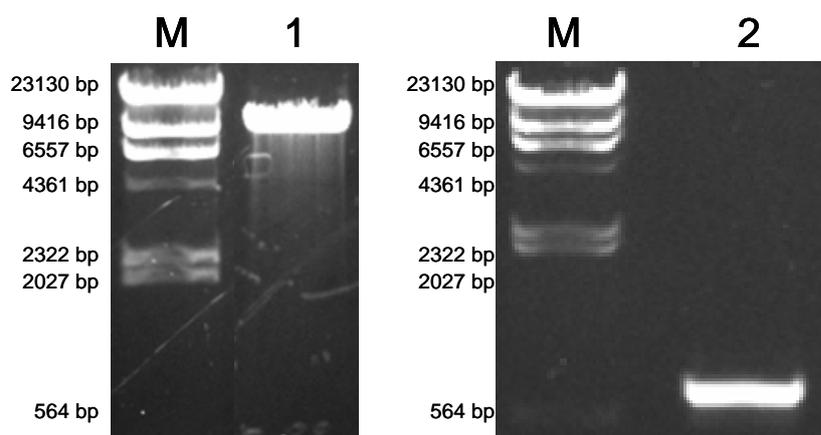
ausência de produção de violaceína foi devido à ocorrência de alguma mutação no operon *vioABCD* durante as amplificações por PCR, fato que poderia ter afetado alguma das enzimas da via metabólica. Estudos computacionais sugeriam a existência de um quinto gene na via de biossíntese da violaceína em *C. violaceum* (Goudel, 2005). Na época do desenvolvimento do presente trabalho foi publicado um trabalho (Sanchez *et al.*, 2006) no qual foi descrita existência de um quinto gene no operon *vioABCD*. Este gene foi nomeado de *vioE*, e constatou-se que a ausência deste impossibilitava a produção de violaceína por *E. coli*. Assim, partiu-se para uma nova etapa de amplificações e transformações no intuito de inserir o gene *vioE* no plasmídio pBvioABCD visando a obtenção de uma linhagem de *E. coli* produtora de violaceína.



**Figura 17.** Gel de eletroforese do produto da amplificação do operon *vioABCD* a partir do plasmídio seqüenciado. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*Hind*III. 1) Plasmídio seqüenciado utilizado como DNA molde na PCR. 2) Controle positivo.

### 5.2.3. Clonagem do gene *vioE*

Visando preparar o plasmídio pBvioABCD para a inserção do gene *vioE*, este plasmídio foi extraído e digerido com a enzima de restrição *Kpn*I. Após os procedimentos de extração, digestão enzimática com *Kpn*I, purificação, desfosforilação e nova purificação do plasmídio pBvioABCD, foram obtidos 50  $\mu$ L deste na concentração de aproximadamente 50 ng/ $\mu$ L, com apresentado na Figura 18. A composição de nucleotídeos

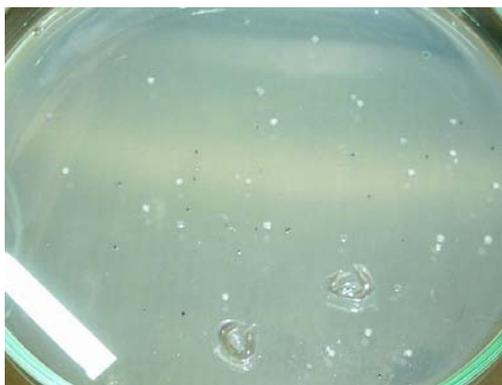


**Figura 18.** Gel de eletroforese do plasmídeo pBvioABCD e do amplicon *vioE*. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ HindIII. 1) Plasmídeo pBvioABCD digerido com *KpnI*. 2) Amplicon *vioE*

deste plasmídeo foi avaliada, e seu peso molecular calculado em 6726440,6 g/mol. Assim a concentração molar obtida foi de 7,43 nM. Este plasmídeo desfosforilado foi acondicionado a -20°C até o momento em que foi utilizado na reação de ligação ao gene *vioE*.

Como resultado da amplificação do gene *vioE* por PCR, foi possível a obtenção de um amplicon com tamanho esperado de 642 pb, como apresentado na Figura 18. Após a purificação, digestão enzimática com a enzima *KpnI* e nova purificação; a concentração do amplicon *vioE* digerido foi estimada em 50 ng/ $\mu$ L. Por meio da análise da composição de nucleotídeos, o peso molecular deste amplicon foi calculado em 386930,4 g/mol, e sua concentração molar em 129,22 nM.

Após a reação de ligação do gene *vioE* no plasmídeo pBvioABCD e transformação da *E. coli* DH10B foram obtidas colônias transformantes com coloração branca e colônias com coloração escura, como apresentado na Figura 19.



**Figura 19.** Colônias transformantes da bactéria *E. coli* DH10B com o plasmídio resultante da ligação do gene *vioE* ao plasmídio pBvioABCD (tratamento 1:2 (vetor:inserto) cultivado em meio suplementado com 0,001% (m/v) de L-arabinose).

A avaliação do número de colônias transformantes, apresentada na Tabela 4, demonstrou que as cultivadas em meio de cultura contendo 0,1% (m/v) de L-arabinose não apresentaram colônias com coloração escura, e que os transformantes com coloração clara formaram colônias de tamanho reduzido em relação às colônias de coloração clara observadas nos tratamentos suplementados com concentrações mais baixas de L-arabinose. Os transformantes cultivados em meio de cultura contendo 0,01% (m/v) de L-arabinose

**Tabela 4.** Resultados da transformação da *E. coli* DH10B com o plasmídio resultante da ligação do gene *vioE* ao plasmídio pBvioABCD.

Tratamentos (vetor:inserto)	% de L-arabinose no meio de cultura (m/v)	UFC <sup>a</sup> com coloração escura	UFC <sup>a</sup> com coloração clara
1:0 (controle)	0	0	25
1:1	0,100	0	40
	0,010	1	64
	0,001	14	37
1:2	0,100	0	42
	0,010	8	34
	0,001	24	35
1:3	0,100	0	65
	0,010	20	38
	0,001	33	59

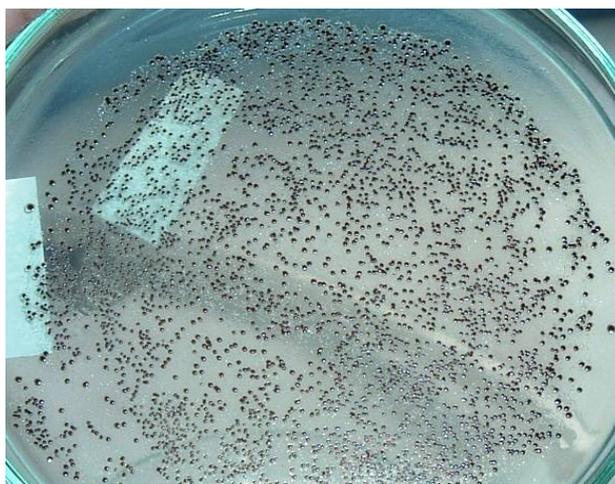
<sup>a</sup>UFC = Unidades formadoras de colônias.

formaram colônias intensamente escuras, e os cultivados em meio de cultura contendo 0,001% (m/v) de L-arabinose apresentaram colônias com diâmetro um pouco maior, porém com pigmentação reduzida. A análise do número de colônias transformantes sugeriu que quanto mais elevada a concentração do indutor L-arabinose no meio de cultura, maior seria a produção de violaceína pela *E. coli*, possivelmente atingindo um nível de produção que inibiu o crescimento da bactéria quando esta foi cultivada com 0,1% (m/v) de indutor. Trabalhos anteriores sugeriram que a violaceína poderia exercer efeito tóxico nas colônias (August *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2006). Este poderia ser um dos motivos da ausência de colônias produtoras de violaceína no meio de cultura no qual se utilizou 0,1% (m/v) de L-arabinose. O repique das colônias pigmentadas em meio de cultura sem suplementação de L-arabinose, e posteriormente em meio contendo L-arabinose, resultou na obtenção de colônias com fenótipo variado. A grande maioria não apresentou pigmentação, como na linhagem selvagem de *E. coli*; outras apresentaram uma pigmentação esverdeada, e uma pequena parte apresentou pigmentação escura.

Partindo do princípio de que a violaceína poderia exercer efeito tóxico para a célula, optou-se por obter colônias transformantes em meio de cultura sem suplementação de indutor, para impedir que as células pudessem produzir violaceína. Estes transformantes foram então avaliados quanto à produção do pigmento, e a partir de culturas com comprovada capacidade de produção, porém que nunca foram induzidas a produzi-lo, foram feitos estoques de células para a posterior realização de experimentos. O plasmídeo pBvioABCDE foi extraído a partir desta cultura não induzida.

Devido ao fato dos trabalhos que relatam a produção de violaceína em *E. coli* utilizarem a linhagem DH10B, inicialmente foi esta a linhagem utilizada. Posteriormente, após a obtenção do plasmídeo pBvioABCDE, a linhagem TOP10 foi testada para a produção de violaceína. Esta linhagem foi utilizada por indicação dos fabricantes do pBADMyHisB. Por meio da transformação da linhagem TOP10 da *E. coli* com o plasmídeo pBvioABCDE, e cultivo em meio de cultura LB suplementado com 0,001% (m/v) de L-arabinose, foram obtidas colônias transformantes pigmentadas indicando que esta linhagem é capaz de produzir violaceína, como apresentado na Figura 20. Outra característica observada foi a velocidade superior de crescimento da linhagem TOP10 em relação à linhagem DH10B. Foi feito um estoque em glicerol da bactéria *E. coli* TOP10

contendo o plasmídio pBvioABCDE. As células desse estoque nunca foram induzidas a produzir violaceína anteriormente. A bactéria *E. coli* TOP10 contendo o plasmídio pBvioABCDE, de agora em diante chamada de *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE), foi a linhagem utilizada nos experimentos realizados posteriormente.



**Figura 20.** Resultado da transformação da bactéria *E. coli* TOP10 com o plasmídio pBvioABCDE em meio de cultura LB contendo 0,01% (m/v) de L-arabinose e 100 µg/mL de ampicilina.

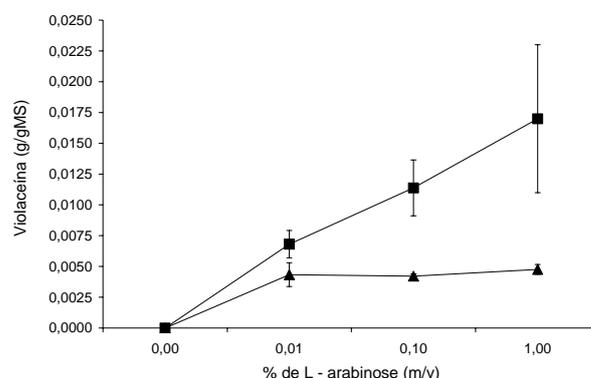
A orientação da inserção do gene *vioE* no plasmídio pBvioABCD foi avaliada por PCR. Foram realizadas duas reações nas quais foram utilizados diferentes pares de iniciadores. Na primeira reação foram utilizados os iniciadores *vioE* adiante (item 5.1.4) e BAD reverso (item 4.2.5) do plasmídio pBADMycHisB. Na segunda reação foram utilizados o iniciador *vioE* reverso (item 5.1.4) e novamente o iniciador BAD reverso. Foi verificado computacionalmente que os produtos de PCR do plasmídio pBvioABCDE com o gene *vioE* na orientação correta e com o gene *vioE* na outra orientação, produzem fragmentos de DNA com comprimentos muito semelhantes, dificultando a distinção dos plasmídios com diferentes orientações do gene *vioE*. Entretanto, a reação de PCR com iniciadores *vioE* reverso e BAD reverso teria que gerar uma única banda com concentração proporcional à verificada quando se utilizou o iniciador adiante, e isto não foi verificado. Além disso, todas as demais características dos produtos das reações de PCR indicam que o gene *vioE* está na orientação correta.

#### 5.2.4. Determinação do meio de cultura e da concentração de L-arabinose para indução da produção de violaceína em *Escherichia coli* TOP10 (pBvioABCDE)

Visando avaliar quais as condições mais apropriadas para a maximização da produção de violaceína por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE), este microrganismo foi cultivado em meios de cultura contendo diferentes concentrações de L-arabinose e de glicerol. Posteriormente, a massa seca e a concentração de violaceína do extrato celular bruto foram quantificadas. O meio de cultura foi suplementado com glicerol, pois em *C. violaceum* foi verificado que a produção de violaceína é melhorada com a adição deste álcool ao meio de cultura (Oliveira, 2006).

Os resultados deste experimento demonstram que a concentração de L-arabinose e o meio de cultura que maximizam a produção de violaceína são 1% (m/v) de L-arabinose e com o meio de cultura LB suplementado com 1% (v/v) de glicerol, como apresentado na Figura 21. Nestas condições foi possível obter-se 17 mg/gMS de violaceína. Este valor corresponde a 75% do obtido em *C. violaceum* (Mendes *et al.*, 2001). No meio de cultura LB sem adição de glicerol, observou-se que a partir de 0,01% (m/v) de L-arabinose o rendimento da produção de violaceína permanece constante.

No meio de cultura com adição de glicerol ocorreu um aumento linear na produção de violaceína. O aumento no rendimento da produção de violaceína pela adição de glicerol

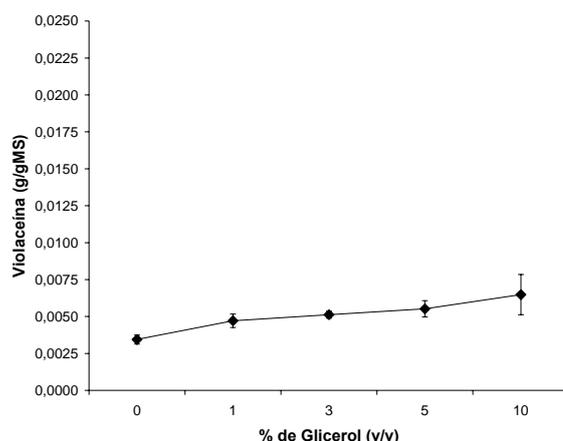


**Figura 21.** Avaliação do meio de cultura e concentração de indutor para a produção de violaceína em *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE). (—■—) Meio LB + 1% (v/v) de glicerol. (—▲—) Meio LB. As culturas foram incubadas por 20 h a 37°C e 150 rpm.

pode ter ocorrido devido à sua utilização como fonte de carbono e energia. O glicerol utilizado por *E. coli* é convertido em diidroxiacetona-fosfato ou diidroxiacetona, e metabolizado na glicólise (Moat *et al.*, 2002). Outro fator que pode ter contribuído para a elevação da produção de violaceína deve-se à forma de transporte do glicerol, que não ocorre via PTS. Dessa forma, os níveis intracelulares de cAMP não se alteram, evitando a repressão do  $P_{BAD}$ . A partir desses resultados optou-se por utilizar a concentração de 1% (m/v) de L-arabinose nos experimentos de produção de violaceína, pois este foi significativamente ( $p = 0,017$ ) diferente do tratamento com 0,1% (m/v) em meio com glicerol. Outras concentrações de glicerol foram testadas com intuito avaliar a produção de violaceína.

Os resultados do experimento em que a *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi cultivada em meio LB suplementado com diferentes concentrações de glicerol e 1% (m/v) de L-arabinose demonstraram um grande decréscimo da produção de violaceína, como apresentado na Figura 22. Utilizando-se as mesmas condições em que foi obtida uma produção de 17 mg/gMS de violaceína, foi possível obter somente 4,7 mg/gMS. Este fato reflete a instabilidade na produção deste pigmento em *E. coli*, como descrito em trabalhos anteriores (August *et al.*, 2000; Brady *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2006). Apesar de se observar uma tendência de crescimento da produção de violaceína com o aumento da concentração de glicerol no meio de cultura, não houve diferença significativa ( $p \geq 0,07$ ) entre os tratamentos suplementados com diferentes concentrações de glicerol.

Devido ao fato de observar-se que a produção de violaceína apresentou um aumento linear no experimento de avaliação da concentração de L-arabinose, optou-se por utilizar a concentração de 3% (v/v) de glicerol no meio de cultura. Dessa forma, considerando que

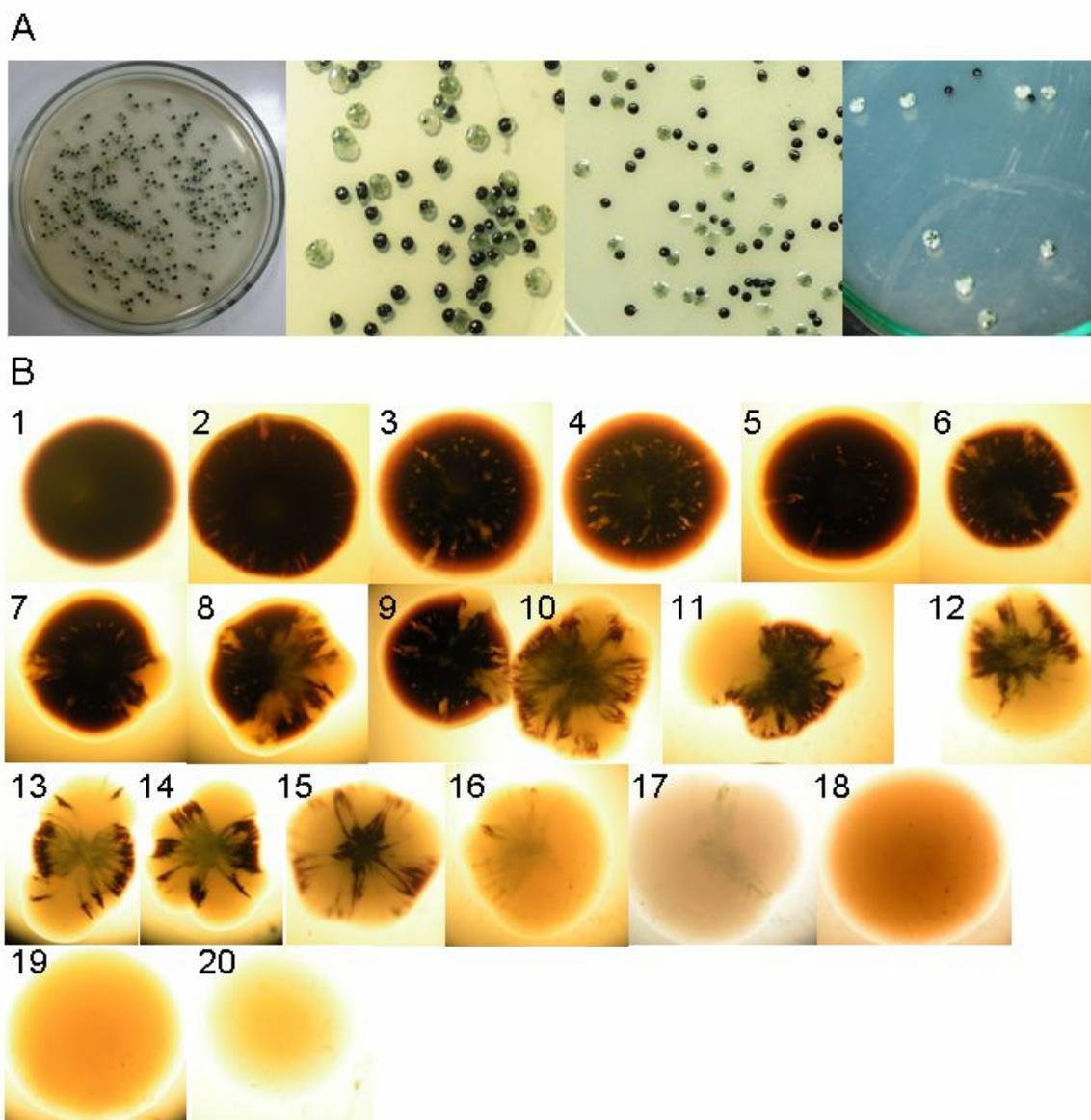


**Figura 22.** Avaliação da influência da concentração de glicerol na produção de violaceína por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio LB contendo 1% (m/v) de L-arabinose.

nos próximos experimentos o problema da instabilidade da produção de violaceína não ocorresse seria possível avaliar se o aumento linear da produção de violaceína observado na Figura 21 continuaria ocorrendo. Dessa forma foi possível avaliar se a utilização de 3% (v/v) de glicerol permitiria a obtenção um maior rendimento na produção de violaceína. Posteriormente, foram realizados experimentos no intuito de esclarecer as dúvidas relacionadas à instabilidade da produção de violaceína em *E. coli*.

### 5.2.5. Avaliação da instabilidade da produção de violaceína em *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE)

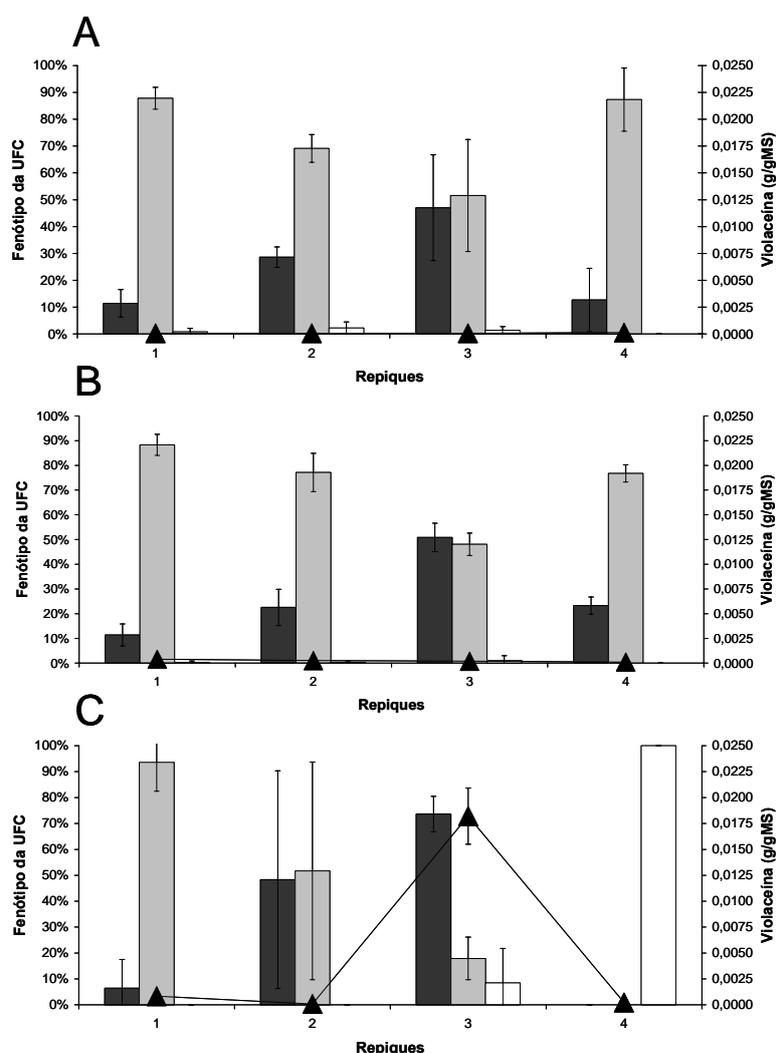
A avaliação da estabilidade da produção de violaceína pela *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) demonstrou que neste microrganismo a ocorrência de colônias não produtoras do pigmento parece estar relacionada com a produção deste pigmento em culturas anteriores. As colônias avaliadas como escuras nas contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) possuem as pigmentações das colônias 1-4 apresentadas na Figura 23B, colônias mistas de 5-18, e brancas de 19-20. Apesar de não serem inteiramente escuras quando vistas no microscópio, não foi possível distinguir as colônias inteiramente escuras a olho nu, como demonstra a Figura 23A.



**Figura 23.** Fenótipo das colônias de *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivadas em meio de cultura LB suplementado com L-arabinose. A) Colônias observadas a olho nu. B) Colônias observadas ao microscópio óptico. As colônias numeradas de 1-4 representam as colônias classificadas como escuras; de 5-18 como colônias mistas; e de 19-20 como brancas.

Nos repiques realizados na cultura não induzida, apresentado na Figura 24A, as UFC com coloração mista apresentaram decaimento de ocorrência nos repiques 1-3 e no repique 4 voltaram a apresentar elevação na abundância da população de colônias. As UFC com coloração escura apresentaram crescimento nos repiques 1-3, e no último repique apresentaram decaimento na abundância. As colônias não pigmentadas ocorreram em

número muito reduzido nos quatro repiques. Neste experimento, a cultura que foi inoculada para avaliação dos fenótipos das UFC nunca havia sido induzida a produzir violaceína anteriormente. Mesmo assim, as amostras coletadas de cada um dos repiques apresentaram



**Figura 24.** Influência da concentração de indutor e dos repiques na produção de violaceína e na morfologia das colônias. As barras em cores ■, ▒ e □ representam as UFC com colorações escura, mista e branca, respectivamente. ▲ representa a concentração de violaceína das culturas que foram avaliadas quanto à pigmentação das UFC. A) Meio de cultura sem suplementação de L-arabinose. B) Meio de cultura suplementado com L-arabinose 0,001% (m/v). C) Meio de cultura suplementado com L-arabinose 1% (m/v).

diferentes abundâncias relativas nas pigmentações das colônias quando estas foram induzidas a produzir violaceína pela primeira vez. De uma forma geral, apesar da diferença

entre as pigmentações das colônias obtidas a partir em cada um dos quatro repiques realizados, parece que existe uma tendência das células das culturas formarem populações semelhantes em cada repique, pois o desvio padrão não apresentou grandes variações em alguns dos repiques. Como regra geral, foi verificado que a primeira indução para produção de violaceína em *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) apresenta maior probabilidade de gerar uma cultura com maior intensidade de pigmentação. Um dos fatores que poderia estar colaborando para esta variação no fenótipo das culturas induzidas pela primeira vez é o fato da repressão da expressão dos genes sob controle do promotor P<sub>BAD</sub> não ser total (Guzman *et al.*, 1995). Outro ponto importante verificado, foi que as células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pBvioABCDE, que foram imediatamente cultivadas em meio de cultura contendo indutor, apresentaram 100% de transformantes pigmentados, como mostrado na Figura 20. Isto reforça a hipótese de que as células portadoras do pBvioABCDE podem estar sendo afetadas pela produção de baixos níveis de violaceína devido à repressão parcial do promotor P<sub>BAD</sub>.

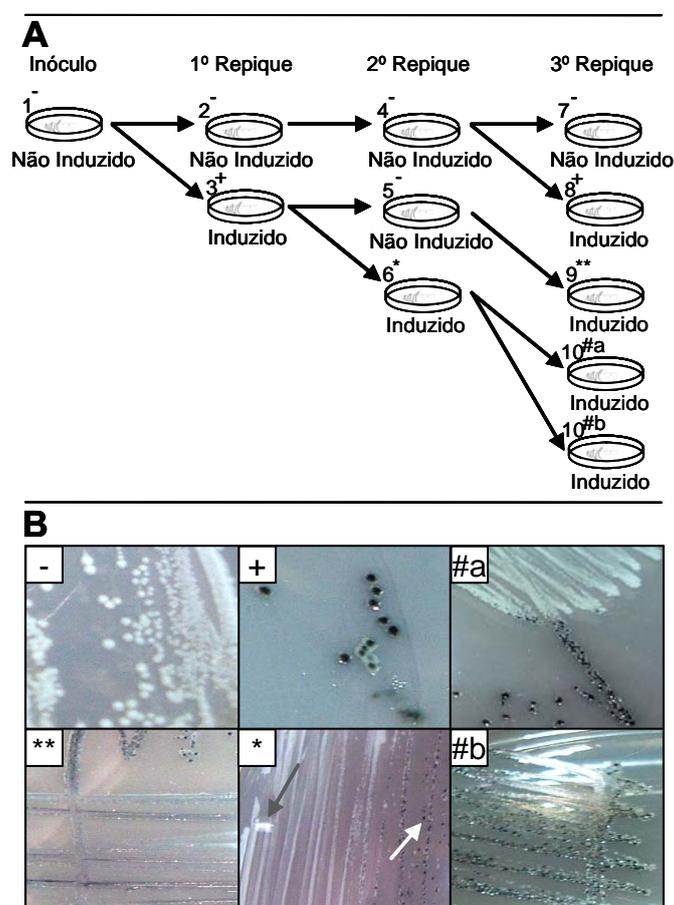
No experimento de repiques realizados em meio de cultura contendo 0,001% (m/v) de L-arabinose, apresentado na Figura 24B, observou-se um comportamento semelhante ao verificado no experimento no qual não foi adicionado L-arabinose no meio de cultura. A semelhança entre estes tratamentos sugere que um nível de expressão basal da expressão dos genes *vioABCDE* pode ter ocorrido no tratamento realizado em meio de cultura sem a adição de indutor, pois as características da pigmentação das UFC obtidas em cada um dos repiques destes dois tratamentos foi semelhante. A adição de 0,001% (m/v) de L-arabinose não foi suficiente para induzir uma forte produção de violaceína nas culturas.

Os resultados do experimento em que os repiques foram realizados em meio de cultura contendo 1% (m/v) de L-arabinose, apresentado na Figura 24C, demonstraram que neste tratamento a produção de violaceína foi acentuada no terceiro repique. O primeiro repique deste tratamento não apresentou grande diferença nas características das UFC em relação aos primeiros repiques realizados nos demais tratamentos. No segundo repique, as UFC escuras e mistas se apresentavam praticamente na mesma proporção. No terceiro repique foi observada elevada produção de violaceína atingindo 18,2 mg/gMS. A pigmentação das UFC formadas pela inoculação desta cultura em meio sólido demonstrou que as colônias escuras estavam em maior número na cultura em relação às UFC brancas e

mistas. No terceiro repique observou-se drástica diminuição da produção de violaceína e formação de 100% de UFC brancas. Este resultado sugere que a grande produção de violaceína obtida no repique anterior pode ter inibido o surgimento de colônias produtoras do pigmento no quarto repique.

Os resultados obtidos com relação ao experimento de repiques em meio de cultura sólido demonstraram que, como esperado, não ocorreu produção de violaceína detectável visualmente nos tratamentos não induzidos 2, 4, 7 e 5, apresentados na Figura 25. Os tratamentos 3 e 8, nos quais foram realizadas as primeiras induções para produção de violaceína, apresentaram forte coloração violeta ao longo de toda a estria de diluição; porém, na região onde se formaram colônias isoladas, ocorreu variação na forma de pigmentação. Foram observadas colônias onde ocorreu produção de violaceína na região central da colônia; no entanto, na região periférica a colônia tornou-se mais clara, indicando ausência ou forte redução da produção de violaceína. Esta característica de pigmentação variou de colônias inteiramente escuras até colônias com uma pequena região central escura e regiões periféricas claras. Este padrão de pigmentação indica que no início da formação da colônia a *E. coli* TOP (pBvioABCDE) foi capaz de produzir violaceína, porém, de alguma forma, a produção parou ou foi fortemente reduzida posteriormente. Sabe-se que a violaceína é tóxica para muitos microrganismos, logo pode ter ocorrido alguma forma de resposta pela *E. coli* de forma a reprimir a produção de violaceína. Isto pode ter ocorrido pela alteração do plasmídeo pBvioABCDE, ou mesmo pelo redirecionamento ou repressão da produção de algum metabólito necessário para à biossíntese da violaceína. A violaceína intracelular pode ter atuado como repressora das enzimas codificadas pelos genes *vioABCDE* ou mesmo ter interferido na sua própria produção.

O tratamento 6 apresentou características distintas em relação aos demais tratamentos observados anteriormente. Observou-se que no início da estria de diluição deste tratamento não ocorreu produção de violaceína ou esta foi fortemente reduzida em relação à região da estria onde se formaram colônias isoladas. Na região onde ocorreu produção de violaceína, observou-se o surgimento de colônias pigmentadas, parcialmente pigmentadas e não pigmentadas. Este comportamento não foi observado nos tratamentos 3 e 8, nos quais a indução para a produção de violaceína foi realizada pela primeira vez. De alguma forma a



**Figura 25.** Resultados do experimento de repiques em meio de cultura sólido. A) As características dos fenótipos observados nas culturas são indicadas pelos sinais -, +, \*, \*\*, #a e #b associados ao respectivo tratamento. B) Características das culturas obtidas nos diferentes tratamentos. Os sinais -, +, \*, \*\*, #a e #b indicados nas figuras, referem-se aos sinais associados aos números dos tratamentos em A. Os sinais + e - indicam os tratamentos onde ocorreram produção e ausência de produção de violaceína, respectivamente. No tratamento indicado pelo sinal \*, o início da estria de diluição apresentou ausência de produção de violaceína e a região final da estria apresentou colônias produtoras e colônias não produtoras de violaceína. O tratamento indicado pelo sinal \*\* apresentou produção de violaceína reduzida em relação aos tratamentos +. Os inóculos dos tratamentos contendo os sinais #a e #b foram obtidos a partir das regiões indicadas pelas setas branca e cinza da figura indicada pelo sinal \*, respectivamente. O tratamento indicado pelo sinal #a apresentou ausência de produção de violaceína no início da estria de diluição e produção na região final da estria. O tratamento indicado pelo sinal #b apresentou uma pequena região não produtora de violaceína no início da estria de diluição, e no restante da cultura observou-se uma população mista de colônias brancas, esverdeadas e escuras.

expressão dos genes *vioABCDE* e/ou a própria violaceína podem/pode fazer com que a bactéria induzida, quando repicada novamente em meio de cultura contendo indutor, forme uma cultura contendo uma parte de bactérias produzindo violaceína e outra não produzindo.

Uma característica interessante relacionada ao fenótipo observado no tratamento 6 é o fato que em uma estria de diluição a população mais abundante de bactérias inoculadas tem maior probabilidade de formar colônias isoladas. Logo, presume-se que as bactérias não pigmentadas do início da estria de diluição ainda poderiam ser capazes de produzir violaceína, e que a inibição da produção provavelmente estaria relacionada com a densidade celular, pois a produção de violaceína ocorreu predominantemente na região onde ocorreram colônias isoladas. Existe a possibilidade de que as bactérias induzidas que não produzem violaceína de forma detectável visualmente estejam competindo na cultura com as que produzem de forma a gerar colônias pigmentadas. As bactérias que produzem violaceína estariam possivelmente em desvantagem em relação às não produtoras, pois necessitam expressar os cinco genes do operon *vioABCDE*, desviar uma parte da produção de L-triptofano, do oxigênio captado e do NADPH intracelular (Momen *et al.*, 1998) para a produção de violaceína, além de acumular esta molécula sabidamente tóxica para muitos organismos. Dessa forma, poder-se-ia explicar o fato das colônias produtoras de violaceína ocorrerem somente no final da estria de diluição, pelo fato destas não conseguirem competir com as bactérias que não produzem violaceína. Esta hipótese poderia explicar o porquê destas colônias produtoras de violaceína ocorrerem apenas isoladamente. Além disso, o crescimento das colônias não produtoras de violaceína, que possivelmente é mais rápido, culminaria com a diminuição local da concentração de nutrientes do meio de cultura, colaborando para o não surgimento ou surgimento reduzido de colônias pigmentadas detectáveis visualmente.

A bactéria *E. coli* TOP10 possui uma mutação no gene *araD* que impede o metabolismo da L-arabinose. É possível que nas células induzidas que não produzem violaceína, ainda esteja ocorrendo a expressão do gene *araC* do plasmídeo pBvioABCDE. A expressão desse gene, que codifica um fator de transcrição induz a célula a expressar o gene *araE* que codifica a proteína responsável pelo transporte de L-arabinose para a célula, elevando a velocidade de transporte e a concentração intracelular de L-arabinose. Dessa forma, segundo a hipótese de Khlebnikov *et al.* (2002), em uma população de células induzidas por L-arabinose a expressão dos genes *vioABCDE* estaria restrita à fração da população que está induzida, e não ao nível de expressão de cada célula individualmente. As células que atingirem a concentração intracelular de L-arabinose necessária à indução da

expressão do gene *araC*, serão induzidas e captarão mais indutor do meio cultura; e as que não atingirem este nível permanecerão não induzidas. Assim, é possível que esteja ocorrendo uma competição por indutor entre as bactérias que produzem e as que não produzem violaceína, possivelmente favorecendo as não produtoras do pigmento.

O tratamento 9 apresentou diminuição da produção de violaceína em relação aos tratamentos 3 e 8. Experimentos semelhantes ao realizado no tratamento 9 demonstraram alta variabilidade de fenótipos das culturas obtidas. É possível que neste tratamento a violaceína intracelular ou a expressão dos genes *vioABCDE* possam ter afetado as células de alguma forma. Estas células permaneceram viáveis quando cultivadas novamente em meio de cultura sem suplementação de indutor. Todavia, quando estas foram induzidas novamente a produzir violaceína, o fenótipo relativo à produção deste pigmento apresentou redução na intensidade de pigmentação da cultura.

Nos experimentos em que foram utilizadas linhagens que nunca haviam produzido violaceína anteriormente, o fenótipo de produção de violaceína permaneceu conservado. Uma explicação para esta variabilidade de fenótipos observados nas culturas obtidas a partir de inóculos que foram induzidos em algum momento anterior pode estar relacionada ao efeito tóxico da violaceína sobre os genes *vioABCDE* e sobre o DNA genômico da *E. coli*, como explicado adiante.

Os inóculos utilizados nos tratamentos 10<sup>#a</sup> e 10<sup>#b</sup> foram obtidos a partir de regiões distintas da cultura do tratamento 6. O inóculo utilizado no tratamento 10<sup>#a</sup> foi obtido a partir de uma colônia inteiramente pigmentada do tratamento 6, indicada pela seta de cor branca na Figura 25B; e o inóculo do tratamento 10<sup>#b</sup> foi obtido a partir da região não pigmentada do tratamento 6, indicada pela seta de cor cinza na Figura 25B. Verificou-se no tratamento 10<sup>#b</sup> a ocorrência de uma pequena região não pigmentada no início da estria de diluição, seguida por uma população mista de colônias não pigmentadas e colônias com pigmentação escura e esverdeada. Na maior parte da estria de diluição ocorreram colônias inteiramente brancas, colônias com pigmentação escura e colônias com pigmentação esverdeada. Na cultura do tratamento 10<sup>#a</sup> verificou-se que na região do início da estria de diluição da cultura, local que apresentou maior densidade celular, não ocorreu produção de violaceína detectável visualmente. Contudo, no final da estria de diluição onde ocorrem colônias isoladas, surgiram colônias com pigmentação predominantemente escura.

Na cultura do tratamento 10<sup>#a</sup> parece ter ocorrido um evento semelhante ao que ocorreu na cultura do tratamento 6, pois ambas apresentaram características em comum, exceto que praticamente todas as colônias no final da estria de diluição do tratamento 10<sup>#a</sup> apresentaram pigmentação escura. Na cultura do tratamento 10<sup>#b</sup>, o surgimento de colônias produtoras de violaceína indica que dentre as colônias não pigmentadas da cultura do tratamento 6 utilizado como inóculo (região indicada pela seta cinza na Figura 25B) ainda existiam células capazes de produzir o pigmento. Na pequena região do início da estria de diluição do tratamento 10<sup>#b</sup> que não apresentou colônias pigmentadas, parece ter ocorrido um evento semelhante aos observados nos tratamentos 6 e 10<sup>#a</sup>. O surgimento de colônias pigmentadas na região de maior densidade celular da cultura do tratamento 10<sup>#b</sup> sugere que a ausência de colônias pigmentadas na região da estria de diluição que contem maior densidade celular verificada nos tratamentos 6 e 10<sup>#b</sup>, poderia estar relacionada com o inóculo utilizado. Na cultura do tratamento 10<sup>#b</sup> o inóculo foi obtido a partir de uma região da cultura do tratamento 6 onde não estava ocorrendo produção de violaceína de forma detectável visualmente. Como observado na cultura do tratamento 9 e explicado anteriormente, o fenótipo de uma cultura obtida a partir de um inóculo que foi induzido anteriormente pode gerar uma cultura com fenótipo variável. Presume-se que este fato possa ter ocorrido na cultura apresentada do tratamento 10<sup>#b</sup>, concomitantemente com a formação de colônias incapazes de produzir violaceína devido a alterações no plasmídeo pBvioABCDE.

#### **5.2.6. Avaliação da instabilidade do plasmídeo pBvioABCDE em *E. coli* TOP10**

Neste experimento de repiques em meio de cultura líquido foi verificada formação de pigmentos escuros no primeiro repique em meio de cultura contendo indutor para a expressão dos genes *vioABCDE*. No segundo, terceiro e quarto repiques não foi verificada visualmente formação de pigmentos ou ocorreu forte diminuição da produção, como mostrado na Figura 26.

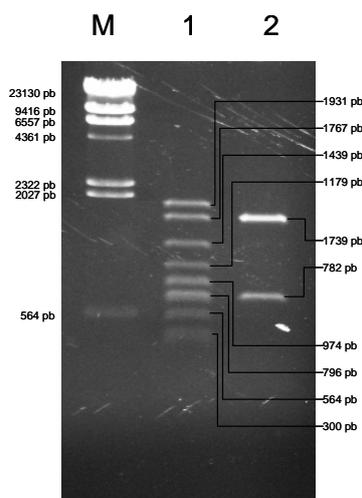
O perfil de digestão dos plasmídios obtidos a partir da cultura inóculo e da cultura do repique 4 apresentou grande diferença, indicando que de alguma forma a expressão dos

genes *vioABCDE* e/ou a produção de violaceína pode/podem ter alterado o plasmídeo pBvioABCDE, como apresentado na Figura 27. Esta pode ser a causa, ou uma das causas da não formação ou diminuição da produção de violaceína nos repiques 2, 3 e 4.



**Figura 26.** Resultados do experimento de repiques em meio de cultura líquido. O inóculo foi obtido a partir de uma cultura da bactéria *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio de cultura LB suplementado com ampicilina. Este foi inoculado em meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina e L-arabinose, e cultivado por 24 h a 37°C a 150 rpm. Este primeiro repique foi utilizado para inocular o segundo repique no mesmo meio de cultura e com as mesmas condições de cultivo, e assim sucessivamente foram realizados repiques utilizando a cultura anterior como inóculo. Dessa forma foram obtidos quatro repiques. Foi verificada a formação de pigmentos somente na cultura obtida no primeiro repique.

Pela análise computacional do perfil de digestão da seqüência do plasmídeo pBvioABCDE com a enzima de restrição *RsaI*, verificou-se que o perfil de digestão do plasmídeo extraído a partir da cultura do quarto repique em meio cultura líquido não apresentou as bandas esperadas pela digestão dos quadros abertos de leitura dos genes *vioABCDE*. Já o plasmídeo extraído a partir da cultura inóculo apresentou as bandas esperadas. A transformação da *E. coli* TOP10 com os plasmídios extraídos a partir da cultura inóculo e da cultura do quarto repique gerou colônias produtoras e não produtoras de violaceína, respectivamente. Este resultado reforça a hipótese da ocorrência de



**Figura 27.** Gel de eletroforese do plasmídeo pBvioABCDE digerido com a enzima de restrição *RsaI*. M) Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII*. 1) Plasmídeo pBvioABCDE digerido com a enzima *RsaI*, extraído a partir da cultura inóculo da bactéria *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio de cultura LB suplementado com ampicilina. 2) Plasmídeo pBvioABCDE digerido com a enzima *RsaI*, extraído a partir da cultura obtida no quarto repique da bactéria *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina e L-arabinose.

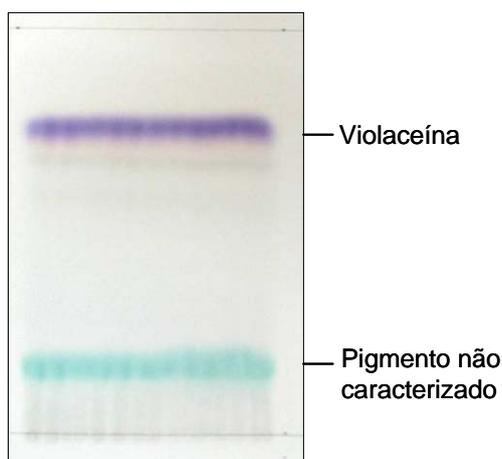
alterações de regiões do plasmídeo pBvioABCDE relacionadas à biossíntese de violaceína. A realização de quatro repiques utilizando-se como inóculo as culturas anteriores, possivelmente permitiu que fossem selecionadas apenas as células que possuíam o gene de resistência a ampicilina funcional. A perda de regiões do plasmídeo diminuiria a energia necessária à replicação deste, favorecendo as células portadoras de plasmídios de tamanho reduzido. Presume-se que tanto no experimento de repiques em meio de cultura sólido quanto no experimento realizado em meio líquido a produção de violaceína possa ter causado danos ao plasmídeo pBvioABCDE bem como ao DNA do cromossomo da *E. coli* TOP10, pois está comprovado que a violaceína pode causar danos à molécula de DNA (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2006). Danos causados ao DNA poderiam explicar o fato de colônias de *E. coli* produtoras de violaceína, quando repicadas sucessivamente, perdem a capacidade de produção do pigmento. É possível que os genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos necessários à produção desta molécula tenham sido danificados. O surgimento de linhagens com fenótipos variáveis quando foram utilizados inóculos induzidos em algum momento anterior, também poderia ser explicado pela hipótese de alteração do DNA devido à produção de violaceína.

O mecanismo de regulação da expressão do operon *vio* em *C. violaceum* assegura que a expressão destes genes ocorra somente quando as células atingirem elevadas densidades celulares. Dessa forma, a produção de violaceína e intermediários ocorre quando a maior parte das células já não está se multiplicando devido a falta de nutrientes. Neste estado fisiológico a replicação do DNA cromossomal esta fortemente reduzida. Nesse contexto, é possível supor-se que o efeito genotóxico da violaceína ou intermediários estaria relacionado à fase de replicação do DNA, pois na *E. coli* estudada a produção de violaceína foi induzida a partir do início da cultura culminando com a ocorrência de alterações no pBvioABCDE. Outra hipótese poderia ser a ocorrência de recombinação homóloga entre o plasmídeo pBvioABCDE e o DNA cromossômico da *E. coli*.

### 5.2.7. Análise da violaceína produzida por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE)

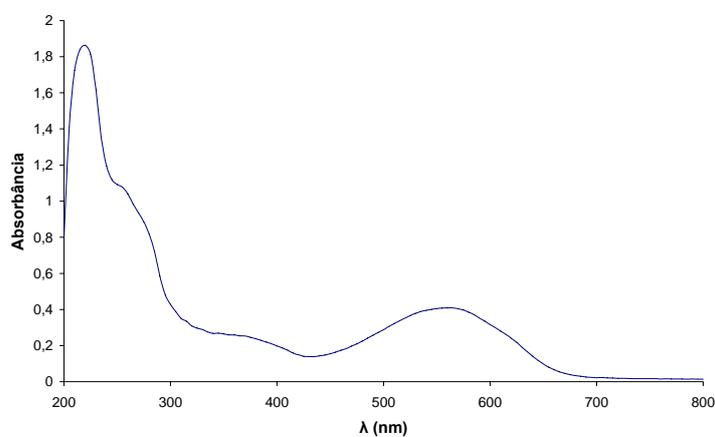
Por meio da purificação da violaceína produzida pela *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) foi obtida uma banda de coloração violeta na lâmina de cromatografia de camada delgada (TLC), como apresentado na Figura 28. Outras bandas de diferentes colorações também foram observadas. A banda de coloração violeta foi isolada, ressuspensa em etanol e avaliada por meio de espectrometria de UV-VIS.

O espectro de UV-VIS da amostra de coloração violeta foi semelhante ao observado na literatura para a violaceína. As diferenças do espectro obtido em relação aos observados na literatura devem-se provavelmente à metodologia utilizada para a purificação da violaceína. No espectro de UV-VIS da violaceína utilizado para comparação com o espectro da Figura 29 esta molécula foi purificada por vários processos de extração em diferentes solventes, cristalização, HPLC preparativa e recristalização (Rettori, 1996). Os picos observados na análise de UV-VIS da violaceína pura ocorreram nos comprimentos de onda de 210, 258, 372 e 575 nm; e um ombro em 296 nm (Rettori, 1996). Na violaceína purificada por TLC no presente trabalho foram observados picos em 218 e 562 nm. O ombro a 596 nm e os demais picos observados na literatura não estão bem definidos.



**Figura 28.** Cromatografia de camada delgada em sílica gel G60 do extrato de violaceína produzida por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE). Foi utilizado metanol 99,9% (v/v) como eluente.

Os espectros de UV-VIS da violaceína e da desoxiviolaceína são muito semelhantes (Sanchez *et al.*, 2006), refletindo a semelhança estrutural destas moléculas. Na amostra



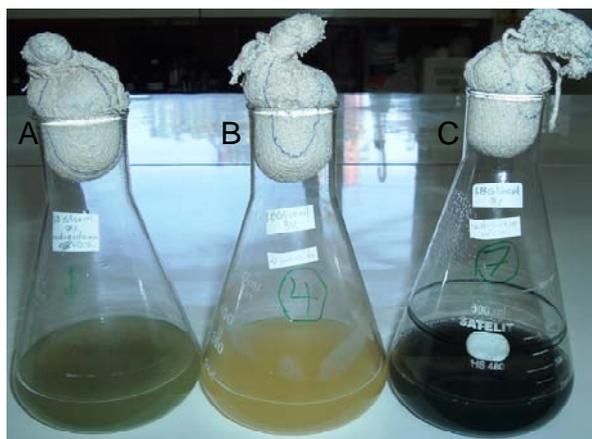
**Figura 29.** Espectro de UV-VIS do extrato bruto da violaceína extraída da *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE).

purificada por TLC é possível que estes dois compostos estejam presentes na amostra avaliada por UV-VIS, bem como outras moléculas que se deslocaram juntamente com a violaceína durante a cromatografia. A presença de diferentes moléculas na amostra explica a causa da diferença do espectro obtido em relação ao observado na literatura.

### 5.2.8. Cinética de crescimento e produção de violaceína em *Escherichia coli* TOP10 (pBvioABCDE)

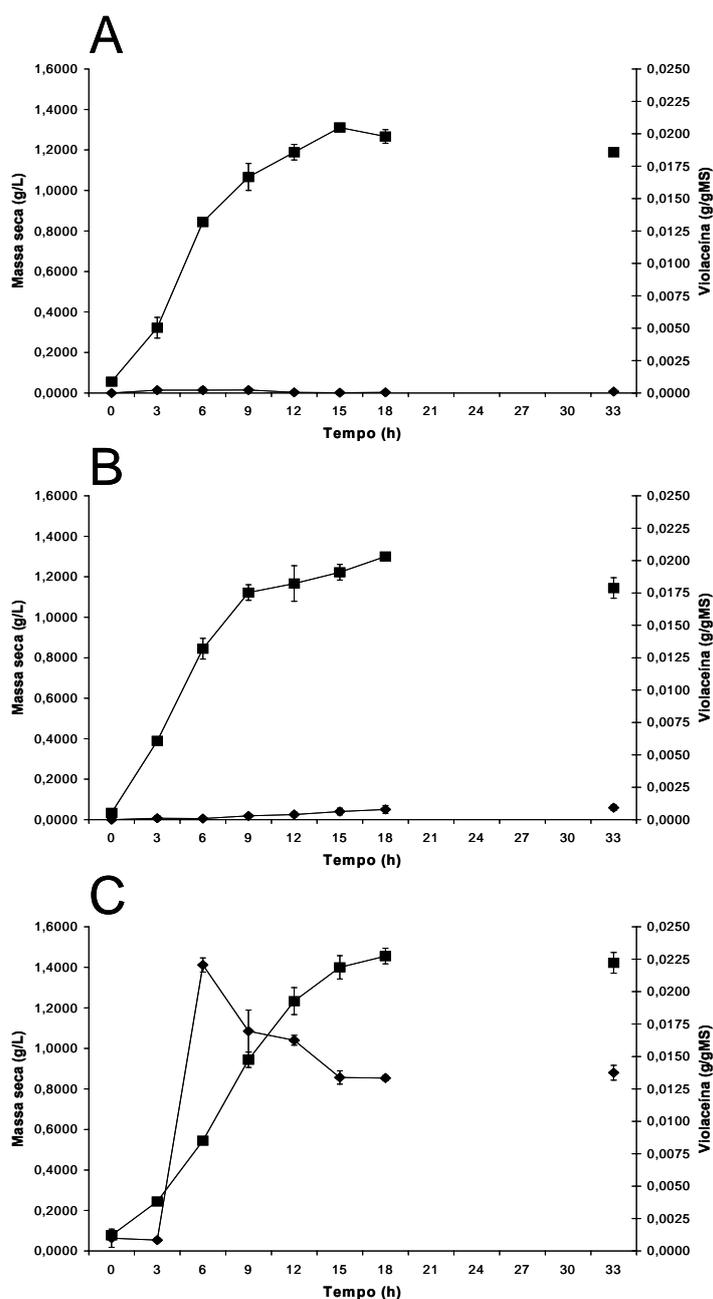
Para a otimização da produção de violaceína é importante a obtenção dos dados cinéticos da geração de produto e biomassa. Dessa forma, um biorreator pode ser devidamente projetado e operado em condições que permitam a obtenção de elevados rendimentos e produtividades.

Nos experimentos cinéticos realizados, a produção de violaceína ocorreu na primeira tentativa de indução da produção de violaceína pela adição de L-arabinose ao meio de cultura (Figura 30C), ao contrário do observado no experimento do item 5.2.5. A análise da cinética de crescimento e produção de violaceína por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE)



**Figura 30.** Culturas avaliadas no experimento de análise cinética de crescimento e produção de violaceína em *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE). A) Adição de L-arabinose na quinta hora de cultivo. B) Sem adição de L-arabinose. C) Adição de L-arabinose no início do cultivo.

demonstrou que neste microrganismo o ápice da produção de violaceína ocorreu após seis horas de cultivo, como apresentado na Figura 31C. Após este período, observou-se um decaimento da concentração de violaceína em relação à massa seca. Esta diminuição se estabilizou após 18 h de cultivo. É possível que este decaimento tenha ocorrido devido à lise celular nas bactérias produtoras de violaceína. A metodologia utilizada permitiu avaliar apenas a violaceína contida nas células. Outro fator que deve ter contribuído para este decaimento é o surgimento de mutantes não produtores de violaceína na cultura.



**Figura 31.** Cinética de crescimento e produção de violaceína para *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) cultivada em meio de cultura LB suplementado com 3% (m/v) de glicerol e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. A) Tratamento sem suplementação de L-arabinose. B) Tratamento com suplementação de 1% (m/v) de L-arabinose a partir da quinta hora de cultivo. C) Tratamento com suplementação de 1% (m/v) de L-arabinose desde o início da cultura. Os símbolos ■ e ♦ representam a massa seca e a concentração de violaceína, respectivamente.

Nas culturas induzidas após a quinta hora de cultivo e nas culturas não induzidas não foi verificada produção de violaceína em grandes quantidades. O fato de a cultura

induzida após a quinta hora de cultivo apresentar produção de violaceína praticamente insignificante quando comparada à cultura induzida desde o início do cultivo, pode ter ocorrido devido a diferentes fatores. Uma das prováveis explicações para este fato deve-se à instabilidade característica da produção de violaceína por *E. coli* (August *et al.*, 2000). Outra explicação pode estar relacionada à necessidade de metabólitos específicos que são produzidos especificamente para reações de biossíntese, como o NADPH (Momen *et al.*, 1998). Durante o experimento foi observado que a cultura em que foi possível a obtenção da maior concentração de violaceína, apresentada na Figura 31C, tornou-se fortemente verde na terceira hora de cultivo. Esta coloração verde tornou-se violeta-escuro, indicando produção de pigmentos, como apresentado na Figura 30C.

Aproximadamente três horas após a indução (Figura 30A) do tratamento induzido na quinta hora de cultivo, também foi observado o surgimento de uma pigmentação verde nesta cultura. Entretanto esta coloração verde não se tornou escura como foi observado na cultura induzida desde o início do experimento.

Pigmentos verdes chamados de cromoviridans e desoxicromoviridans foram obtidos em experimentos de produção de violaceína a partir de extratos celulares de *C. violaceum*. Verificou-se que estes pigmentos se acumulavam no sistema, e que a produção de violaceína ocorria somente após a adição de NADPH (Momen *et al.*, 1998). O NADPH é utilizado principalmente em reações de biossíntese, momento em que é produzido em grandes quantidades. A diminuição da concentração de NADPH pode ter sido um dos fatores que impossibilitaram a produção de violaceína na cultura induzida na quinta hora de cultivo. O surgimento dos pigmentos verdes previamente à produção de violaceína, está de acordo com a via metabólica de biossíntese da violaceína proposta por Sanchez *et al.* (2006).

As curvas de crescimento das culturas induzidas e não induzidas não apresentaram grandes diferenças quanto a massa seca, obtendo-se em média 1,4 gMS/L com 18 h de cultivo. O maior rendimento obtido para a produção de violaceína foi de 22,06 mg/gMS, que corresponde a 97,32% do valor obtido em *C. violaceum* (Mendes *et al.*, 2001). Considerando que este valor foi obtido em 6 h de cultivo obtém-se uma produtividade de 5,83 nmol/mL·h que corresponde a 17% da obtida em *C. violaceum* (Mendes *et al.*, 2001). Se considerarmos a produtividade de violaceína em função da biomassa e não do volume de

meio de cultura, obtém-se 10,71  $\mu\text{mol/gMS}\cdot\text{h}$  em *E. coli* contra 1,83  $\mu\text{mol/gMS}\cdot\text{h}$  em *C. violaceum* (Mendes *et al.*, 2001). A bactéria *Black Beauty* (Tan *et al.*, 2004) produz 38,97 g/L de massa úmida e 2,1 g/L de violaceína bruta em 96 h de cultivo em frascos agitados (Tan *et al.*, 2004). Supondo que este microrganismo possui 40% de água em sua composição obtém-se 23,38 gMS/L, rendimento de 89,81 mg/gMS e produtividade de 0,94 mg/gMS·h de violaceína bruta. O rendimento e produtividade de violaceína bruta observados na *E. coli* TOP (pBvioABCDE) correspondem a 24,56% e 392% do observado para a bactéria *Black Beauty*, respectivamente. Estudos cinéticos são necessários para se obter melhores estimativas das produtividades de violaceína das bactérias *C. violaceum* e *Black Beauty*.

Neste trabalho não foram realizados experimentos visando a otimização da produção de biomassa. A otimização da produção de biomassa em *E. coli* expressando genes heterólogos atinge até 92 gMS/L (Gombert e Kilikian, 1997). Dessa forma, se concentrações de biomassa próximas a esta forem obtidas em *E. coli* produzindo violaceína, será possível obter melhores produtividades. A metodologia utilizada para a avaliação da produção de violaceína por *E. coli* TOP10 (pBvioABCDE) não permitiu a quantificação da violaceína que foi liberada no meio de cultura devido a lise celular. Assim, é possível que se tenha obtido maiores valores para a produção deste pigmento.

Uma vantagem com relação à utilização da *E. coli* para a produção de violaceína é o fato desta linhagem não ser patogênica como a *C. violaceum*. Esta característica pode ser importante quando se tem em vista as aplicações biomédicas da violaceína e quanto a questões de segurança dos pesquisadores. Estudos com relação à patogenicidade da bactéria *Black Beauty* ainda não foram realizados.

## CAPÍTULO 6 - Conclusões

---

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- Foi possível produzir violaceína em *E. coli* por meio da expressão do operon *vioABCDE* sob controle do promotor *araBAD*;
- Foi possível obter um rendimento na produção de violaceína em *E. coli* próximo ao obtido em culturas de *C. violaceum* ATCC 12472;
- A produtividade de violaceína em função da massa seca em *E. coli* foi superior à observada em *C. violaceum* e na bactéria *Black Beauty*;
- Um dos fatores responsáveis pela instabilidade da produção heteróloga de violaceína em *E. coli* deve-se às alterações que a produção desta molécula pode gerar no plasmídeo pBvioABCDE;
- Para melhorar a produção de violaceína por *E. coli* são necessários mais estudos com intuito de contornar o problema da instabilidade gerada pela produção desta molécula;
- Para a realização de futuros ensaios de produção de violaceína em *E. coli*, sugere-se a avaliação do uso de cultivos descontínuos alimentados visando a obtenção de culturas com elevadas densidades celulares;

## Referências Bibliográficas

---

Aldridge, K. E.; Valainis, G. T.; Sanders, C. V. (1988), Comparison of the in vitro activity of ciprofloxacin and 24 other antimicrobial agents against clinical strains of *Chromobacterium violaceum*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 10, 31-39.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990), Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-410.

Anderson, A. J.; Dawes, E. A. (1990), Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, 54, 450-472.

Andrighetti-Frohner, C. R.; Antonio, R. V.; Creczynski-Pasa, T. B.; Barardi, C. R.; Simoes, C. M. (2003), Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem I Oswaldo Cruz*, 98, 843-848.

Andrighetti-Frohner, C. R.; Kratz, J. M.; Antonio, R. V.; Creczynski-Pasa, T. B.; Barardi, C. R.; Simoes, C. M. (2006), In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutat Res*, 603, 97-103.

Antonio, R. V.; Creczynski-Pasa, T. B. (2004), Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res*, 3, 85-91.

Asamizu, S.; Kato, Y.; Igarashi, Y.; Onaka, H. (2007), VioE, a prodeoxiviolacein synthase involved in violacein biosynthesis, is responsible for intramolecular indole rearrangement. *Tetrahedron Lett*, 48, 2923-2926.

August, P. R.; Grossman, T. H.; Minor, C.; Draper, M. P.; MacNeil, I. A.; Pemberton, J. M.; Call, K. M.; Holt, D.; Osburne, M. S. (2000), Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2, 513-519.

Balibar, C. J.; Walsh, C. T. (2006), In Vitro Biosynthesis of Violacein from L-tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry*, 45, 15444-15457.

Beckedorff. *Clonagem e hiper-expressão em Escherichia coli do gene AroA que codifica a enzima EPSPS de Agrobacterium tumefaciens*. (Monografia). Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006. 43 p.

Bergonzini, C. (1881), Um nuevo bacterio colorato. *Ann Soc Natural Modena Ser*, 14, 149-158.

Boisbaudran, L. (1882), Matière colorante se formant dans la colle de farine. *Comp Rend Acad Sci*, 94, 562-563.

Brady, S. F.; Chao, C. J.; Handelsman, J.; Clardy, J. (2001), Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org Lett*, 3, 1981-1984.

Brito, C. F.; Carvalho, C. B.; Santos, F.; Gazzinelli, R. T.; Oliveira, S. C.; Azevedo, V.; Teixeira, S. M. (2004), *Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. *Genet Mol Res*, 3, 148-161.

Campbell, S. C.; Olson, G. J.; Clark, T. R.; McFeters, G. (2001), Biogenic production of cyanide and its application to gold recovery. *J Indust Microbiol Biotechnol*, 26, 134-139.

Carepo, M. S.; Azevedo, J. S.; Porto, J. I.; Bentes-Sousa, A. R.; Batista Jda, S.; Silva, A. L.; Schneider, M. P. (2004), Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. *Genet Mol Res*, 3, 181-194.

Chattopadhyay, A.; Kumar, V.; Bhat, N.; Rao, P. (2002), *Chromobacterium violaceum* infection: A rare but frequently fatal disease. *J Pediatr Surg*, 37, 108-110.

Chen, C. H.; Lin, L. C.; Liu, C. E.; Young, T. G. (2003), *Chromobacterium violaceum* bacteremia: a case report. *J Microbiol Immunol Infect*, 36, 141-144.

Chernin, L. S.; Winson, M. K.; Thompson, J. M.; Haran, S.; Bycroft, B. W.; Chet, I.; Williams, P.; Stewart, G. S. (1998), Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J Bacteriol*, 180, 4435-4441.

Demétrio, F. D. *Caracterização genética de isolados de Chromobacterium violaceum*. (Monografia). Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006. 34 p.

Duran, N.; Erazo, S.; Campos, V. (1983), Bacterial chemistry-II: Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An Acad Brasil Cienc*, 55, 231-234.

Duran, N.; Menck, C. F. (2001), *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Crit Rev Microbiol*, 27, 201-222.

Duran, N.; Rettori, D.; Menck, C. F. M. (2001), Quem é a CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM? *Biotec C & Des*, 20, 38-43.

Ferreira, C. V.; Bos, C. L.; Versteeg, H. H.; Justo, G. Z.; Duran, N.; Peppelenbosch, M. P. (2004), Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*, 104, 1459-1464.

Gibas, C.; Jambeck, P. (2001), *Developing Bioinformatics Computer Skills*. O'Reilly, Sebastopol.

Gombert, A. K.; Kilikian, B. V. (1997), A simple way of achieving a high cell concentration in recombinant *E. coli* cultivation. *Braz J Chem Eng*, 14, 11.

Goudel, A. M. *Criação da Base de Dados Via/Genoma da Chromobacterium violaceum - CvioCyc e Análise das Informações Geradas pelo Software Pathway Tools*. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005. 183 p.

Guzman, L. M.; Belin, D.; Carson, M. J.; Beckwith, J. (1995), Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177, 4121-4130.

Hoshino, T.; Kondo, T.; Uchiyama, T.; Ogasawara, N. (1987), Biosynthesis of violacein: a novel rearrangement in tryptophan metabolism with a 1,2 shift of the indole ring. *Agri Biol Chem*, 51, 965-968.

Hoshino, T.; Ogasawara, N. (1990), Biosynthesis of violacein: evidence for the intermediacy 5-hydroxy-L-tryptophan and the structure of a new pigment, oxyviolacein, produced by the metabolism of 5-hydroxytryptophan. *Agri Biol Chem*, 54, 2339-2346.

Hussain, A.; Vancura, V. (1970), Formation of biologically active substances by rhizosphere bacteria and their effect on plant growth. *Folia Microbiol (Praha)*, 15, 468-478.

Khlebnikov, A.; Risa, O.; Skaug, T.; Carrier, T. A.; Keasling, J. D. (2000), Regulatable Arabinose-Inducible Gene Expression System with Consistent Control in All Cells of a Culture. *J Bacteriol*, 182, 7029-7034.

Khlebnikov, A.; Skaug, T.; Keasling, J. D. (2002), Modulation of gene expression from the arabinose-inducible araBAD promoter. *J Ind Microbiol Biot*, 29, 34-37.

Kolibachuk, D.; Miller, A.; Dennis, D. (1999), Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3561-3565.

Lee, J.; Kim, J. S.; Nahm, C. H.; Choi, J. W.; Kim, J.; Pai, S. H.; MOON, K. H.; LEE, K.; CHONG, Y. (1999), Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region. *J Clin Microbiol*, 37, 2068-2070.

Leon, L. L.; Miranda, C. C.; De Souza, A. O.; Duran, N. (2001), Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother*, 48, 449-450.

Letendre, C. H.; Dickens, G.; Guroff, G. (1974), Tryptophan-Hydroxylase of *Chromobacterium-Violaceum*. *J Biol Chem*, 249, 7186-7191.

Mendes, A. S.; Carvalho, J. E.; Duarte, M. C. T.; Duran, N.; Bruns, R. E. (2001), Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnol Lett*, 23, 1963-1969.

Moat, A. G.; Foster, J. W.; Spector, M. P. (2002), *Microbial physiology*. Wiley-Liss, New York.

Momen, A. Z.; Hoshino, T. (2000), Biosynthesis of violacein: intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxyindole side. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 539-549.

Momen, A. Z. M. R.; Mizuoka, T.; Hoshino, T. (1998), Studies on the biosynthesis of violacein. Part 9. Green pigments possessing tetraindole and dipyrromethene moieties, chromoviridans and deoxychromoviridans, produced by a cell-free extract of *Chromobacterium violaceum* and their biosynthetic origins. *J Chem Soc Perk T 1*, 3087-3092.

Newman, J. R.; Fuqua, C. (1999), Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene*, 227, 197-203.

Oliveira, C. G. *Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em Chromobacterium violaceum*. (Tese de Doutorado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. 142 p.

Pantanella, F.; Berlutti, F.; Passariello, C.; Sarli, S.; Morea, C.; Schippa, S. (2006), Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J App Microbiol*, 1-8.

Patil, R. S.; Ghormade, V. V.; Deshpande, M. V. (2000), Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol*, 26, 473-483.

Pemberton, J. M.; Vincent, K. M.; Penfold, R. J. (1991), Cloning and Heterologous Expression of the Violacein Biosynthesis Gene Cluster from *Chromobacterium violaceum*. *Curr Microbiol*, 22, 355-358.

Petrillo, V. F.; Severo, V.; Santos, M. M.; Edelweiss, E. L. (1984), Recurrent infection with *Chromobacterium violaceum*: first case report from South America. *J Infect*, 9, 167-169.

Ray, P.; Sharma, J.; Marak, R. S. K.; Singhi, S.; Taneja, N.; Garg, R. K.; Sharma, M. (2004), *Chromobacterium violaceum* septicaemia from north India. *Indian J Med Res*, 120, 523-526.

Recouvreux, D. O. S. *Produção de Celulose Bacteriana: Identificação do Operon bcs e Produção de Biofilme Celulósico por Chromobacterium violaceum*. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004. 134 p.

Reilly, J.; Pyne, G. (1927), On the pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Biochem Jour*, 21, 1059-1063.

Rettori, D. *Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido por Chromobacterium violaceum*. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996. 44 p.

Richard, C. (1993), [*Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions]. *Bull Soc Pathol Exot*, 86, 169-173.

Riveros, R.; Haun, M.; Duran, N. (1989), Effect of growth conditions on production of violacein by *Chromobacterium violaceum* (BB-78 strain). *Braz J Med Biol Res*, 22, 569-577.

Roberts, S. A.; Morris, A. J.; McIvor, N.; Ellis-Pegler, R. (1997), *Chromobacterium violaceum* infection of the deep neck tissues in a traveler to Thailand. *Clin Infect Dis*, 25, 334-335.

Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001), *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanchez, C.; Brana, A. F.; Mendez, C.; Salas, J. A. (2006), Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. *ChemBiochem*, 7, 1231-1240.

Siegele, D. A.; Hu, J. C. (1997), Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 8168-8172.

Sneath, P. H. (1956), Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J Gen Microbiol*, 15, 70-98.

Sneath, P. H.; Whelan, J. P.; Bhagwan, S. R.; Edwards, D. (1953), Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. *Lancet*, 265, 276-277.

Sneath, P. H. A. (1984), Genus *Chromobacterium* Bergonzini 1881, 153 AL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 580-582.

Stajich, J. E.; Block, D.; Boulez, K.; Brenner, S. E.; Chervitz, S. A.; Dagdigian, C.; Fuellen, G.; Gilbert, J. G. R.; Korf, I.; Lapp, H. (2002), The Bioperl Toolkit: Perl Modules for the Life Sciences. *Genome Res*, 12, 1611-1618.

Tan, T. L.; Montforts, F. P.; Meyer, D. Microbiological method of the biosynthesis of natural blue-violet colorants violacein and deoxyviolacein and the utilization thereof, *US Patent & Trademark Office*. 2004: United States.

Taylor, A. M. *Quorum sensing and the regulation of gene expression in Chromobacterium violaceum*. (Tese de doutorado). Pharmacy School - Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Nottingham, Nottingham, 1997. 204 p.

Tisdall, J. (2001), *Beginning Perl for Bioinformatics*. O'Reilly, Sebastopol.

Tisdall, J. D. (2003), *Mastering Perl for Bioinformatics*. O'Reilly, Sebastopol.

Tobie, W. C. (1935), The Pigment of *Bacillus violaceus*: I. The Production, Extraction, and Purification of Violacein. *J Bacteriol*, 29, 223-227.

Vasconcelos, A. T. R.; Almeida, D. F.; Hungria, M.; Guimaraes, C. T.; Antonio, R. V.; Almeida, F. C.; Almeida, L. G. P.; Almeida, R.; Alves-Gomes, J. A.; Andrade, E. M. (2003), The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *P Natl Acad Sci USA*, 100, 11660-11665.

Woolley, P. G. (1905), *Bacillus violaceus manilae* (a pathogenic organism). *Bull J Hop Hosp*, 16, 89-93.

Zhang, L. H.; Dong, Y. H. (2004), Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol*, 53, 1563-1571.

Zimmerman, B. (1881), Review of Bergonzini on *Cromobacterium*. *Bot Centralbl*, 4, 1528-1530.



CGGATCGACCTGATGACCGGCTGCTCAGGCGCTGTCTGCGCGTGTGATGAACCTGCCGTGGGCATCGCCGGACGCACCGCCGGCCGCGCTGCGGGGCGGCTGGATACCCGACGTA  
 CGAGACTACGCGCTGGGCTGCCGGATGCTGGCGCGGCTGCGAGCGCTGCTGGAGCAGGCGTGTGATGCTGGAGCCGGGCTGGTCCCGACGCGCAATGGAAGTCTGGATTTCTACC  
 GCCGGCAGATGCTGGATTTGGCTTTGGAAAGCTTTCTAGAGAGGCTGAAATGAAAGAGCAATCATAGTCCGAGGCGGGCTCGCCGGGGCTGACCGCCATCTACCTGGCGAAGCGGG  
 CTACGAGTCCACGTGGTGGAAAAGCGCGGACCCGCTGCGGGACCTGTCTTCTACGTGTGGTGTGAGTCCGCGGGGATAGGCGTCAAGTACCGTGGCGGCATCAAGTCCGTTG  
 TGGCGCGGCGGATTCGCGCGCGGAGCTGGACCGCTGCGCGCAACCCATCGTGGCGATGGCGTTTCCGTGCGCGGCGAGTACCGGATCGGGAGCTCAAGCCGCTGGAGGATTTCCCGCCG  
 CTGTCCGTGAACCGCGCGGCTTTAGAAAGCTGTGAACAAGTACGCCAACCTGGCCGGCTGCGCTACTACTTCGAGACAAGTGCCTGGACGTGGATCTGGACGGCAAGTCCGTGCTGAT  
 CCAGGGCAAGGACGGCCAGCCGCGAGCGCTTGCAGGGCGATATGATCATCGGCCCGCAGCGCGGCACTCGCCGCTGCGGAGGCGATGACAGAGCGGTTGCCCGCTTCCGAAATCCAGCAGA  
 CTTTCTTCGCGACGGCTACAAGACGCTGTGTGCTGCGGACGCGCAGGCGTGGGCTACCGCAAGGACACGCTGTATTTCTTGGCATGGACTCCGGCGGCTGTTCCCGGGCCGCGCC  
 ACCATCCCGGACGCGAGCGTCAAGTCCGCTGCTGCTGCGGACGCGCAGGCGTGGGCTACCGCAAGGACACGCTGTATTTCTTGGCATGGACTCCGGCGGCTGTTCCCGGGCCGCGCC  
 GCGGACGCGCGGACGAGATGCTGCGGCAAGTTCCTGGCAAGCCAGCAACGACCTGATCAAGTCCGTTCCAGCACCTTCCACTACAAGGCAATGTGTCTGCTGGGCGACCGCGCC  
 AGCCACCGCGCTTTCTCGCCAGGCGATGAACATGCGCTGGAGCAGCGCGCACTTCTGTCAGTGTGGACCCGCAACAGGCGACAGGCAAGGCTTTCCCGAGTTCACCGAG  
 CTGCGCAAGGTGACGGCCGCGGATGACAGGATGGCGCGCCAACTACGACGTGCTCAGTGTCCAAATCCCATCTTTTCATGCGGGCCCGCTACACCCGCTACATGCATAGCAAGT  
 TCCCGGCTTTACCGCCGGACATGGCGGAGAAGCTGTACTTCAAGTCCGAGCGGTACGACAGACTGCAGAGATCCAGAGAAAACAGAACGTTTGGTACAAGATAGGGAGGTTCAACTGAT  
 GAAGATTTCTGGTATCGCGCGGGGCGGCGGCTGTTGCGCAGCCAACTGAAACAGGCGGCTGCGCTGTGGGCGATAGACATCGTGAAGAAACAGACGACGAGGAAAGTGTGGGCT  
 GGGCGTGTGCTGCGCCGCGCGCCGCGCAGCATCGGCCAATCCGCTGTCTACCTGGACGCGCGGAGAGGCTGAATCCGCACTTCTGGAAAGACTTCAAGCTGTGTCACCAACAGAG  
 CCCAGCTGATGAGCACCAGCGCTGTGTGCGCGGCTGGAGCGCGCGGCTGTCACGCTTGGCGGCAAGTCCGCTGCGAGGGCATCGCCATCCGCTTCCGAAATCCCGCTGTGGA  
 GCATGGCGAGTCCGCTGGCCGACTACGACCTGGTGTGCTGGCCAAAGCGGCTCAATACAAGACCGCCACTTACCGAGGGCGTGGTGGCGAGGTGGACTACGCGCGCAACAAGTACA  
 TCTGGTACGGCAGCCAGCTGTTGACAGATGAACCTGGTGTTCGCGCCACCGCAAGGACATTTTCACTCGCCACGCTACAAGTACTCGGACACGATGAGCACCCTTATCGTGTGAG  
 TGCAGCGAGGACCTATGCCCGCGCGCTGGCGAGATGTCGGAAGAGCGCTGCGCCGAATACGTGCGCAAGTGTTCAGGCGGAGCTGGGCGCGCACCGCTGGTGAAGCAGCGCGG  
 CCTCGCTGGCGCACTTCAATGACCTGAGCCACGACCGCTGCCAGCAGGCAAGCTGTGTGCTGGGCGACCGCTGACATCGGCGCACTTCCATCGGCCACGCGCACAGTGGCGG  
 TGTTGTGGCCGACCTGTGGTGAAGCGCTGTGCAACGAGGAGCGGTGCGCGCGCGCTGAAGCCCTTCGAGGAGCGCGCGCTGCGCGTGTTCAGCTGTTCACCGGCGATGCGCGAAG  
 AGCCGGTCTGGTTCGAGACGGTGGAGGAGCGCATGCACCTGTCCAGCGCGAGTGTGTCGACAGCTTCGACGCGCGCGCAAGTGTGCGCCGATGCGCGAAGCGCTGGCGCAGAACCT  
 GCGTACCGCTGCAACGCTGAGgagggcgcatggaaaaacgggaacggcgctgctgcccggcgctggagcagcgcatatgtgtcgtactggagtcogatgctgcccgatgaccagctga  
 cgtccggctactgctggttcogactacgagcgc

### 7.3. Gene *vioE* da Bactéria *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472

TGGCGCAGAAGCTGCGCTACCGCTGCAACGCTGAggagggcgATGGAAAACCGGAAACCGCGCTGTGCGCGCGCTGGAGCAGCGCTATGTGCTACTGGATCCGATGCTCGCCG  
 GATGACAGCTGACGTCGCGCTACTGCTGTTGACTACGAGCGGACATCTGTGGATAGACGGCTGTTCAATCCCTGGTCCGAGCGGACACCGGCTACCGGCTGTGGATGTCGAGGT  
 CGGCAACCGCCAGCGCGGCGCACCTGGAGCAGAAGGTGGCTATGGCCGCGAGCGGACCGCTGGGCGAGCAGCTGTGCGAGCGGCGCTGGACGACGAGACCGCCGCTGCGCGAGC  
 GTTTCCTGCGCGGACGCTGCTGCGCGCTGGCGCGCCATATCGCCCGCGCGTGTGCTGGGCGAGGAAAGCGGCGGCTGGCGCTACAGGCTCGGGCAAGGGGCGCTCCAGCTTG  
 TACCTGGACGCGCCAGCGGTACGCGCTGAGGATGTTGACCGGGACGAGCGCTCCGCGCGTGTGCTGCGGATTTCCCAACGTCAGCGAGGCGGAGATTCCGACGCGCTTCTCCCGC  
 CAAGCGCTAGgctggtgagtcgggcagaaaaacggggctgcttccggcagccccatgtcgtgc

### 7.4. Determinação dos Sítios de Restrição Presentes no Plasmídio e no Operon *vioABCD*

Inicialmente após a inicialização do programa Jellyfish, selecionou-se a opção *File/New/DNA Sequence*. Após a abertura da janela central, colou-se nesta a seqüência nucleotídica do plasmídio pBADMycHisB que foi previamente recortada de um documento no formato .txt, obtido no item 4.1.1. Selecionou-se a opção *Restriction Enzymes* e na caixa *Cut with* selecionou-se a opção *Edit sets* abrindo a janela *Enzyme Sets*. Nessa janela foi utilizada a opção *New Enzyme Set*, e foram selecionadas as enzimas para as quais o sítio de restrição está presente no sítio de restrição múltipla do plasmídio pBADMycHisB, conforme descrito pelo fabricante. Cada enzima selecionada foi adicionada à pasta *New Set* por meio do botão “+”. Clicou-se em *Ok* retornando a janela *Restriction Enzymes*. Na opção *Cut with* foi selecionado *New Set*, ou seja, as enzimas presentes no sítio de restrição múltipla do plasmídio pBADMycHisB. A opção *Cut at \_\_\_ sites or less* foi selecionada, e o número de sítios de restrição desta opção foi incrementado de 100 em 100 até que não se

observasse variação no número de sítios de restrição encontrados no plasmídeo pBADMycHisB. O programa gerou como resultado um arquivo de texto com a seqüência do plasmídeo pBADMycHisB e as posições de ocorrência dos sítios de restrição encontrados nesta.

O procedimento descrito acima foi realizado com a seqüência nucleotídica do operon *vioABCD*, porém foram selecionados os sítios para enzimas de restrição que ocorreram fora dos quadros abertos de leitura dos genes do operon *vioABCD*; pois estes são os prováveis sítios de restrição que poderiam viabilizar a inserção desse operon no plasmídeo pBADMycHisB. Foi selecionada a opção *Cut at unique sites only* para selecionar apenas os sítios de restrição que ocorrem em uma única posição ao longo da seqüência.

## **7.5. Busca por Sítios de Restrição Parcialmente Conservados no Operon *vioABCD***

Inicialmente o programa ActivePerl 5.6.1.638 foi obtido a partir do site [www.activestate.com](http://www.activestate.com) e instalado em plataforma Windows. Os sítios de restrição selecionados no item 4.1.2, ou seja, os sítios de restrição presentes no sítio de restrição múltipla do plasmídeo pBADMycHisB que não estão presentes em regiões codificantes do operon *vioABCD*, foram selecionados para realização desta etapa. Os sítios de restrição que apresentavam extremidades abruptas após a clivagem foram descartados. Duas regiões do operon *vioABCD*, uma contendo 100 e outra 80 nucleotídeos, foram utilizadas como alvo na busca por sítios de restrição parcialmente conservados nas regiões à montante do gene *vioA* e à jusante do gene *vioD*, respectivamente. A primeira posição compreendeu a seqüência nucleotídica delimitada por cinquenta nucleotídeos à montante e cinquenta nucleotídeos à jusante do códon inicial do gene *vioA*, e a posição da segunda região compreendeu a seqüência nucleotídica delimitada por 80 nucleotídeos à jusante do códon de parada do gene *vioD*.

Basicamente o programa desenvolvido funcionou da seguinte forma: a) quando inicializado o programa solicitou o nome do arquivo contendo a seqüência de DNA a ser examinada. O arquivo .txt contendo esta seqüência nucleotídica foi colocado na mesma

pasta do programa antes deste ser interpretado; b) o programa solicitou a seqüência de DNA do sítio de restrição a ser localizado no DNA alvo, selecionada na etapa anterior; c) o programa em execução, buscou pelo sítio de restrição fornecido na etapa anterior, retornando as posições de ocorrência do mesmo ao longo do DNA avaliado. Posteriormente o programa buscou por variações pontuais do sítio de restrição selecionado, em uma e duas posições, como explicado adiante; d) todos os sítios de restrição intactos encontrados e suas variações foram salvos na pasta onde se encontrava o programa, em um arquivo denominado *Resultados.txt*. Este procedimento foi realizado para cada um dos sítios de restrição selecionados.

As variações dos sítios de restrição que o programa procurou no documento contendo o DNA alvo foram as seguintes, por exemplo: o sítio de restrição da enzima hipotética *AbcI* é constituído pela seqüência de DNA AAA. Nesse caso o programa procuraria pelo próprio sítio de restrição AAA ao longo do DNA alvo, bem como suas variações em uma posição da seqüência (seqüências CAA, GAA, TAA, ACA, AGA, ATA, AAC, AAG, AAT) e em duas posições da seqüência (seqüências CCA, CGA, CTA, CAC, CAG, CAT, GCA, GGA, GTA, GAC, GAG, GAT, TCA, TGA, TTA, TAC, TAG, TAT). O programa funciona da mesma forma para seqüências de sítios de restrição com mais de três pares de bases. O código fonte do programa está apresentado a seguir.

## 7.6. Programa para Localização de Sítios de Restrição Parcialmente Conservados

```
#!/usr/bin/perl -w

use strict;
use warnings;

my $resultados = "Resultados.txt";

unless ( open(RESULTADOS, ">$resultados") ) {
    print "Impossível escrever para arquivo \"$resultados\"\n\n";
    exit;
}

print "Digite o nome do arquivo com a sequencia de DNA:";
print RESULTADOS "Digite o nome do arquivo com a sequencia de DNA: ";

#####
```

```
# Declarando variáveis
#
#
my @dna5;
my @dna4;
my $motif1;
my $dnafilename;
my @dna;
my $dna;
my $motif;
my $motif_;
my $offset = 0;
my @motif;
my $dna2;
my @motif3;
my @motif2_;
my @motif2_2;
my @dna2_;
my @dna5_;
my $cc;
my @cc;
my $posicao_certa = 0;
#
#####

#####
# Entrada de dados
#
$dnafilename = <STDIN>;
chomp $dnafilename;
unless ( open(DNAFILE, $dnafilename) ) {
print RESULTADOS "Nao foi possivel abrir o arquivo \"$dnafilename\"\n\n";
print "Nao foi possivel abrir o arquivo \"$dnafilename\"\n\n";
while (<>) {
    exit;
}
}
@dna = <DNAFILE>;
print RESULTADOS $dnafilename;
close DNAFILE;
$dna = extract_sequence_from_fasta_data(@dna);
$dna2 = $dna;
print "Digite o motif a ser procurado: ";
print RESULTADOS "\n\nDigite o motif a ser procurado: ";
$motif1 = <STDIN>;
chomp $motif1;

if (length($motif1) < 1) {
    print "Motif incorreto";
    print "\n\nTecle enter para sair.\n\n";
    while (<>) {
        exit;
    }
}

print RESULTADOS $motif1;
```

```
$motif = lc ($motif1);
#
#####

#####
# Gera mutações em uma posição
#
$motif_ = $motif;
@motif = mudalnt($motif_);
#
#####

#####
# Gera mutações em duas posições
#
@motif2_ = muda2nt($motif_);
#
#####

#####
# Encontra sítios intactos
#####
#
print "\nSitios intactos\n\n";
print RESULTADOS "\nSitios intactos\n\n";

my $result = index( lc $dna, lc $motif, $offset);
while ($result != -1) {
    $posicao_certa = $result + 1;
    $cc .= "\tEncontrado $motif na posicao $posicao_certa\n:";
    @cc = split(/:/, $cc);
    $offset = $result + 1;
    $result = index($dna, $motif, $offset);
}

print "@cc\n";
print RESULTADOS "@cc\n";

if (scalar (@cc) < 1) {
    print "\tNenhum sitio encontrado\n\n";
    print RESULTADOS "\tNenhum sitio encontrado\n\n";
}
#
#####

#####
# Encontra sítios com mutações
#####
# Com uma mutação
#
print "Sitios com uma mutacao\n\n";
print RESULTADOS "Sitios com uma mutacao\n\n";
@motif3 = @motif;
```

```

@dna4 = $dna2;
@dna5 = compara_seqs(@motif3,@dna4);
print @dna5;
print RESULTADOS @dna5;
#
#####
# Com duas mutações
#
print "\nSitios com duas mutacoes\n\n";
print RESULTADOS "\nSitios com duas mutacoes\n\n";
@motif2_2 = @motif2_;
@dna2_ = $dna2;
@dna5_ = compara_seqs(@motif2_2,@dna2_);
print @dna5_;
print RESULTADOS @dna5_;
#
#####

print "\n\nTecla enter para sair.\n\n";

close (RESULTADOS);

while (<>) {
    exit;
}

exit;

#####
# Sub-rotinas
#####

#####
# extract_sequence_from_fasta_data
#
sub extract_sequence_from_fasta_data {
my(@fasta_file_data) = @_;

use strict;
use warnings;

my $sequence = '';
my $sequencel;
foreach my $line (@fasta_file_data) {
if ($line =~ /\s*$/) {
next;
} elsif($line =~ /\s*#/) {
next;
} elsif($line =~ />/) {
next;
} else {
$sequence .= $line;
}
}
}

```

```
$sequence =~ s/\s//g;
$sequence1 = lc ($sequence);
$sequence1;
}

#
#####

#####
# Gera mutações em uma posição do sítio de restrição

sub mudalnt {
my($DNA) = @_;

use strict;
use warnings;

my @bases = ('a', 'c', 'g', 't');
my $DNA_1 = lc ($DNA);
my $dados;
my @seqs;
my $DNA_;
my $ii;

for (my $a = 0; $a < length($DNA); $a++) {
    $DNA_ = lc $DNA;
    for (my $i = 0; $i < 4; $i++) {
        substr($DNA_, $a, 1,$bases[$i]);
        if ($DNA_ ne $DNA) {
            $dados .= "$DNA_:";
        }
    }
}

@seqs = split(/:/, $dados);
return @seqs;

}
#
#####

#####
# Compara o dna alvo com o motif e suas variações

sub compara_seqs{

my (@seqs_) = @_;

use strict;
use warnings;

my @DNA3;
my $DNA;
my $offset;
my $i;
my $result;
my @resultados;
```

```

my $resultados = '';
my $DNA1;
my $posicao_certa1 = 0;
@DNA3 = pop(@seqs_);
$DNA1 = $DNA3[0];
$DNA = lc $DNA1;
$offset = 0;

for ($i = 0; $i < scalar @seqs_ ; $i++) {
    $result = index($DNA, $seqs_[$i], $offset);
    while ($result != -1) {
        $posicao_certa1 = $result + 1;
        $resultados .= "\tEncontrado $seqs_[$i] na posicao
$posicao_certa1\n:";
        $offset = $result + 1;
        $result = index($DNA, $seqs_[$i], $offset);
    }
    $offset = 0;
}

if ($resultados ne '') {
    @resultados = split(/:/, $resultados);
    return @resultados;
} else {
    print "\tNenhum sitio encontrado\n\n";
    print RESULTADOS "\tNenhum sitio encontrado\n\n";
    return @resultados = ();
}
}
#
#####
#####
# Gera mutações em duas posições do sítio de restrição

sub muda2nt {
my($DNA) = @_ ;

use strict;
use warnings;

my @bases;
my $pos3;
my $pos1;
my $DNA_A;
my $nucl;
my $DNA1;
my $pos2;
my $nuc2;
my $seq;
my @seqs;

@bases = ('a', 'c', 'g', 't');
$pos3 = '1';

for ($pos1 = 0; $pos1 < length($DNA); $pos1++) {
    $DNA_A = $DNA;
    for ($nucl = 0; $nucl < 4; $nucl++) {

```

```

    substr($DNA_A, $pos1, 1,$bases[$nuc1]);
    $DNA1 = $DNA_A;
    for ($pos2 = $pos3 ;$pos2 < length(lc $DNA); $pos2++) {
        for ($nuc2 = 0; $nuc2 < 4; $nuc2++) {
            substr($DNA1, $pos2, 1,$bases[$nuc2]);
            if ($DNA1 ne $DNA) {
                $seq .= "$DNA1:";
            }
        }
        $DNA1 = $DNA_A;
    }
}
$pos3++;
}

@seqs = split(/:/, $seq); # array de mutações em duas posições

#####
# gera mutações em um bp
my @bases2 = ('a', 'c', 'g', 't');
my $DNA_1 = lc ($DNA);
my $dados;
my @seqs2;
my $DNA_;
my $ii;

for (my $a = 0; $a < length($DNA); $a++) {
    $DNA_ = lc $DNA;
    for (my $i = 0; $i < 4; $i++) {
        substr($DNA_, $a, 1,$bases2[$i]);
        if ($DNA_ ne $DNA) {
            $dados .= "$DNA_:";
        }
    }
}

@seqs2 = split(/:/, $dados); # array de mutações em uma posição

#####
# Limpa seq de 2nt modificados

my $i = 0;
my $ib = 0;
my @mut3;
my $x;
my $j;
my $ib1;
my @seqs2b;

@mut3 = @seqs;

for ($i = 0; $i < scalar @seqs; $i++) {
    for ($ib = 0; $ib < scalar @seqs2; $ib++) {

        if ($seqs[$i] eq $seqs2[$ib]) {

            $x .= "$seqs[$i]:";

```

```

    }
  }
}

@seqs2b = split(/:/, $x); # posições das seqs p retirar

#####

#my $seq;      # seq das mutações em 2nt separados por ':'
#my @seqs2b; # seqs a ser extraídas
my $iii = 0;
my $b = 0;
my $v;

for ($v = 0; $v < scalar @seqs2b; $v++) {
  while ($b != -1) {
    $b = index ($seq, $seqs2b[$v], $iii);
    if ($b != -1) {
      substr ($seq, $b, length ($DNA) + 1) = "";
    }
  }
}
$b = 0;
}
@mut3 = split(/:/, $seq);
return @mut3;

}

```

## 7.7. Avaliação dos Quadros Abertos de Leitura

Objetivando avaliar quais pares de enzimas de restrição poderiam ser utilizados para a realização da clonagem direcional do operon *vioABCD* no plasmídio pBADMyHisB, foram analisados os sítios de restrição obtidos nas etapas anteriores. Os sítios de restrição intactos e parcialmente conservados encontrados nos itens 4.1.2 e 4.1.3 foram utilizados para avaliar o ajuste dos quadros de leitura do plasmídio pBADMyHisB e do operon *vioABCD*.

O procedimento consistiu em verificar se o quadro de leitura do promotor P<sub>BAD</sub> se ajustava perfeitamente ao quadro de leitura do operon *vioABCD*, após a ligação do plasmídio pBADMyHisB ao operon *vioABCD*, previamente digeridos com o mesmo par de enzimas da restrição. Esta etapa foi de extrema importância, pois, se os quadros de leitura não estivessem ajustados, seriam obtidas proteínas completamente diferentes das reais enzimas do operon *vioABCD*; e como consequência, não seria possível a obtenção do produto desejado durante cultivos do microrganismo transformado com este plasmídio.

Visando verificar as orientações dos quadros de leitura, foram simuladas digestões enzimáticas da região à montante e à jusante do operon *vioABCD* e do sítio de restrição múltipla do plasmídio pBADMycHisB, com as enzimas de restrição que utilizam como DNA alvo as seqüências dos sítios de restrição mencionados acima. O procedimento de localização dos sítios de restrição foi realizado com a utilização do programa Jellyfish 1.5, como descrito no item 4.1.2. As seqüências nucleotídicas do operon *vioABCD* delimitadas pelos exatos locais de corte dos pares de enzimas de restrição, foram copiadas e coladas em um novo documento de texto. Dessa forma, foram obtidas diferentes seqüências de DNA contendo o operon *vioABCD* com extremidades 5' e 3' digeridas por diferentes pares de enzimas de restrição. No caso dos cortes enzimáticos nos sítios de restrição parcialmente conservados obtidos no item 4.1.3, estes foram localizados por meio da caixa de busca do programa Jellyfish 1.5 e alterados para a sua forma intacta antes da simulação da digestão, ou seja, as mutações contidas no sítio foram alteradas de forma a restaurar o sítio de restrição original. Por exemplo, considere o sítio hipotético AAAAAA, e sua variação AAAAAG. Neste caso, o sítio de restrição parcialmente conservado AAAAAG seria localizado no DNA alvo, e modificado para AAAAAA antes da simulação da digestão enzimática.

As digestões enzimáticas também foram realizadas com a seqüência nucleotídica do plasmídio pBADMycHisB, mas nesse caso o DNA delimitado pelos diferentes cortes enzimáticos realizados com os diferentes pares de enzimas de restrição, foram descartados, obtendo-se plasmídios prontos para a clonagem do operon *vioABCD* sob controle do promotor *araBAD*. Dessa forma obteve-se um conjunto de seqüências nucleotídicas desse plasmídio, digeridas com diferentes pares de enzimas de restrição.

As seqüências nucleotídicas do operon *vioABCD* digeridas enzimaticamente com um dado par de enzimas de restrição, foram inseridas nas seqüências nucleotídicas do plasmídio pBADMycHisB previamente digeridas com os mesmos pares de enzimas de restrição. As posições das inserções das seqüências nucleotídicas digeridas do operon *vioABCD* que foram inseridas no plasmídio pBADMycHisB, localizaram-se nos exatos locais compreendidos entre as extremidades geradas pelo corte enzimático nesse plasmídio, e na orientação que permite a complementação dos sítios de restrição. Como controle positivo desse procedimento, foi verificada a presença do par de sítios para enzimas de

restrição utilizadas anteriormente na simulação da reação de digestão das duas seqüências. Se estes fossem encontrados no DNA resultante da simulação da reação de ligação, isto indicaria que a inserção ocorreu na orientação correta. Este procedimento foi realizado para cada uma das seqüências nucleotídicas, obtendo-se assim uma coleção de plasmídios ligados ao seu respectivo inserto contendo o operon *vioABCD*. Esta coleção de seqüências foi salva no formato .txt.

Finalmente foram verificados os quadros de leitura dos plasmídios obtidos pelas diferentes reações de ligação. Nessa etapa foi utilizado o programa Jellyfish 1.5. A seqüência nucleotídica do plasmídio a ser avaliado foi inserida no programa, como descrito no item 4.1.2. Posteriormente foi selecionada a opção *Actions/Translate* e as opções *Add +1*, *Add +2* e *Add +3*, para simular a tradução dos plasmídios nos três quadros de leitura possíveis. Foi verificado qual dos três quadros de leitura obtidos codificava o aminoácido metionina do códon ATG utilizado pelo plasmídio pBADMycHisB para o início da transcrição a partir do promotor *araBAD*. O quadro de leitura utilizado pelo gene *vioA* foi verificado da mesma forma. As seqüências de proteínas obtidas após a tradução dos plasmídios formados pelas ligações das diferentes digestões do operon *vioABCD* ao plasmídio pBADMycHisB; foram comparadas com a seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *vioA*, por meio da ferramenta *Alignments*. Estas seqüências protéicas foram inseridas na caixa *Alignments* por meio do botão “+”. Posteriormente, a opção *Align* foi selecionada. Os plasmídios para os quais o quadro de leitura utilizado não era o mesmo utilizado pelo gene *vioA*, foram descartados. Dentre os selecionados, foram escolhidos aqueles nos quais o corte enzimático fez com que o promotor do operon *vioABCD* fosse eliminado, de forma que o promotor *araBAD* fosse utilizado para a transcrição dos genes do operon *vioABCD*.

## **7.8. Desenho de Iniciadores para Clonagem Direcional do Operon *vioABCD* e do Gene *vioE***

O programa Oligo 6.68 foi utilizado para o desenho de iniciadores utilizados para a amplificação do operon *vioABCD* e do gene *vioE*. Inicialmente, após a inicialização do

programa, foi selecionada a opção *File/ New Sequence*, obtendo-se assim uma nova janela em branco. A seqüência nucleotídica do operon *vioABCD*, obtida na item 4.1.1 foi copiada e colada nesta janela. Foi selecionada a opção *File/Save/Data*. As seqüências nucleotídicas determinadas no item 7.7 foram selecionadas como local para clivagem na região à montante do gene *vioA* e à jusante do gene *vioD*. Para tanto, estas seqüências foram localizadas no operon *vioABCD* por meio da ferramenta *Search/Find*. Visando encontrar o exato local onde as seqüências ocorrem, 8 nucleotídeos adicionais foram incluídos a região à montante e 30 nucleotídeos à jusante das seqüências que foram utilizadas para o desenho dos iniciadores que se ligariam na região à montante do gene *vioA*. No caso dos iniciadores que se ligariam na região à jusante do gene *vioD*, foram incluídos 30 nucleotídeos na região à montante e 8 nucleotídeos à jusante das seqüências a serem localizadas no operon *vioABCD*. Estes nucleotídeos adicionais foram determinados por meio da localização destes nas seqüências nucleotídicas do gene *vioA* e região à montante e da região à jusante do gene *vioE*, utilizando a ferramenta *Editar/Localizar*. Os nucleotídeos imediatamente à montante e à jusante da seqüência localizada foram copiados juntamente com a mesma, e colados na caixa de busca do programa Oligo para localização de suas posições, como descrito acima. As posições das seqüências foram anotadas a partir da caixa *Selection*. Esta janela foi então fechada e a opção *Analyse/Oligo Stability Graph* foi utilizada. Foi selecionada a opção *Edit/Upper Primer*, e as seqüências selecionadas a partir do gene *vioA* e região à montante foram coladas na nova janela. Na caixa 5' foi digitada a posição da seqüência inserida. A janela foi fechada e as alterações salvas. Este procedimento também foi realizado para as seqüências obtidas a partir da região à jusante do gene *vioE*, porém, foi utilizada a opção *Edit/Lower Primer* e nesta janela foram utilizados os complementos reversos das seqüências selecionadas. Os complementos reversos das seqüências foram obtidos no programa Jellyfish por meio da opção *Reverse-Complement*. Nos casos em que as seqüências de sítios de restrição utilizados nesta etapa eram provenientes de sítios de restrição parcialmente conservados, estes foram previamente alterados para sua forma correta antes das seqüências serem salvas nas janelas *Edit/Upper Primer* e *Edit/Lower Primer*.

Para cada um dos diferentes pares de seqüências inseridas em *Edit/Upper Primer* e *Edit/Lower Primer*, foi selecionada a opção *Analyse/PCR*, abrindo a janela que fornece

informações sobre as seqüências inseridas anteriormente, as quais foram avaliadas como possíveis iniciadores para a amplificação do operon *vioABCD* por meio da PCR. Os principais parâmetros que um potencial par de iniciadores deveria apresentar foram: a) evitar a ocorrência de estruturas secundárias, como ligações do iniciador adiante e do reverso, bem como a formação de *loops* no próprio iniciador; b) sempre que possível a porcentagem de CG deveria ficar entre 40-60%; c) verificar se a temperatura de anelamento dos iniciadores não difere mais que 1°C; d) verificar se a temperatura de anelamento dos iniciadores tem pelo menos 12°C de diferença em relação à temperatura de anelamento do produto. Para realizar o ajuste de todos estes parâmetros a cada um dos possíveis pares de iniciadores, nucleotídeos das extremidades 5' e 3' dos iniciadores adiante e reverso foram deletados sucessivamente, e a cada deleção os parâmetros foram avaliados. Dessa forma foram obtidos os iniciadores para amplificação do operon *vioABCD*.

Visando inserir mais um gene necessário à síntese de violaceína no plasmídio obtido pela ligação do operon *vioABCD* ao plasmídio pBADMycHisB, procedeu-se o desenho de iniciadores para amplificação do gene *vioE*. A determinação do sítio de restrição a ser utilizado para a inserção do gene *vioE* no plasmídio pBvioABCD foi baseada na seqüência nucleotídica obtida com a ligação do plasmídio pBADMycHisB ao operon *vioABCD* previamente digeridos com o mesmo par de enzimas de restrição. A localização de sítios de restrição e foi realizada como descrito nos itens 4.1.2 e 4.1.3. O desenho de iniciadores para a amplificação do gene *vioE* foi realizado da mesma forma utilizada para o operon *vioABCD*. Parâmetros como o ajuste dos quadros de leitura, posicionamento correto de códons de terminação e locais de ligação dos ribossomos foram avaliados. Dessa forma foi possível a obtenção de pares de iniciadores que, quando utilizados para a amplificação do gene *vioE*, posterior digestão enzimática e ligação deste gene; satisfizessem todos os requisitos necessários ao funcionamento correto dos genes necessários à biossíntese de violaceína.

## **7.9. Meios de Cultura e Soluções**

### **7.9.1. Meio de cultura LB**

O meio de cultura LB foi composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L extrato de levedura e 10 g/L de cloreto de sódio. Os reagentes foram solubilizados em água destilada e o pH 7 foi aferido em um pHmetro pela adição de soluções de NaOH ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min e posteriormente acondicionado a 0°C.

Para a solidificação do meio de cultura LB, este foi adicionado de 15 g/L de ágar bacteriológico após a aferição do pH, solubilizado por meio de aquecimento em um forno de microondas e então autoclavado.

### **7.9.2. Soluções de ampicilina e L-arabinose**

A solução estoque de ampicilina foi preparada da seguinte forma. Foi feita uma solução de 10 mL de ampicilina a 100 mg/mL em água ultra pura. Esta solução foi filtrada em membrana de celulose estéril de 0,22 µm de diâmetro de poro e acondicionada a -20°C. No momento do uso, a solução estoque foi descongelada e adicionada ao meio de cultura estéril. No caso do meio de cultura sólido, após a esterilização em autoclave este foi resfriado a aproximadamente 50°C e, então, o volume necessário da solução de ampicilina foi adicionado ao meio que foi então agitado e imediatamente vertido em placas de Petri previamente esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 min e secas em estufa a 60°C por 24 h. A solução estoque de L-arabinose a 20% (m/v) foi esterilizada e estocada da mesma forma que a solução de ampicilina.

Todos os procedimentos de manipulação das soluções estéreis foram realizados em uma câmara de fluxo laminar 2ª, devidamente esterilizada. Antes da utilização, a câmara foi limpa com algodão embebido em etanol a 70% (v/v) e submetida à radiação UV por 20 min.

### 7.9.3. Solução tampão TEB

A solução tampão TEB é composta por 100 mM de Tris, 90 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA solubilizados em água destilada. Rotineiramente no laboratório utiliza-se uma solução estoque de tampão TEB 10X concentrada. Esta solução é acondicionada em temperatura ambiente, e diluída no momento da utilização.

### 7.10. Obtenção de Células Competentes de *Escherichia coli*

O seguinte protocolo foi utilizado para a obtenção de células competentes de *Escherichia coli* DH10B e TOP10. Estoques armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  das diferentes linhagens de *E. coli* foram inoculados em meio de cultura LB sólido e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 h. Colônias isoladas de cada linhagem foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB líquido e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 h a 150 rpm. Volumes de 2,5 mL destas culturas foram inoculados em 250 mL de meio de cultura LB suplementado com 20 mM de  $\text{MgSO}_4$ , e cultivados a  $37^{\circ}\text{C}$  e 150 rpm. Para a determinação das densidades ópticas das culturas, alíquotas de 750  $\mu\text{L}$  foram coletadas em intervalos de 30 min e analisadas com auxílio de um espectrofotômetro, a 590 nm. Após atingirem a  $\text{DO}_{590}$  de 0,5, cada uma das culturas foi precipitada por centrifugação a 5000-g por 5 min e temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , e os sobrenadantes foram descartados. Cada um dos precipitados formados foi suspenso em 72 mL de solução TFBI, previamente armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$  (A solução TFBI é composta por 30 mM de acetato de potássio, 100 mM de cloreto de rubídio, 10 mM de cloreto de cálcio, 50 mM de cloreto de manganês e 15% (v/v) de glicerol em pH 5,8. O pH da solução foi ajustado com ácido acético a 500 mM e hidróxido de potássio a 500 mM. A solução foi então esterilizada por filtração em um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro, e acondicionada a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento de utilização). Os precipitados que foram suspensos em na solução TFBI foram incubados em gelo por 5 min e novamente precipitados a 5000-g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em 7,2 mL de solução TFBII, previamente acondicionada a  $4^{\circ}\text{C}$  e incubados em gelo por 1 h (A solução TFBII é composta por 10 mM de 1,4-piperazinobis (ácido etanossulfônico), 75 mM de cloreto de cálcio, 10 mM de cloreto de rubídio e 15% (v/v) de glicerol, em pH 6,5. O pH da

solução foi ajustado com ácido acético 500 mM e hidróxido de potássio 500 mM. A solução foi então esterilizada por filtração em um filtro de 0,22 µm de diâmetro de poro, e acondicionada a 4°C até o momento de utilização). Após o período de incubação, alíquotas de 200 µL de cada uma das culturas foram acondicionadas em microtubos estéreis previamente resfriados a 4°C. Os microtubos foram então congelados em nitrogênio líquido e acondicionados a -80°C até o momento de utilização.

### **7.11. Procedimentos de Transformação**

Nos procedimentos realizados para as transformações das bactérias *Escherichia coli* DH10B e TOP10 foram utilizadas as células competentes descritas acima. Para tanto, microtubos contendo as células competentes a serem transformadas foram acondicionados a 0°C para que descongelassem. Posteriormente o DNA a ser utilizado no procedimento de transformação foi adicionado às células competentes. O conteúdo do microtubo foi misturado 5 vezes por inversão e incubado em gelo por 1 h. Após este período as células foram submetidas a um choque térmico a 37°C por 45 s, e imediatamente incubadas em gelo por 2 min. Posteriormente, foram adicionados 1200 µL de meio de cultura LB a cada tubo, e estes foram incubados a 37°C por 20 min a 200 rpm. Alíquotas de 100 µL dos tubos foram inoculadas em meio LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, e incubadas a 37°C por 18 h. Após este período, o surgimento de colônias transformantes foi avaliado.

### **7.12. Eletroforese em Gel de Agarose**

Os procedimentos realizados para a análise de amostras de DNA por meio de eletroforese em gel de agarose foram os seguintes. Foram utilizados géis de 0,8% (m/v) de agarose. Os ensaios foram realizados em uma cuba eletroforética GNA 100 - Pharmacia Biotech. Foram utilizados géis de 50 mL, diluídos em tampão TAE (4,84 g/L de Tris-base; 0,372 g/L de EDTA; 1,142 mL/L de ácido acético glacial). Os géis foram solubilizados por aquecimento em um forno de microondas em baixa potência, resfriados em temperatura

ambiente até aproximadamente 50°C e adicionados de 0,5 µg/mL de brometo de etídio antes da aplicação na cuba eletroforética. Antes da aplicação no gel, alíquotas das amostras a serem analisadas foram adicionadas de tampão de carregamento na proporção de 1:4 de amostra e tampão de carregamento, respectivamente. Este tampão foi composto de 65% (m/v) de sacarose, 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de EDTA e 0,3% (m/v) de azul de bromofenol. Foram utilizados 500 ng do marcador de peso molecular  $\lambda$ /*Hind*III para verificação dos tamanhos e concentrações dos produtos das reações. O marcador foi adicionado de tampão de carregamento na proporção descrita acima e aplicado ao gel. Os ensaios foram realizados a 80 V, 80 mA, por 1 h. Os géis foram avaliados em um transiluminador UV (Hoefer, 302 nm) e fotografados (Kodak, Image Station 440 CF).