



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016018426-6 A2



(22) Data do Depósito: 10/08/2016

(43) Data da Publicação Nacional: 29/09/2020

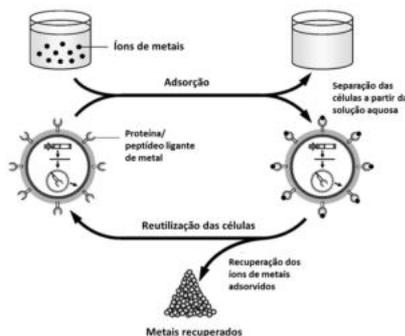
(54) **Título:** ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO COM PROTEÍNAS DERIVADAS DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO CRASSOSTREA, PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE UM AMBIENTE COMPREENDENDO METAIS PESADOS, E PROCESSO DE BIOMINERAÇÃO DE UM AMBIENTE COMPREENDENDO METAIS PESADOS

(51) **Int. Cl.:** C12N 1/21; C12R 1/05; A01N 25/32; C02F 3/34; B09C 1/10.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO; BIO BUREAU DESENVOLVIMENTOS DE BASES BIOLÓGICAS E LICENCIAMENTOS LTDA.

(72) **Inventor(es):** MAURO DE FREITAS REBELO; FRANCESCO DONDERO; JULIANA ALVES AMERICO.

(57) **Resumo:** ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO COM PROTEÍNAS DERIVADAS DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO CRASSOSTREA, PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE UM AMBIENTE COMPREENDENDO METAIS PESADOS, E PROCESSO DE BIOMINERAÇÃO DE UM AMBIENTE COMPREENDENDO METAIS PESADOS A presente invenção descreve organismos geneticamente modificados capazes de expressar um gene sintético com múltiplas cópias dos domínios de ligação de metal da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae*. Este novo organismo é capaz de remover metais pesados de ambientes como solos, fluidos naturais e industriais. A presente invenção também descreve um produto para a biorremediação que contém este organismo e a um processo de biorremediação de ambientes compreendendo metais pesados. A presente invenção ainda descreve um produto para a biomineração que contém este organismo e a um processo de biomineração de metais pesados.



## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO COM PROTEÍNAS DERIVADAS DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *CRASSOSTREA*, PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE UM AMBIENTE COMPREENDENDO METAIS PESADOS, E PROCESSO DE BIOMINERAÇÃO DE UM AMBIENTE COMPREENDENDO METAIS PESADOS

### **Campo da Invenção**

[1]. A presente invenção descreve um organismo geneticamente modificado (OGM) capaz de expressar um gene sintético com múltiplas cópias dos domínios de ligação de metal da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae*. Este OGM é capaz de remover metais pesados de ambientes como solos, fluidos naturais e industriais.

[2]. A presente invenção também descreve um produto para a biorremediação que contém este OGM e a um processo de biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados.

[3]. A presente invenção ainda descreve um produto para a biomineração que contém esta bactéria e a um processo de biomineração de metais pesados.

### **Antecedentes da Invenção**

[4]. Metais pesados são elementos ubíquos na biosfera e sempre estiveram disponíveis no ambiente, em concentrações baixas e raramente tóxicas, emitidos por processos naturais como atividade vulcânica, erosão da superfície terrestre e incêndios florestais. No entanto, com a rápida industrialização no século XX, as emissões de origem antropogênica aumentaram dramaticamente e em muitas instâncias superaram as emissões naturais. Conseqüentemente, esses elementos começaram a se acumular no ambiente, em grande parte, em

função da mobilização em larga escala das reservas naturais de metais por mineração, além da queima de combustíveis fósseis e do uso extensivo destes elementos em processos industriais, gerando resíduos líquidos e sólidos contaminados, frequentemente lançados no ambiente sem tratamentos prévios (Callender, 2003).

**[5].** Quase todos os processos industriais envolvem a utilização de metais, de forma direta, como a mineração, beneficiamento de minério e metalurgia; ou indireta, na indústria química e petroquímica e na produção de insumos e biocidas para a agricultura. A indústria tecnológica também tem contribuído com este tipo de contaminação devido à velocidade com que os equipamentos se tornam obsoletos e a grande quantidade de metais pesados nas baterias.

**[6].** Há mais de 30 anos, Nriagu e Pacyna (1988) chamaram atenção do mundo para a epidemia silenciosa de milhões de casos clínicos e subclínicos resultantes da exposição crônica a metais pesados poluentes no ambiente. Atualmente, esta ainda é uma das principais ameaças ambientais à saúde humana. Segundo o Instituto Blacksmith, dos seis poluentes que mais colocam em risco a saúde de dezenas de milhões de pessoas, quatro são metais pesados: chumbo, mercúrio, crômio e arsênico, seguidos por pesticidas e radionuclídeos (McCartor e Becker, 2010).

**[7].** Estima-se que, mundialmente, indústrias descartam entre 300 e 400 milhões de toneladas de metais pesados, solventes e outros resíduos tóxicos em corpos d'água por ano (Palanaiappan *et al.*, 2010). Em países em desenvolvimento, 70% dos resíduos industriais são descartados sem tratamento em corpos d'água, rios, lagos e zonas costeiras altamente produtivas, ameaçando a saúde humana, a segurança alimentar e contribuindo com o crescente declínio da qualidade da água e, conseqüentemente, da disponibilidade de água potável para consumo humano (UN-waters, 2014). Este quadro é agravado pelo fato de metais pesados não serem degradáveis e serem persistentes no ambiente e em organismos vivos, sendo a sua remoção a partir de ambientes contaminados considerada difícil (Lemos *et al.*, 2008).

**[8].** No entanto, por outro lado, o uso de metais é necessário em setores estratégicos como construção civil, transporte, produção de alimentos, abastecimento de água, tratamento de esgoto e fornecimento de energia, sendo, portanto, elemento chave e indispensável para o desenvolvimento de serviços e infraestrutura. Com o crescimento populacional e da urbanização, principalmente em países emergentes como China e Brasil, em conjunto com as já altas exigências de metais em países desenvolvidos e industrializados, existe uma demanda por metais sem precedentes (Ericsson & Hodge, 2012).

**[9].** Em contraste, a acessibilidade de minérios enriquecidos com metais tem gradativamente diminuído. Minérios superficiais com alto teor (concentração) de metais estão em declínio e a extração de metais a partir de estoques profundos, formados por minérios de baixo teor e de composições mais complexas, tem custos econômicos elevados, além de implicarem em um maior uso de energia, água e químicos, assim como em uma maior produção de resíduos contaminados, aumentando ainda mais o impacto ambiental da atividade de mineração (Ericsson & Hodge, 2012; Nhapi *et al.*, 2011).

**[10].** Neste contexto, atualmente existem duas demandas, aparentemente contraditórias: por quantidades cada vez maiores de metais e pela redução da emissão destes elementos no ambiente. O desenvolvimento de novas tecnologias sustentáveis para a extração de metal a partir de minérios de baixo teor e para o tratamento dos resíduos tóxicos gerados pela mineração e outras atividades industriais é urgente para atender a estas expectativas.

**[11].** Biorremediação e biomineração de metais pesados

**[12].** Além da extração sustentável de metais a partir de minérios de baixo teor, a exploração de fontes secundárias de metais também pode ser importante para suprir a demanda por estes elementos, em tempos de escassez destes recursos. A remoção de metais pesados de efluentes industriais contaminados não só é uma exigência legal e necessária para a preservação ambiental e de recursos naturais (ex: solo e água), como também representa uma oportunidade de recuperação de metais pesados, sendo,

portanto, uma potencial fonte secundária destes elementos (Lee e Pandey, 2012).

**[13].** As técnicas convencionalmente utilizadas para remover metais pesados de efluentes industriais se baseiam em processos físico-químicos, tais como adsorção a polímeros sintéticos, precipitação química, troca iônica, extração por solventes, entre outras (Barakat *et al.*, 2010). Estes métodos, no entanto, apresentam uma série de limitações como baixa seletividade e consequente sobrecarga dos sítios de ligação com metais alcalinos terrosos não tóxicos (por exemplo Ca e Mg), utilização de grandes quantidades de compostos químicos, geração de grandes volumes de resíduos tóxicos, alto custo operacional, o que em alguns casos impossibilita a aplicação em grande escala e, principalmente, baixa eficiência para o tratamento de volumes grandes de efluentes contaminados com concentrações baixas de metais (<100 mg/L) (Volesky, 2001 e Valls e Lorenzo, 2002). Com isso, frequentemente, existem dificuldades técnicas para atingir os níveis de descarte aceitos pela legislação ambiental vigente, que no Brasil é determinada pela resolução CONAMA N°430/2011.

**[14].** Processos biotecnológicos têm sido apontados como alternativas mais eficientes, econômicas e sustentáveis para o tratamento de efluentes contaminados com metais pesados (Wang e Chen, 2009; Vieira e Volesky, 2000; Veglio e Beolchini, 1997). Evolutivamente, os seres vivos tiveram que lidar com a exposição a metais pesados tóxicos desde muito cedo, uma vez que estes elementos sempre estiveram presentes na crosta terrestre. Em particular, os microrganismos, a primeira forma de vida a surgir na Terra, há aproximadamente 3,5 bilhões de anos atrás, têm uma longa história evolutiva de interação com metais presentes no ambiente.

**[15].** De fato, a interação entre microrganismos e metais é grande e muitas das propriedades microbianas exercem funções na biotransformação e no ciclo biogeoquímico de metais, afetando a especiação, toxicidade e mobilidade de metais assim como a formação e a dissolução de minerais (Gadd, 2010). Desta forma, nas suas muitas formas de interação com metais, microrganismos influenciam diretamente o destino destes elementos no ambiente e com isso

podem representar um meio para diminuir a contaminação já existente, assim como para remover e/ou recuperar metais de interesse comercial.

**[16].** As interações metal-microrganismo podem ser exploradas biotecnologicamente nos processos de biorremediação e de biomineração. A biorremediação consiste na utilização de microrganismos (bactérias, fungos, algas) ou plantas, para remoção ou redução de poluentes, como metais pesados, presentes no ambiente ou em efluentes (Gaur *et al.*, 2014, Garbisu e Alkorta, 2003). Em contrapartida, a biomineração consiste na extração de metais por meio da dissolução de sulfetos minerais, inclusive de minérios com baixo teor de metais, por meio da atividade metabólica de microrganismos (Schippers *et al.*, 2013).

**[17].** Os processos microbianos que resultam na mobilização de metais a partir de rochas, minerais, solos e outros substratos, ou seja, na conversão de compostos metálicos insolúveis em solúveis, tem aplicações principalmente na biomineração (Gadd, 2004), embora a dissolução de metais insolúveis presentes em solos e em resíduos sólidos contaminados também possa ajudar na sua posterior biorremediação (Bosecker, 2001). Estes processos de mobilização incluem a biolixiviação, que ocorre por diferentes mecanismos, mas, principalmente, pela ação de bactérias quimiolitotróficas e acidofílicas, por exemplo, *Acidithiobacillus thiooxidans*, que no processo de fixação de CO<sub>2</sub> e obtenção de energia por oxidação de íons ferrosos ou de compostos de enxofre reduzidos, liberam Fe(III) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dissolvendo sulfetos minerais por acidificação (Gadd, 2004).

**[18].** Por outro lado, os processos microbianos que levam a imobilização de metais na biomassa microbiana podem ser aplicados na biorremediação destes elementos e, portanto, na remoção e recuperação de metais a partir de efluentes contaminados (Gadd, 2004). A imobilização de metais pode também ter aplicações na mineração, para recuperar os metais disponibilizados a partir do processo de lixiviação (dissolução) de minerais, seja ela química ou biológica (biomineração). A **Figura 1** resume algumas das estratégias de

resistência e detoxificação de metais desenvolvidas por microrganismos e que podem ser relevantes nestes dois processos biotecnológicos.

**[19].** Metais catiônicos, como cádmio, zinco e ferro, podem ser sequestrados por grupamentos funcionais de carga negativa (por exemplo,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{PO}_3\text{H}$ ) disponíveis em componentes da membrana, parede celular, ou ainda, de exopolímeros, uma mistura complexa de biopolímeros (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, etc), presente na superfície celular em algumas espécies e que, entre diversas funções, atuam na defesa contra patógenos e dessecação (Pal e Paul, 2008). A imobilização dos metais nestas estruturas impede que os mesmos entrem na célula e causem efeitos tóxicos.

**[20].** Outros componentes extracelulares (secretados) relevantes para a mobilização de metais, mas não representados na **Figura 1**, são os sideróforos, compostos orgânicos que atuam na captação de ferro, mas que podem se complexar com outros metais quimicamente semelhantes a ele, como crômio e alumínio. Além dos sideróforos, alguns microrganismos produzem substâncias surfactantes, por vezes, também secretadas, que formam complexos não tóxicos com metais (Roane *et al.*, 2009).

**[21].** Em outros casos, a biodisponibilidade de metais é alterada pela liberação de subprodutos metabólicos que resultam na precipitação dos íons de metais, na forma de precipitados de compostos insolúveis, como sulfetos e fosfatos metálicos, que podem se acumular na superfície do microrganismo. Este é um mecanismo de defesa de alguns microrganismos, no entanto, a precipitação de metais também pode ocorrer de forma passiva, como resultado da interação química entre metais e a superfície celular (Veglio e Beolchini, 1997). Alguns mecanismos de detoxificação também envolvem a alteração da especiação do metal como forma diminuir a sua toxicidade ou de facilitar a sua eliminação. Por exemplo, a redução e a metilação de mercúrio inorgânico  $\text{Hg}^{2+}$  resulta na formação de compostos voláteis,  $\text{Hg}^0$  e  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ , respectivamente, mais facilmente eliminados pela célula (Roane *et al.*, 2009).

**[22].** No entanto, ainda assim metais pesados podem chegar ao meio intracelular através de diferentes vias. De forma geral, células possuem dois tipos de sistemas de captação de íons de metais: um inespecífico, rápido e constitutivo e outro específico, lento e induzível. Os sistemas inespecíficos geralmente funcionam em função de um gradiente quimiosmótico através da membrana microbiana, enquanto os sistemas específicos realizam o transporte de metais específicos com custo de energia. Como os transportadores inespecíficos são constitutivamente expressos, este tipo de transporte é considerado um “portão aberto” para a entrada de metais na célula (Nies, 1999).

**[23].** Neste caso, mecanismos de detoxificação intracelulares entram em ação. Entre eles, está a síntese de proteínas que se ligam a metais com grande afinidade, como as metalotioneínas (MTs), formando complexos proteína-metal estáveis e não tóxicos, que resultam no bioacúmulo intracelular de metais. Outros mecanismos de detoxificação, que podem atuar em conjunto com o bioacúmulo de metais, são baseados em sistemas de efluxo ativo, que transportam os metais do meio intracelular para o meio extracelular (Nies, 2003).

**[24].** Portanto, os processos associados à mobilização de metais incluem, além da lixiviação microbiana (biolixiviação), a quelação por metabólitos secretados, por exemplo surfactantes e sideróforos. Enquanto que a imobilização de metais na biomassa bacteriana é resultado da assimilação intracelular (bioacúmulo), da precipitação de metais (bioprecipitação) e da ligação às estruturas da superfície celular (biossorção), processos que envolvem uma combinação de diversos mecanismos, como complexação, troca iônica, coordenação, adsorção, interações eletroestáticas e precipitação (Vijayaraghavan e Yun, 2008).

**[25].** Os mecanismos de imobilização de metais podem ser classificados de acordo com a localização celular e também de acordo com a dependência de atividade metabólica. O acúmulo intracelular é um processo de captação de metais ativo, pois depende da atividade metabólica do microrganismo. A

precipitação de metais ocorre tanto de forma passiva como ativa, enquanto que a imobilização na superfície celular é um processo primariamente passivo, pois não depende do metabolismo microbiano (Veglio e Beolchini, 1997). A principal implicação biotecnológica desta diferença é que a biorremediação via processos ativos requer que microrganismos vivos sejam utilizados, enquanto que para a bioissorção na superfície celular pode ser promovida com biomassa morta.

**[26].** Estudos de biorremediação com microrganismos vivos, em crescimento, tem mostrado que a imobilização de metais ocorre em um padrão bifásico, onde há uma primeira fase rápida de remoção de metais, quando ocorre a bioissorção na superfície celular, seguida por uma fase lenta, caracterizada pela captação ativa de metais (Malik, 2004). Porém, diante de concentrações de metais elevadas ou de um processo de biorremediação muito longo, o acúmulo intracelular de metais atinge um nível de saturação. A partir deste ponto, a toxicidade dos metais para o microrganismo torna-se um fator crítico, pois afeta o metabolismo microbiano, levando-o a morte e interrompendo a captação ativa de metais (Vijayaraghavan e Yun, 2008).

**[27].** Existem ainda outras questões que apontam para a bioissorção na superfície externa (com biomassa morta) como um processo de biorremediação mais eficiente do que o acúmulo intracelular. Por exemplo, a recuperação dos metais pesados imobilizados na superfície celular é possível com a utilização de um eluente apropriado, viabilizando também a reutilização da biomassa em um novo ciclo de bioissorção. No bioacúmulo, mesmo que a recuperação de metais seja possível, a biomassa não pode ser reciclada. Além disso, a bioissorção pode ser conduzida em um espectro mais amplo de temperatura e de pH, do que o processo com células vivas as quais, em geral, podem ser afetadas por extremos destes parâmetros. Por outro lado, em grande parte, as limitações do bioacúmulo, processo dependente do metabolismo microbiano, estão relacionadas com a sensibilidade do microrganismo aos metais pesados e/ou a outros aspectos químicos, como o pH do meio a ser remediado (Vijayaraghavan e Yun, 2008).

**[28].** A eficiência da bio sorção de metais pode depender tanto de fatores físico-químicos do meio a ser remediado (por exemplo temperatura e pH), como da composição química da biomassa. A constituição celular pode variar muito entre espécies e, conseqüentemente, também os tipos de metais imobilizados, e a extensão desta imobilização. A bio sorção de metais em uma grande diversidade de microrganismos (bactérias, fungos e algas) já foi testada e os resultados tem demonstrado esta variabilidade entre diferentes organismos (revisado por Vijayaraghavan e Yun, 2008 e por Wang e Chen, 2009).

**[29].** De forma geral, estes estudos têm mostrado que, para a maioria dos metais, o máximo de bio sorção é obtido em valores de pH levemente ácidos e que tempos de contato entre biomassa e metais relativamente curtos são suficientes para que a bio sorção atinja seu equilíbrio. Além disso, os bio sorventes tem se mostrado eficientes em concentrações baixas de metais, superando, portanto, uma das principais limitações dos métodos físico-químicos em uso no tratamento de efluentes contaminados com metais pesados (Vijayaraghavan e Yun, 2008).

**[30].** Apesar de promissora, a biorremediação ainda é pouco explorada comercialmente, enquanto que, por outro lado, a biomineração já é uma realidade industrial. Atualmente, aproximadamente 20% da produção mundial de cobre, ~5% da de ouro e proporções menores da produção de outros metais (cobalto, níquel, zinco e urânio) já são obtidas através de biomineração (Johnson *et al.*, 2013, Schippers *et al.*, 2013). Embora em menor extensão, existem exemplos comerciais e em escala piloto de tecnologias de biorremediação, desenvolvidos nos EUA e Canadá (Park *et al.*, 2010). Um deles, o bio sorvente Bio-fix, foi aplicado no tratamento de drenagens ácidas de minas, no Colorado, EUA (Garnham, 1997). Este bio sorvente, constituído por biomassas de diferentes origens (algas, leveduras, bactérias e plantas), exhibe seletividade por metais pesados tóxicos (Al, Cd, Zn, Mn) em relação a metais pesados alcalinos terrosos (por exemplo Ca e Mg) e retém quatro vezes mais zinco em comparação com resinas de troca iônica comerciais. Além disso,

o metal nele imobilizado pode ser eluído com HCl ou HNO<sub>3</sub> e o bioissorvente, reutilizado por mais de 120 vezes (Gupta *et al.*, 2000).

**[31].** Apesar deste bom exemplo da viabilidade de uma tecnologia de biorremediação para o tratamento de efluentes e recuperação de metais, as plantas em escala piloto já desenvolvidas tem apontado como principais limitações para a comercialização e aplicação industrial de bioissorventes os custos envolvidos no cultivo e/ou formulação da biomassa e a interferência de outros íons com a imobilização dos metais alvos da biorremediação, um problema, portanto, de especificidade (Fomina e Gadd, 2014; Tsezos *et al.*, 2011).

**[32].** Desenvolvimento de bioissorventes mais eficientes por engenharia genética

**[33].** Uma das vantagens da biorremediação é a possibilidade de manipulação genética dos microrganismos para gerar bioissorventes mais específicos e eficientes. Segundo Vijayaraghavan e Yun (2008), existem dois tipos gerais de efluentes industriais contaminados por metais, aqueles com grandes volumes e baixas concentrações de metais, por exemplo resíduos líquidos de mineração, e aqueles com altos valores de sólidos totais dissolvidos em pequenos volumes, por exemplo produção de pigmentos têxteis. No primeiro caso, um bioissorvente com alta afinidade por metais é necessário, enquanto no segundo, uma alta capacidade de retenção de metais é mais crítica. Assim, bioissorventes cuja afinidade e capacidade de ligação de metais tenham sido otimizadas tem o potencial para melhor atender ambos os tipos de efluentes.

**[34].** Muitas iniciativas têm sido conduzidas neste sentido, onde diferentes proteínas e peptídeos ligantes de metais, naturais ou sintéticos, são expressos heterologamente em um microrganismo hospedeiro, com o objetivo de aumentar a sua resistência, especificidade, afinidade e/ou capacidade de imobilização de diferentes metais pesados (Mejáre e Bülow, 2001). Em geral, o mecanismo de ligação de metais destas proteínas é a quelação, onde o íon metálico é incorporado à molécula orgânica (quelante) em uma estrutura em

anel através de ligações coordenadas por pelo menos dois átomos doadores de elétrons, tipicamente, enxofre, nitrogênio e/ou oxigênio (Sears, 2013). Os principais grupamentos funcionais de aminoácidos envolvidos são o tiol (ou sulfidril, -SH), dos resíduos de cisteína, imidazol ( $C_3H_4N_2$ ), dos resíduos de histidina e carboxilato (-COO), em resíduos de aspartato e glutamato (Kozlowski *et al.*, 2013).

**[35].** Pelo menos 30% de todas as proteínas conhecidas são metaloproteínas (Ngu e Stillman 2009), ou seja, possuem pelo menos um elemento metálico em sua estrutura. Entre elas, se destacam as proteínas cujo papel fisiológico é a detoxificação de metais pesados, por serem capazes de ligarem, com especificidade, a múltiplos íons de metais pesados, sequestrando-os em complexos metal-proteína. A manipulação genética de microrganismos como “biossorventes” tem se concentrado principalmente na expressão heteróloga de tais proteínas detoxificantes, principalmente, metalotioneínas (MTs), de organismos eucariotos e procariotos, e fitoquelatinas, de plantas, duas diferentes classes de proteínas ricas em cisteína. Alternativamente, a imobilização de metais em função da expressão de peptídeos sintéticos curtos, compostos por aminoácidos ligantes de metais, principalmente cisteína e histidina, também tem sido investigada (Saleem *et al.*, 2008; Mejáre e Bülow, 2001).

**[36].** Em um destes primeiros trabalhos, Pazirandeh *et al.* (1995) geraram duas linhagens de *Escherichia coli* recombinantes, uma onde a MT do fungo *Neurospora crassa* foi expressa no citoplasma e outra, onde esta mesma proteína foi expressa no periplasma de *E. coli*. Os autores observaram que a expressão periplasmática resultou em um maior bioacúmulo de cádmio em comparação com a expressão citoplasmática. A linhagem recombinante de expressão periplasmática mostrou-se capaz de remover cádmio de forma seletiva, na presença de um excesso de 106X de metais alcalinos terrosos, e rápida, com quase 75% do total de metal captado nos primeiros 20 minutos e o máximo de captação atingido em uma hora. Embora esta linhagem não tenha resultado na remoção completa do metal a partir da solução teste, foi capaz de reduzir a sua concentração inicial (22 ppb ou 0.2  $\mu$ M de cádmio) para menos de

5 ppb (0,04  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, Brower *et al.* (1997) demonstraram ainda que esta mesma linhagem remove o maior percentual de cádmio em comparação com o bioissorvente Bio-fix e com duas resinas de troca iônica comerciais, testadas em uma solução de cádmio com concentração na ordem de ppb.

[37]. Em trabalhos posteriores, a expressão heteróloga de diversas proteínas e peptídeos ligantes de metal tem sido frequentemente direcionada para superfície externa do microrganismo hospedeiro. A **Tabela 1** sumariza os principais resultados obtidos com este tipo de abordagem. Uma das vantagens desta estratégia é reduzir a potencial toxicidade que a proteína recombinante possa causar ao microrganismo, uma dificuldade recorrente em sistemas de expressão heteróloga, e resolver problemas de instabilidade observados quando a proteína ligante de metal é expressa no citoplasma (Valls e Lorenzo, 2002, Mejáre e Bülow, 2001). Mas, além disso, estes estudos tem mostrado que melhores resultados de imobilização de metais são obtidos quando proteínas ligantes de metais pesados são expressas ancoradas à superfície externa do microrganismo. Por exemplo, a expressão da MT de tilápia (*Oreochromis mossambicus*) na superfície celular de *E. coli* resultou em um acúmulo de  $\text{Hg}^{2+}$  25% maior do que o observado com a expressão citoplasmática desta mesma proteína (Lin *et al.*, 2010).

[38]. Esta diferença se deve ao fato de que, ancorada à superfície externa do microrganismo, a proteína ligante de metal interage diretamente com os metais presentes no meio a ser remediado, independente da atividade metabólica do microrganismo, de forma semelhante à bioissorção, discutida anteriormente. Enquanto que, expressa no citoplasma, a interação da proteína em questão com metais torna-se dependente do transporte dos mesmos para o interior da célula, processo que, por envolver atividade metabólica, é mais lento. Em consequência disso, a expressão heteróloga na superfície celular tem também a vantagem de possibilitar tanto o uso de biomassa viva como biomassa morta (Kuroda e Ueda, 2011).

**[39]. Tabela 1** - Adsorção de metais por linhagens microbianas (bactérias e fungos) recombinantes que expressam diferentes proteínas ou peptídeos ligantes de metais na superfície celular. Todos os ensaios de bioacúmulo de metais citados nesta tabela foram realizados com biomassa viva em suspensão. No entanto, deve-se levar em consideração que estes resultados não necessariamente são comparáveis entre si, uma vez que foram obtidos em condições experimentais distintas.

Microorganismo	Proteína ou Peptídeo ligante de metal	Proteína âncora	Tempo de contato biomassa-metal	Temperatura	Concentração de metal	Capacidade de Adsorção	Ref.
<i>E. coli</i>	Peptídeo ligante de metal	FimH	0,5 h	Não informado	Mn: 20 mM (1,10 mg/l)	Mn: 1,92 nmol/mg de proteína	Schembri <i>et al.</i> , 1999.
<i>E. coli</i>	Peptídeo His6	CS3 pili	2 h	37°C	Cd: 20 mM (2,25 mg/l); Ni: 20 mM (1,17 mg/l)	Cd: 73,8 mg/g ps Ni: 16,2 mg/g ps	Saffar <i>et al.</i> , 2007.
<i>E. coli</i>	MerR	INP	30 h	Não informado	Hg: 0–200 mM (1,0 mg/l)	Hg: 24,07 mg/g ps	Bae <i>et al.</i> , 2003.
<i>Moraxella sp.</i>	Fitoquelatina sintética	INP	7 h	37°C	Hg: 5 mM (1,0 mg/l)	Hg: 3,61 mg/g ps	Bae <i>et al.</i> , 2002.
<i>R. eutropha</i> (= <i>C. metallidurans</i> )	MT de camundongo	IgAβ	Não informado	30°C	Cd: 300 μM (33,7 mg/l)	Cd: 4,72 mg/g ps	Valls <i>et al.</i> , 2000a.
<i>P. putida</i>	MT de camundongo	IgAβ	Não informado	30°C	Cd: 300 μM	Cd: 3,25 mg/g ps	Valls <i>et al.</i> , 2000b.
<i>C. metallidurans</i>	Fitoquelatina sintética	IgAβ	2-24 h	28°C	1 mM	Pb: 113,44 mg/g ps Zn: 33,39 mg/g ps Cu: 26,69 mg/g ps Cd: 19,82 mg/g ps Ni: 4,92 mg/g ps Mn: 3,38 mg/g ps Co: 3,04 mg/g ps	Biondo <i>et al.</i> , 2012.
<i>E. coli</i>	Fitoquelatina sintética	Lpp-OmpA	16 h	37°C	Cd: 100 μM	Cd: 6,74 mg/g ps	Bae <i>et al.</i> , 2000.
<i>E. coli</i>	Peptídeo His6	LamB	4 h	37°C	Cd: 20 mM (2,25 mg/l)	Cd: 1,80 mg/g ps	Sousa <i>et al.</i> , 1996.
<i>E. coli</i>	MT humana e MT de levedura	LamB	4 h	37°C	Cd: 30 mM (3,37 mg/l) Cu: 30 mM (1,91 mg/l) Zn: 30 mM (1,96 mg/l)	Cd: 3,37 mg/g ps Cu: 0,42 mg/g ps Zn: 0,28 mg/g ps	Sousa <i>et al.</i> , 1998.
<i>E. coli</i>	Peptídeos ligantes de metal	LamB	3,5 h	Não informado	Cd: 30 mM (3,37 mg/l) Cu: 30 mM (1,91 mg/l) Zn: 30 mM (1,96 mg/l)	Cd: 1,07 mg/g ps Cu: 0,16 mg/g ps Zn: 0,20 mg/g ps	Kotrba <i>et al.</i> , 1999.
<i>E. coli</i>	MTs de cianobactérias SmtA e MtnA	Lpp-OmpA	2 h	30°C	Cd: 18 mg/l	Cd: 2,97 mg/g ps	Tafakori <i>et al.</i> , 2012.
<i>E. coli</i>	MTs de mamífero e de peixe	MBP	24 h	25°C	0–300 mg/l	Pb: 40 mg/g ps Cu: 20 mg/g ps Cd: 30 mg/g ps Zn: 20 mg/g ps	Kao <i>et al.</i> , 2006.
<i>E. coli</i>	MT de peixe	OmpC	24 h	25°C	Hg: 50 mM (10 mg/l)	Hg: 5,6 mg/g ps	Lin <i>et al.</i> , 2010.
<i>C. crescentus</i>	peptídeo His6	RsaA	2 h	30°C	Cd: 15,0 mg/l	Cd: 16,0 mg/g ps	Patel <i>et al.</i> , 2010.
<i>S. cerevisiae</i>	MT e peptídeo His6	α -aglutinina	2 h	30°C	Cd: 100 mM	MT: 27,1 nmol/mg ps His6: 16,6 nmol/mg ps	Kuroda e Ueda, 2003.
<i>S. cerevisiae</i>	peptídeo His6	α -aglutinina	12 h	30°C	100 mM	CuSO <sub>4</sub> : 1,7 nmol/mg ps Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> : 4,1 nmol/mg ps CuCl <sub>2</sub> : 5,8 nmol/mg ps NiCl <sub>2</sub> : 5,2 nmol/mg ps	Kuroda <i>et al.</i> , 2002.
<i>S. cerevisiae</i>	Peptídeos com motivos CXEE	α -aglutinina	4 h	25°C	Pb: 150 mM (31,08 mg/l)	Pb: 19,7 mg/g ps	Kotrba e Ruml, 2010.

\*ps: peso seco. Tabela adaptada de Li e Tao (2013).

**[40].** No entanto, assim como na biossorção, uma das principais vantagens da imobilização de metais em proteínas heterólogas ancoradas na superfície celular é a possibilidade de recuperação e reciclagem dos metais imobilizados e de reutilização da biomassa em um novo ciclo de biorremediação (**Figura 2**), o que não seria possível no caso do bioacúmulo intracelular de metais.

Portanto, o aumento da disponibilidade de sítios ligantes de metais na superfície bacteriana é uma abordagem efetiva não só para incrementar a sua capacidade de imobilização de metais como para diminuir os custos do processo de biorremediação, por possibilitar a reciclagem da biomassa e, com isso, dispensar a necessidade de um suplemento contínuo de biomassa.

**[41].** A expressão de proteínas heterólogas pode ser direcionada para a superfície celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de fungos, através de diferentes estratégias. Em geral, a proteína de interesse é fusionada, por engenharia genética, a proteínas de membrana ou de estruturas extracelulares como flagelo e pili, que funcionam, então, como “carreadoras” para a proteína de interesse (“passageira”) chegar até a superfície celular. A **Tabela 1** contém alguns exemplos de proteínas carreadoras. Por exemplo, em *E. coli*, muitas estratégias se baseiam na fusão com proteínas OMP (“Outer Membrane Proteins”), como LamB (maltoporina) e FhuA (receptor de ferricromo), que formam uma estrutura de barril  $\beta$  na membrana externa desta bactéria. Estes sistemas, no entanto, toleram apenas a inserção de peptídeos pequenos, embora alguns deles já tenham sido otimizados para tolerarem inserções maiores (Bloois *et al.* 2011).

**[42].** Uma estratégia alternativa, que comporta inserções maiores, se baseia em proteínas autotransportadoras, que contém todos os elementos para o seu próprio transporte e ancoragem na superfície celular. A primeira proteína com estas características a ser descrita foi a protease IgA de *Neisseria gonorrhoeae* (Halter *et al.*, 1984). Assim como ela, muitas das proteínas autotransportadoras descritas posteriormente são fatores de virulência de bactérias gram-negativas, nas quais precisam atravessar a membrana interna e externa deste tipo de microrganismo para chegarem à superfície celular (Bloois *et al.*, 2011).

**[43].** As proteínas autotransportadoras são formadas por uma única cadeia polipeptídica constituída por três elementos ou domínios: (1) um peptídeo sinal N-terminal, que direciona a cadeia polipeptídica para o periplasma, através da via Sec, (2) o domínio “passageiro” e (3) um domínio “transportador” C-terminal que forma um barril  $\beta$ , na membrana externa, através do qual o domínio

“passageiro” é translocado para a superfície celular (Jose e Meyer, 2007) (**Figura 3**).

**[44]**. Frequentemente, estas proteínas autotransportadoras são funcionais também quando expressas em outros microrganismos hospedeiros e o domínio “passageiro” nativo pode ser substituído, por engenharia genética, pela sequência da proteína de interesse. Desta forma, este sistema pode ser utilizado para expressar proteínas heterólogas ancoradas na superfície celular de bactérias gram-negativas, processo conhecido como “*surface display*” (“exposição na superfície”) (Bloois *et al.* 2011). O domínio C-terminal da protease IgA (IgA $\beta$ ) de *N. gonorrhoeae* tem sido utilizado com sucesso para ancorar diferentes proteínas heterólogas, por exemplo MT de camundongo e domínios zíper de leucina, em diferentes microrganismos, como *E. coli*, *Pseudomonas putida*, *Cupriavidus metallidurans* e *Salmonella spp.* (Jose e Meyer, 2007).

**[45]**. Metalotioneínas: da detoxificação celular à biorremediação de metais pesados

**[46]**. Os primeiros trabalhos realizados com engenharia genética de microrganismos para imobilização de metais pesados envolveram a introdução de metalotioneínas e, não sem razão, ainda hoje as MTs permanecem entre as principais proteínas ligantes de metais exploradas em estratégias biotecnológicas de imobilização de metais. As MTs apresentam uma das maiores capacidades de ligação de metais observadas em proteínas, sendo de 10 a 20% da sua massa composta por complexos metal-enxofre (Blindauer e Leszczyszyn, 2010). Fisiologicamente, esta capacidade de imobilização de metais exerce funções na homeostase de metais essenciais traço (por exemplo Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>), funcionando como reservatório de metais para outras metaloproteínas, e na detoxificação de metais não-essenciais (por exemplo Cd<sup>2+</sup>), mas MTs também exercem funções na proteção contra estresse oxidativo, ao reagir com radicais livres (Hamer, 1986, Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013).

**[47].** As metalotioneínas são proteínas ubíquas, geralmente intracelulares e que estão presentes em todos os filos animais, em muitos fungos, plantas e também em procariotos. Tradicionalmente, as MTs são categorizadas em três classes: classe I, que compreende todas as MTs cuja distribuição de cisteínas seja similar a da MT-1 de cavalo, a primeira destas proteínas a ser identificada, classe II, que inclui todas as MTs que divergem da MT-1 de cavalo e classe III, para as fitoquelatinas, que são produzidas de forma enzimática em plantas (não codificadas por genes) (Freisinger, 2009). No entanto, com a crescente identificação de novas MTs, esta classificação tem se mostrado cada vez menos adequada, pois a sequência, o comprimento e o número de cisteínas podem variar significativamente. Com isso, novas classificações, baseadas na similaridade entre sequências e nas suas relações filogenéticas, e, mais recentemente, nas propriedades de ligação de metais destas proteínas têm sido propostas (Kojima *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2011). Porém, estas classificações ainda não estão bem consolidadas na literatura e, frequentemente, ainda se faz referência ao primeiro tipo de classificação.

**[48].** Caracteristicamente, as MTs são proteínas de baixo peso molecular (<10 KDa), com alto teor de metal e enxofre (>10%) e ausência ou escassez de aminoácidos aromáticos, tais como histidina e triptofano. As MTs exibem alto teor de cisteína (até 30%), cuja cadeia lateral é um grupamento tiol (-SH), que exibe alta afinidade por íons metálicos. Estes resíduos de cisteína estão tipicamente organizados em motivos C-X-C e C-X-X-C, onde X é qualquer outro aminoácido que não cisteína, mas motivos formados por cisteínas justapostas (C-C e C-C-C) também podem ocorrer em algumas MTs. É amplamente aceito que a habilidade de ligação de metais das MTs se deve a presença destes resíduos de cisteína ao longo da cadeia polipeptídica (Romero-Isart e Vasák, 2002).

**[49].** Além destas características, é comum MTs apresentarem uma alta proporção de aminoácidos pequenos, tais como glicina e alanina, o que permite a ocorrência de voltas curtas em sua estrutura, que de outra forma seriam desfavoráveis. Grandes aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos, como tirosina,

triptofano, fenilalanina e leucina, são escassos nas suas sequências primárias, o que também tem relação com sua estrutura. Enquanto em outras proteínas, as interações hidrofóbicas entre estes aminoácidos fornecem estabilidade estrutural, nas MTs esta função é exercida pelos complexos metal-tiolato, que conferem a estas proteínas propriedades de ligação de metais únicas, como alta estabilidade termodinâmica (Blindauer e Leszczyszyn, 2010). Desta forma, a apo-metalotioneína (apoMT, forma sem metais ligantes) apresenta estrutura desordenada e somente após a ligação de íons metálicos a proteína assume uma estrutura organizada.

**[50].** No entanto, devido a dificuldades técnicas, pouquíssimas MTs já tiveram suas estruturas determinadas experimentalmente: apenas 32 estruturas de MTs foram depositadas no banco de dados PDB (“*Protein Data Bank*”). A **Figura 4** mostra algumas estruturas 3D representativas destas MTs já descritas. As MTs de rato, ouriço-do-mar e do caranguejo azul (“classe I”) apresentam estrutura em forma de “halteres”, formada por dois domínios ligantes de metais separados por um curto, flexível e conservado conector (“*linker*”) (**Figura 4, A-C**). Enquanto que as outras três estruturas, de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), de cianobactéria (*Synechococcus*) e de trigo (*Triticum aestivum*), consideradas MTs da “classe II”, quebram alguns dos paradigmas sobre MTs: as três possuem resíduos de histidina, em alguns casos coordenando ligações com metais, as MTs de cianobactéria e de levedura são formadas por um único domínio e a MT de cianobactéria apresenta extensos elementos estruturais secundários (**Figura 4, D-F**) (Blindauer e Leszczyszyn, 2010).

**[51].** As MTs de mamíferos (“classe I”) possuem 20 cisteínas, todas envolvidas na coordenação de um total de sete íons de metais divalentes por molécula de proteína, cada íon coordenado em uma geometria tetraédrica (ou 12 íons monovalentes, em uma geometria trigonal). Os seus dois domínios ligantes de metais, alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), se diferem tanto no número de íons de metais a que se ligam, como na sua afinidade por diferentes tipos de metais. Enquanto o domínio  $\alpha$  possui 11 cisteínas, coordena a ligação de quatro íons

divalentes (ou seis monovalentes) e apresenta maior afinidade por metais divalentes, principalmente  $\text{Cd}^{2+}$ , o domínio  $\beta$  possui nove cisteínas, se liga a três íons divalentes (ou seis monovalentes) e tem maior afinidade por metais monovalentes, principalmente  $\text{Cu}^{1+}$  (Klaassen, 1999, Nielson *et al.*, 1985). Acredita-se que, em função desta diferença de afinidade, o domínio  $\alpha$  seja especializado na função de detoxificação de metais tóxicos, enquanto que o domínio  $\beta$  seja mais importante para a homeostase de metais essenciais. Embora, Cd, Zn e Cu sejam os mais relevantes fisiologicamente, as MTs se ligam a outros metais *in vitro*, incluindo  $\text{Ag}^{1+}$ ,  $\text{Au}^{1+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ , geralmente, com a mesma ordem de afinidade exibida pelo grupo tiol inorgânico (por exemplo,  $\text{Hg}^{2+} > \text{Ag}^{1+} \sim \text{Cu}^{1+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ ), mas esta ordem de afinidade pode variar entre espécies (Romero-Isart e Vasák, 2002).

**[52].** Metalotioneínas de ostras do gênero *Crassostrea spp*: um caso de adaptação à contaminação ambiental por metais pesados.

**[53].** Ostras são moluscos bivalves, organismos aquáticos, sésseis e filtradores, que ocorrem em zonas estuarinas, onde estão frequentemente sujeitos a diferentes estressores ambientais, como variações periódicas de fatores abióticos (por exemplo temperatura e salinidade) e exposições periódicas ao ar, que ocorrem em função das variações de maré, além da presença de patógenos e poluentes, como metais pesados, na água (Zhang *et al.*, 2012). O sedentarismo e o hábito alimentar filtrador fazem com que esses organismos estejam particularmente expostos a estes poluentes e acumulem altos níveis de metais pesados em seus tecidos, para os quais a indução da expressão de metalotioneínas representa uma das primeiras linhas de defesa celular.

**[54].** Em geral, as metalotioneínas de moluscos se enquadram na classe I, ou seja, se assemelham às MTs de mamíferos (Amiard *et al.*, 2006). No entanto, os domínios  $\alpha$  e  $\beta$  das MTs de ostras do gênero *Crassostrea* apresentam uma organização diferente: enquanto nas demais MTs, o domínio  $\beta$  é N-terminal e o  $\alpha$ , C-terminal (**Figura 4A**), em ostras, este posicionamento é invertido ( $\alpha$  é N-terminal e  $\beta$  é C-terminal) (Jenny *et al.*, 2004). As únicas MTs com uma

organização semelhante são as de ouriço-do-mar (Tomas *et al.* 2013), como observado na **Figura 4C**. Embora possíveis implicações funcionais desta inversão não tenham sido especificamente investigadas nestas espécies, um estudo realizado com mutantes da MT-2 humana forneceu uma evidência de que esta simples inversão de domínios possa influenciar nas propriedades de ligação de metais destas MTs.

**[55]**. Para investigar os papéis que diferentes resíduos e domínios da MT-2 humana exercem na sua habilidade de ligação de metais, Yamaguchi *et al.* (1997) geraram uma série de MT-2 mutantes, um dos quais consistiu na inversão do posicionamento dos seus domínios  $\alpha$  e  $\beta$  em relação a proteína selvagem, portanto, de certa forma, mimetizando a organização observada naturalmente nas MTs de ostras. Este mutante ( $\alpha\beta$ ) ligou-se a cádmio cinco vezes mais firmemente que a MT-2 selvagem ( $\beta\alpha$ ). Este resultado, portanto, indica que a configuração  $\alpha\beta$  pode estar associada a uma ligação mais estável de cádmio e, portanto, a uma detoxificação mais eficiente deste metal pesado.

**[56]**. Além destas MTs canônicas de ostras ( $\alpha\beta$ ), foram também identificadas isoformas únicas de metalotioneínas multidomínio, com repetições *in tandem* dos domínios  $\alpha$  ou  $\beta$  em ostras que possuem capacidade de viver em locais poluídos por metais pesados (Tanguy e Moraga, 2001; Jenny *et al.*, 2004 e 2006). Como observado na **Figura 5**, em ostras *Crassostrea gigas*, a ostra do Pacífico, foi identificada uma MT constituída por um domínio  $\alpha$  e dois domínios  $\beta$  (CgMT2), enquanto em ostras *Crassostrea virginica*, a ostra do Atlântico, uma diversidade maior de MTs multidomínio foi descrita: uma formada apenas por dois domínios  $\beta$  (CvMT-III A) e uma série de MTs com um à quatro domínios  $\alpha$  (CvMTII A-H). O aumento do número de domínios ligantes de metais, especificamente do domínio  $\alpha$ , que se acredita ter um papel maior na função de detoxificação, confere a estas proteínas uma maior capacidade de ligação de metais e, portanto, pode representar uma adaptação destes organismos à vida sésil em ambientes costeiros com altas concentrações de metais.

**[57]**. A ostra de mangue nativa *C. rhizophorae*, cuja distribuição no Brasil é bastante ampla, indo do Paraná ao Rio Grande do Norte (Ignácio *et al.*, 2000),

apresenta uma das maiores taxas de depuração da água já observada entre bivalves (17.99 L h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> peso seco) e, conseqüentemente, acumula altos níveis de metais pesados em seus tecidos (Lacerda e Molisani, 2006; Sroczyńska et al., 2012). Na Baía de Sepetiba, no Rio de Janeiro, Brasil, um ambiente historicamente poluído por elevadas quantidades de metais pesados, Rebelo *et al.* (2003b) observaram, em ostras *Crassostrea rhizophorae*, as maiores concentrações de Zn e Cd já reportadas em tecidos de organismos sentinelas em baías costeiras no mundo: 80,724 e 29 µg.g<sup>-1</sup> peso seco, respectivamente. No entanto, apesar da resistência a metais destas ostras, no que diz respeito a proteínas detoxificantes de metais, apenas uma sequencia de mRNA parcial de metalotioneína já foi descrita nesta espécie (Rebelo *et al.*, 2003a), e nenhuma metalotioneína multidomínio já foi identificada na mesma até o momento.

**[58].** *Cupriavidus metallidurans*, uma proteobactéria extremófila resistente a metais pesados.

**[59].** A maioria dos microrganismos geneticamente modificados utilizados em estudos experimentais de biorremediação de metais pesados são espécies não resistentes a estes elementos, principalmente *E. coli*, microrganismo modelo, extensivamente caracterizado geneticamente, o que facilita a sua engenharia genética, mas que não é particularmente resistente a metais pesados (Nies, 2000). Como discutido anteriormente, a sensibilidade dos microrganismos a elevadas concentrações de metais pesados e a pHs extremos é um fator limitante para a utilização de microrganismos vivos no processo de biorremediação de efluentes.

**[60].** Embora o direcionamento de proteínas ligantes de metais para a superfície celular permita que a imobilização de metais seja feita também com biomassa morta, a utilização de biomassa viva tem algumas vantagens. Uma delas é a possibilidade de cultivo do microrganismo no próprio meio a ser biorremediado, se autoperpetuando durante o processo. Com isso, a biorremediação poderia ser feita em uma única etapa, eliminando a necessidade e os custos de pré-cultivo do microrganismo para, posteriormente,

coletá-lo, concentrá-lo e secá-lo para aplicação na biorremediação (Malik, 2004). Além disso, com o microrganismo vivo, é possível explorar, de forma adicional, os mecanismos ativos de captação de metais, que incluem não só o bioacúmulo intracelular, mas também a bioprecipitação de metais. Segundo Fomina e Gadd (2014), apesar das aparentes vantagens da bioissorção com biomassa morta, são estas propriedades únicas exibidas por alguns organismos vivos que podem competir com os métodos puramente físico-químicos para tratamento de efluentes.

**[61].** As limitações para o uso de microrganismos vivos na biorremediação e biomineração pode ser superada através da engenharia genética de microrganismos naturalmente resistentes a altas concentrações de metais. Espécies que habitam o próprio ambiente a ser remediado tem grande potencial nesta área. É o caso de *C. metallidurans* (sinônimos: *Ralstonia metallidurans*, *Wautersia metallidurans*; nomes anteriores: *Pseudomonas palleronii*; *Ralstonia eutropha*; *Ralstonia sp*), uma proteobactéria isolada pela primeira vez a partir de um tanque de decantação de zinco com altas concentrações de metais pesados, na Bélgica (70 mM de zinco; 1,5 mM de cobre; 0,3 mM de cádmio) (Mergeay *et al.*, 1978), e também encontrada em áreas associadas a mineração, metalúrgicas e indústrias químicas, em solos e rejeitos sólidos contaminados com metais pesados e, frequentemente, também por compostos orgânicos persistentes. Estes ambientes são considerados extremos devido não só à abundância de compostos tóxicos, como também pelas grandes variações de temperatura, de até 50°C, pela limitação de nutrientes orgânicos e oscilações entre estados de extremas aridez e umidade (Diels *et al.*, 2009).

**[62].** Além destes ambientes, *C. metallidurans* foi recentemente isolada como uma das poucas espécies a sobreviverem em reservatórios de água pura, na Estação Espacial Internacional, ambiente, portanto, oligotrófico. Estes isolados de *C. metallidurans* se mantiveram viáveis em água potável durante 23 meses, mesmo na presença de  $\text{AgNO}_3$ , composto comumente usado como agente

desinfetante nestas instalações (Mijnendonckx *et al.*, 2013). Por estas razões, *C. metallidurans* é classificada como uma espécie extremófila.

**[63].** *C. metallidurans* é altamente resistente a altas concentrações (na ordem de milimolar) de mais de 20 metais, incluindo  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Au}^{3+}$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{2-}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$ , e  $\text{Sr}^{2+}$  (Janssen *et al.*, 2010). O seu principal mecanismo de detoxificação de metais consiste majoritariamente no efluxo de íons metálicos, que mantêm a concentração de íons de metais no citoplasma baixa, mesmo em ambientes altamente contaminados (Nies, 2003). Ao todo, são 30 diferentes sistemas de efluxo codificados por 155 genes agrupados em 25 *loci* gênicos. Estes genes de resistência a metais estão distribuídos entre os seus dois cromossomos circulares, CHR1 (3,93 Gb) e CHR2 (2,58 Gb) e dois megaplasmídios, pMOL28 (em torno de 170 Kb) e pMOL30 (em torno de 230 Kb). Nenhuma outra bactéria já descrita possui tantos sistemas de efluxo especializados na remoção de metais pesados (Janssen *et al.*, 2010; Monchy *et al.*, 2007).

**[64].** *C. metallidurans* também é caracterizada por uma ampla versatilidade metabólica, pois pode utilizar uma grande diversidade de compostos orgânicos como única fonte de carbono e de energia, incluindo compostos voláteis como propanol, butanol e acetona e hidrocarbonetos monoaromáticos como benzeno, tolueno e fenol. Em condições onde há pouco  $\text{N}_2$ , esta bactéria produz poli-3-hidroxi-butanoato (PHB), polímero que é acumulado na forma de grânulos intracelulares, como reserva energética. Como *C. metallidurans* é quimiolitotrófica facultativa, na ausência de fontes heterotróficas de compostos orgânicos, pode mudar para um metabolismo autotrófico, reduzindo  $\text{CO}_2$  para sintetizar moléculas orgânicas (Janssen *et al.*, 2010). Além da alta resistência a metais pesados e da versatilidade metabólica, *C. metallidurans* apresenta quimiotaxia positiva por cádmio, ou seja, motilidade em direção a este elemento, comportamento que também é uma vantagem para a sua aplicação na biorremediação (Shamim *et al.*, 2013).

**[65].** É por vezes argumentado que o eficiente efluxo de metais prejudicaria a imobilização (intracelular) de metais de *C. metallidurans*, e, portanto, sua

aplicação na biorremediação destes elementos. No entanto, outros mecanismos, como a bioissorção e bioprecipitação de metais, têm sido explorados para biorremediação. Por exemplo, Diels *et al.* (1996) desenvolveu um biorreator para remoção de diversos metais pesados, como cádmio, zinco e chumbo, explorando a bioprecipitação de metais que ocorre em *C. metallidurans*. Como resultado da atividade de sistemas de efluxo de cátion/próton quimiosmóticos, o meio intracelular é acidificado, o que leva a formação de carbonatos, a partir do CO<sub>2</sub> resultante do metabolismo celular, que por sua vez coprecipitam com metais. Também foi observado que, em condições de escassez de nutrientes, *C. metallidurans* cria zonas de carbonatos ao seu redor, permitindo a precipitação de metais mesmo sem uma interação direta com os mesmos (Diels *et al.*, 2009).

**[66].** Embora a engenharia genética tenha grande potencial para otimizar a imobilização de metais em *C. metallidurans*, esta é uma área ainda pouco explorada nesta espécie e, até o momento, limitou-se a construção de apenas três linhagens geneticamente modificadas para este fim, duas das quais estão sumarizadas na **Tabela 1** (Biondo *et al.*, 2012; Valls *et al.*, 2000a). A primeira delas consistiu na expressão da MT de camundongo, fusionada a IgA $\beta$ , na superfície de *C. metallidurans*, o que aumentou em três vezes a sua capacidade de imobilizar cádmio a partir da solução, removendo do meio o equivalente a 42 nmol de Cd<sup>2+</sup>/mg de peso seco de células. Apesar de muito promissor, este resultado equivale à remoção de apenas 5% do total de metal presente na solução inicialmente. No entanto, os resultados obtidos em um ensaio *in situ*, onde solo contaminado com cádmio foi inoculado com a linhagem geneticamente modificada, resultou na imobilização de 70% do cádmio disponível para *Nicotiana bentamiana*, diminuindo dramaticamente os efeitos tóxicos do cádmio observados nesta planta, e demonstrando a potencial aplicação de *C. metallidurans* também para a biorremediação de solos contaminados (Valls *et al.*, 2000a).

**[67].** De fato, *C. metallidurans* exibe propriedades promissoras para a biorremediação de solos e resíduos sólidos. Através da secreção de

sideróforos, ela aumenta a solubilidade de metais presentes no solo, retendo-os, em seguida, em sua biomassa, seja por biossorção ou bioprecipitação. Além disso, quando inoculada, em suspensão, com solo contaminado com metais pesados, *C. metallidurans* exibe um comportamento único, permanecendo em suspensão e induzindo a precipitação das partículas de solo e de matéria orgânica, propriedade importante, por exemplo, para a biorremediação de resíduos de mineração (Diels *et al.*, 2009).

**[68].** Mais recentemente, Rojas *et al.* (2011) desenvolveram uma linhagem de *C. metallidurans* metabolicamente modificada especificamente para a biorremediação de mercúrio. Como *C. metallidurans* apresenta menor resistência a mercúrio inorgânico e é sensível a mercúrio orgânico, os autores introduziram em seu genoma um plasmídeo natural (pTP6), isolado do ambiente, que contém um conjunto de genes envolvidos na resistência a mercúrio (genes *mer*). A maioria destes genes já possuía equivalentes no genoma de *C. metallidurans*, mas entre eles foram introduzidos novos genes *merA* (mercúrio reductase) e *merB* (liase-organomercurial) que catalisam, respectivamente, a redução de  $Hg^{2+}$  para uma forma menos tóxica, o mercúrio elementar ( $Hg^0$ ), e a clivagem de ligações carbono-mercúrio. Com isso, foi obtida uma linhagem três vezes mais resistente a mercúrio inorgânico e com resistência a mercúrio orgânico, fenótipo não presente na linhagem selvagem. Testes em escala laboratorial mostraram que esta linhagem remove completamente  $Hg^{2+}$  a partir de águas contaminadas com até 0,15 mM deste metal.

**[69].** Um exemplo desta técnica está descrita no documento US 8846376, que revela cepas recombinantes de *Cupriavidus metallidurans*, capazes de remover  $Hg(II)$ ,  $Cd(II)$  e  $Cu(II)$ . A bactéria foi modificada pela incorporação do plasmídeo natural pTP6 compreendendo um conjunto complexo de genes *mer*.

**[70].** Por fim, Biondo *et al.* (2012) expressaram uma fitoquelatina sintética (EC20), antes expressa por Bae *et al.* (2000) em *E. coli*, na superfície celular de *C. metallidurans*, usando o mesmo sistema de ancoragem utilizado por Valls *et al.* (2000a), e obtiveram como melhores resultados um aumento de três vezes

no acúmulo de chumbo e zinco, em comparação com a linhagem selvagem utilizada como controle neste estudo (tabela 1). No caso de cádmio, a linhagem obtida foi capaz de remover 110,8 nmol Cd<sup>2+</sup>/mg de peso seco de células, um pouco mais que o dobro do obtido por Valls *et al.* (2000a) para este mesmo metal.

[71]. Portanto, a engenharia genética de *C. metallidurans* ainda é incipiente, mas estes trabalhos indicam que este microrganismo pode tolerar bem a expressão de genes heterólogos e que a imobilização de metais em *C. metallidurans* ainda pode ser melhorada. Dadas as suas características metabólicas e a sua resistência a metais e a outras condições adversas, as possibilidades de manipulação genética de *C. metallidurans* para uma imobilização de metais de forma mais eficiente são bastante promissoras para o tratamento de efluentes e recuperação de metais pesados na mineração.

[72]. Além das abordagens descritas acima, a literatura patentária também apresenta documentos sobre modificações genéticas em bactérias do gênero *Cupriavidus*.

[73]. O documento EP 1942184 descreve uma bactéria do gênero *Cupriavidus* modificada por um vetor que permite a produção de polihidroxiálcanoatos.

[74]. O documento EP 2813585 descreve o uso de bactérias do gênero *Cupriavidus* em processos de biomineração de elementos de terras raras.

[75]. Percebe-se que não foi detectado nenhum documento que mostre um OGM com metalotioneínas de *Crassostrea rhizophorae*, o que torna a presente invenção nova e inventiva.

### **Objetivos da Invenção**

[76]. É um objeto da presente invenção um organismo geneticamente modificado com proteínas derivadas de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea*.

[77]. Em uma realização preferencial, o organismo é uma bactéria pertencente ao gênero *Cupriavidus*. Em especial a bactéria é *Cupriavidus metallidurans*, e as proteínas são metalotioneínas de *Crassostrea rhizophorae*.

[78]. É um adicional objeto da presente invenção um processo de biorremediação de um ambiente contaminado com metais pesados compreendendo as etapas de:

- a) adição de um inóculo compreendendo um organismo geneticamente modificado com proteínas de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea* ao ambiente contaminado;
- b) incubar tal inóculo no dito ambiente contaminado por um período de tempo variando de 1 hora a 6 meses, para remover metais pesados do dito ambiente contaminado.

[79]. É um adicional objeto da presente invenção um processo de biomineração de um ambiente compreendendo metais pesados, compreendendo as etapas de:

- c) adição de um inóculo compreendendo um organismo geneticamente modificado com proteínas de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea* ao ambiente compreendendo metais pesados;
- d) incubar tal inóculo no dito ambiente compreendendo metais pesados por um período de tempo variando de 1 hora a 6 meses, para minerar os metais pesados do dito ambiente.

[80]. Em uma realização preferencial, o processo de biomineração compreende adicionalmente as etapas de:

- e) separação da biomassa após decorrido o tempo da etapa b); e
- f) isolamento do metal pesado da biomassa separada na etapa c).

### **Descrição das Figuras**

[81]. Figura 1 – Diversidade de mecanismos microbianos de resistência e de detoxificação de metais pesados. Tais mecanismos podem ser intracelulares, tais como o sequestro intracelular por proteínas como as metalotioneínas, ou

extracelulares, como no caso da complexação com biosurfactantes. Adaptado de Roane *et al.*, 2009.

**[82].** Figura 2 – Imobilização e recuperação de íons de metais por adsorção sobre a superfície de células microbianas. Os metais imobilizados na superfície celular durante o processo de biorremediação podem ser recuperados utilizando-se soluções ácidas, alcalinas ou um eluente adequado para o desligamento dos íons metálicos. Adaptado de Kuroda e Ueda, 2011.

**[83].** Figura 3 – Mecanismo de direcionamento à superfície celular proposto para as proteínas autotransportadoras. (A) Organização do precursor polipeptídico. (B) Através do peptídeo sinal, a proteína precursora é transportada através da membrana interna. No periplasma, o domínio autotransportador C-terminal forma um barril  $\beta$  na membrana externa através do qual o domínio passageiro é transportado para a superfície celular. SP, peptídeo sinal; IM, membrana interna; OM, membrana externa. Adaptado de Jose e Meyer, 2007.

**[84].** Figura 4 – Estruturas 3D representativas de MTs. (A) metalotioneína hepática de rato, Cd<sub>7</sub>MT-2, determinada por NMR e por raios-X (PDB 1mrt e 2mrt). (B) Metalotioneína do ouriço-do-mar (*Strongylocentrotus purpureus*), Cd<sub>7</sub>MTA, (PDB 1qil e 1qik; NMR). (C) Metalotioneína do caranguejo azul, Cd<sub>6</sub>MT-1 (PDB 1dmd e 1dmc; NMR). (D) MT de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), Cu<sub>8</sub>Cup1 (PDB 1rju; Raios-X). (E) Metalotioneína da cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942, Zn<sub>4</sub>SmtA (PDB 1jjd; NMR). (F) Domínio II da MT de trigo (*Triticum aestivum*) E<sub>C</sub>-I (PDB 2kak; NMR) com um complexo Zn<sub>3</sub>Cys<sub>9</sub> e um sítio Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> isolado. Átomos de enxofre estão representados em amarelo, cádmio em rosa, zinco em roxo, cobre em verde água e nitrogênio, em azul (Blindauer e Leszczyszyn, 2010).

**[85].** Figura 5 – Representação esquemática da diversidade de metalotioneínas em ostras do gênero *Crassostrea spp.* O domínio  $\alpha$  está representado em azul, o conector (“linker”) em amarelo e o domínio  $\beta$ , em laranja. Na MT de *C. rhizophorae*, a região hachurada indica a extensão putativa da sequência ainda não determinada para esta MT.

[86]. Figura 6– Representação esquemática da organização dos iniciadores utilizados para amplificar o plasmídeo de destino (3 e 4) e o gene de interesse (1 e 2) para clonagem através da técnica “Gibson assembly”.

[87]. Figura 7 - Clonagem molecular através da técnica de “Gibson assembly”. No quadro superior, estão representadas as etapas pré-clonagem, onde o plasmídeo linear é obtido por PCR, e sequencias homólogas às extremidades do plasmídeo (em azul e laranja) são adicionadas ao inserto (cinza) através de PCR com *primers* ancorados. No quadro inferior, estão representados os principais passos da reação de “Gibson assembly”, resultado da ação sequencial da exonuclease 5', DNA polimerase e DNA ligase.

[88]. Figura 8 – Amplificação das extremidades 5' e 3' do cDNA da CrMT. Representações esquemáticas da amplificação das extremidades desconhecidas por (A) RACE 5' e (C) RACE 3'. O RACE 5' consiste na amplificação da terminação 5' do cDNA com um iniciador (“5' PCR primer”, representado pela **SEQ ID NO: 17**) complementar ao adaptador SMARTIV e um iniciador gene específico (“MT.RACE5'.Rv, representado pela **SEQ ID NO: 20**”), complementar a uma região já conhecida da CrMT, na amplificação do gene e da extremidade 5' do mRNA da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae*. No RACE 3' foram utilizados um iniciador gene específico, que tem início no códon de início da CrMT (“MT.Start.Fw”, representado pela **SEQ ID NO: 18**), na amplificação do gene e da extremidade 3' do mRNA da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae* e um iniciador complementar ao oligo dT ancorado “3' RACE CDS A” (“UPM”: “Up long”, representado pela **SEQ ID NO: 15** + “Up short”, representado pela **SEQ ID NO: 16**). Todos os iniciadores estão representados como setas que indicam a sua região de complementariedade e o seu sentido da síntese. Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) dos fragmentos amplificados por (B) RACE 5' (raia B2) e por (D) RACE 3' (raia D2). Nas raias B1 e D1, foi aplicado o padrão de DNA GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder (Fermentas).

[89]. Figura 9 -Alinhamento da região codificante (ORF) das sequencias de mRNA da MT de 10 indivíduos de *C. rhizophorae*. Somente oito sequencias

são mostradas, uma vez que as dos indivíduos Sp3 e Sp4 e dos indivíduos BSJ2 e BSJ3 são redundantes. Somente os nucleotídeos das posições polimórficas são mostrados, sendo os nucleotídeos mais conservados representados por pontos. Na parte inferior do alinhamento, está a sequência consenso, que indica o nucleotídeo mais frequentemente observado em cada posição.

[90]. Figura 10 - Alinhamento das sequências de aminoácidos preditas para 10 indivíduos de *C. rhizophorae*. Posições conservadas em todas as sequências estão destacadas em cinza. Posições dos resíduos de cisteína estão indicadas por setas. Somente sete sequências são mostradas uma vez que os indivíduos Sp3 e Sp4 e os BSJ2, BSJ3 e BSJ4 apresentaram sequências redundantes.

[91]. Figura 11 - Alinhamento entre as sete variantes de CrMT e todas as sequências de MTs com a organização canônica ( $\alpha\beta$ ) de ostras do gênero *Crassostrea* (*C. gigas*, *C. virginica*, *C. angulata*, *C. ariakensis*). Os aminoácidos coloridos são conservados em pelo menos 80% das sequências alinhadas. Para este alinhamento, foram selecionadas todas as sequências disponíveis no GenBank, para o gênero *Crassostrea*, que estivessem completas e que correspondessem a MT canônicas ( $\alpha\beta$ ), sendo excluídas, portanto, as MTs que possuem outras configurações de domínio.

[92]. Figura 12 - Amplificação e sequenciamento do gene CrMT. (A) Eletroforese em gel de agarose (1,2%) do fragmento genômico amplificado por PCR com os iniciadores “MT.Start.Fw” (**SEQ ID NO: 18**) e “MT.Stop.Rv”, representado pela **SEQ ID NO: 19**, utilizado na amplificação do gene da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae*. Na raia da esquerda, foi aplicado o padrão de DNA GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder (Fermentas). (B) Alinhamento entre as regiões codificantes das sequências de mRNA (superior) e genômica (inferior) da CrMT (indivíduo Sp4), com 100% de identidade entre as duas. As sequências dos íntrons não são mostradas, exceto pelos três primeiros e últimos nucleotídeos, que incluem os sítios de processamento do RNA 5' (GT) e 3' (AG).

[93]. Figura 13 – Organização do gene da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae*. Em (A), representação esquemática da estrutura éxon-íntron do gene CrMT (Éxon 1 na posição 1-28), éxon 2 na posição 203-325 e éxon 3 na posição 802-880). Para fins de comparação, em (B), são mostradas as estruturas éxon-íntron de todos os genes conhecidos de metalotioneínas de ostras do gênero *Crassostrea*, acompanhadas dos seus respectivos códigos de acesso. Em todas as representações genômicas, as caixas representam éxons codificantes e as linhas, íntrons. Cg, *C. gigas*, Cv, *C. virginica*. As barras horizontais localizadas a esquerda indicam a escala, em pares de bases.

[94]. Figura 14 - Representação da organização de domínios da (A) metalotioneína de *C. rhizophorae* (CrMT) e dos genes sintéticos CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 (B), CrMT $\alpha$ 2(C) e CrMT $\alpha$ 8 (D). As representações esquemáticas dos quatro genes estão em escalas diferentes. As sequências de nucleotídeos e protéicas dos três genes sintéticos são: CrMT $\alpha$ 2, representado pela **SEQ ID NO: 9** para a sequência protéica e pela **SEQ ID NO: 64** para a sequência de nucleotídeos; CrMT $\alpha$  $\beta$ 4, representado pela **SEQ ID NO: 1** para a sequência protéica e pela **SEQ ID NO: 62** para a sequência de nucleotídeos; e CrMT $\alpha$ 8, representado pela **SEQ ID NO: 11** para a sequência protéica e pela **SEQ ID NO: 63** para a sequência de nucleotídeos. É válido ressaltar que a grafia das sequências, tanto protéicas quanto nucleotídeas, também podem ser entendidas pela grafia em extenso, como “alfa” ou “beta”.

[95]. Figura 15 - Estratégia desenvolvida para a construção do gene sintético CrMT $\alpha$ 2. Na etapa I, o domínio  $\alpha$  foi amplificado por PCR, através de duas reações independentes, para a obtenção de um domínio  $\alpha$  com um sítio *HindIII* na extremidade 3' (reação 1, com os iniciadores MT $\alpha$ -Fw, representado pela **SEQ ID NO: 30**, iniciador senso utilizado na amplificação do domínio  $\alpha$  da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae* com um sítio *HindIII* em sua extremidade 3', e MT $\alpha$ *HindIII*-Rv, representado pela **SEQ ID NO: 29**) e outro, com um sítio *HindIII* na extremidade 5' (reação 2, com os iniciadores MT $\alpha$ *HindIII*-Fw, representado pela **SEQ ID NO: 27** e MT $\alpha$ -Rv, representado pela **SEQ ID NO: 28**, iniciador anti senso utilizado na amplificação do domínio  $\alpha$

da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae* com um sítio *HindIII* em sua extremidade 5'). Na etapa II, os amplicons obtidos foram purificados e digeridos com *HindIII*, gerando extremidades coesivas compatíveis entre eles. Em seguida, após nova purificação, os fragmentos foram ligados pela enzima T4 DNA Ligase (etapa III). A CrMT $\alpha$ 2 assim obtida foi amplificada por PCR (etapa IV) com a adição dos sítios de restrição *BamHI* (iniciador *BamHI*-MTa-Fw, representado pela **SEQ ID NO: 31**) e *Sall* (iniciador *Sall*-MTa-Rv, representado pela **SEQ ID NO: 32**) nas suas extremidades 5' e 3', respectivamente. Este fragmento, após purificação a partir do gel de agarose, foi clonado nos sítios *BamHI*-*Sall* do plasmídeo pGEX-6P-1 (etapa V). Por fim, através de mutagênese do plasmídeo, amplificado com os iniciadores K-MTb-Rv, representado pela **SEQ ID NO: 34**, e VK-MTa.Fw, representado pela **SEQ ID NO: 33**, o sítio *HindIII* entre os dois domínios  $\alpha$  foi substituído pela sequência conectora idêntica a da CrMT original (etapa VI).

**[96].** Figura 16 – Construção do gene sintético CrMT $\alpha$ 2. Em (A), fracionamento por eletroforese em gel de agarose (2%) dos amplicons resultantes da amplificação do domínio  $\alpha$  adicionado de um sítio *HindIII* 3' (raia 2, ~134 pb) ou 5' (raia 3, ~133 pb). Em (B), fracionamento por eletroforese em gel de agarose (2%) do produto da amplificação da construção  $\alpha$ -*HindIII*- $\alpha$ . A seta vermelha indica a banda com tamanho compatível com o esperado para a construção desejada (~272 pb) que foi clonada em pGEX-6P-1. Em (C), fracionamento em gel de agarose (0,8%) do produto de PCR/mutagênese do plasmídeo (raia 7) que, após recircularização, originou o plasmídeo final pGEX-6P-1-CrMT $\alpha$ , descrito em (D). Nas raias 1, 4 e 6 foram aplicados os padrões de DNA “GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder”, “GeneRuler 1 kb DNA Ladder” e “MassRuler High Range DNA Ladder”, respectivamente.

**[97].** Figura 17 - Subclonagem do gene CrMTSp5 em pGEX-6P-1. Em (A), eletroforese em gel de agarose (2 %) do gene CrMT.Sp5 ancorado com os sítios de restrição *BamHI* e *Sall* (~248 pb), amplificado a partir do plasmídeo de origem pGEM-T-CrMTSp5 com os iniciadores *BamHI*-MTa-Fw (**SEQ ID NO: 31**) e *Sall*-MTb-Rv, representado pela **SEQ ID NO: 39**. Em (B), detecção do

inserto CrMT.Sp5 no plasmídio recombinante por PCR com iniciadores plasmídios específicos (pGEX Fw e pGEX Rv), cujo tamanho esperado é 416 pb. Em (C) mapa do plasmídio pGEX-6P-1-CrMT. A correta clonagem do CrMT foi ainda confirmada por sequenciamento com estes mesmos iniciadores plasmídio específicos. Nas raias 1 e 3 foi aplicado o padrão “GeneRuler 1 kb DNA Ladder”.

**[98].** Figura 18 - Subclonagem do gene CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 em pGEX-6P-1. Em (A), eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR/mutagênese do CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 1**, raia 2, ~981 pb) amplificado a partir do plasmídio de origem pJ364-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 com os iniciadores BamHI-MTab4-Fw, representado pela **SEQ ID NO: 35**, e Sall-MTab4-Rv, representado pela **SEQ ID NO: 36**. Em (C), mapa do plasmídio recombinante pGEX-6P-1-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 obtido, que teve a clonagem inicialmente confirmada através da detecção do inserto por PCR com iniciadores plasmídios específicos, indicados no mapa (pGEX Fw e pGEX Rv), cujo produto fracionado em eletroforese em gel agarose (1,5%) é mostrado em (B), com o tamanho esperado de ~1,12 Kb (raia 4). A clonagem do gene CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 1**) foi ainda confirmada por sequenciamento com estes mesmos iniciadores. Nas raias 1 e 3 foi aplicado o padrão de DNA “GeneRuler 1 kb DNA Ladder”.

**[99].** Figura 19 - Subclonagem do gene CrMT $\alpha$ 8 em pGEX-6P-1. Em (A), eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR/mutagênese do CrMT $\alpha$ 8, representado pela **SEQ ID NO: 63** (raia 2, ~1089 pb) amplificado a partir do plasmídio de origem pJ364-CrMT $\alpha$ 8 com os iniciadores EcoRI-MTa8-Fow, representado pela **SEQ ID NO: 37**, e Sall-MTa8-Rv, representado pela **SEQ ID NO: 38**. Em (C), mapa do plasmídio recombinante pGEX-6P-1-CrMT $\alpha$ 8 obtido, que teve a clonagem inicialmente confirmada através da detecção do inserto por PCR com iniciadores plasmídios específicos indicados no mapa (pGEX Fw e pGEX Rv), cujo produto fracionado em eletroforese em gel agarose (1,5%) é mostrado em (B) com o tamanho esperado de ~1251 pb (raia 4). A correta clonagem do CrMT $\alpha$ 8 (**SEQ ID NO: 62**) foi ainda confirmada por sequenciamento com estes mesmos iniciadores. Nas raias 1 e 4 foram

aplicados os padrões de DNA “MassRuler DNA Ladder Mix” e “GeneRuler 1 kb DNA Ladder”, respectivamente.

[100]. Figura 20 – Cassete para expressão e ancoragem na superfície celular de *C. metallidurans*. Em (A) mapa do plasmídio pJ364-SD, onde estão indicados os *iniciadores* utilizados na sua amplificação pTR, representado pela **SEQ ID NO: 21**, e 300\_seqr2, representado pela **SEQ ID NO: 22**. Em (B) ampliação e detalhamento da organização do cassete SD, tendo a sequência protéica representada pela **SEQ ID NO: 8** e a sequência de nucleotídeos pela **SEQ ID NO: 65**. O cassete SD é composto pelo peptídeo sinal, região referente ao sítio múltiplo de clonagem, o epítipo etag e pelo domínio  $\beta$  da protease IgA de *N. gonorrhoea*.

[101]. Figura 21 – Construção do plasmídio pBBR1-SD. Eletroforese em gel de agarose (1%) de fragmentos de DNA de diferentes etapas da construção do plasmídio pBBR1-SD, cujo mapa final é mostrado em (C). Em (A), 1-padrão MassRuler High Range; 2-amplicom contendo o cassete SD, (**SEQ ID NO: 65**~2,2 Kb), obtido com os iniciadores pTR e 300\_seqr2 (**SEQ ID NOs: 21 e 22**, respectivamente); 2-pBBR1MCS $\Delta$ lac linear (~4,5 Kb) amplificado com os iniciadores LacDelFw, representado pela **SEQ ID NO: 42**, e LacDel-Rev, representado pela **SEQ ID NO: 43**. Em (B), confirmação inicial da clonagem e da orientação do cassete SD (**SEQ ID NO: 65**) em pBBR1MCS $\Delta$ lac por PCR e por digestão com enzima de restrição, onde: 4-Padrão GeneRuler 1 Kb; 5-Amplicom dos iniciadores pTR + 300seqr2 (~2,2 Kb), 6-Amplicom dos iniciadores M13 uni (-21), representado pela **SEQ ID NO: 24**, + pTR (~2,17 Kb); 7-Amplicom dos iniciadores M13 uni (-21) + Cat.Rev (~2,63 Kb); 8-Amplicom dos iniciadores 300seqr2 + Cat.Rev (~2,55 Kb); 9-pBBR1-SD digerido com *Bam*HI (~6,6 Kb); 10-pBBR1-SD digerido com *Xba*I e *Sac*II (pBBR1MCS $\Delta$ lac, ~4,5 Kb + cassete SD, ~1,8 Kb), 10-pBBR1-SD não digerido (circular). A sequência do cassete SD no plasmídio pBBR1-SD também foi confirmada por sequenciamento com os iniciadores 300\_seqr2 e pTR e Sd.Fw, representado pela **SEQ ID NO: 48**, e Sd.Rv, representado pelo **SEQ ID NO: 49**, ambos

iniciadores senso utilizados no sequenciamento e amplificação de insertos clonados no cassete SD.

**[102].** Figura 22 – Subclonagem do gene CrMT $\alpha\beta$ 4 em pBBR1-SD. Eletroforese em gel de agarose (1%) de fragmentos de DNA de diferentes etapas da construção do plasmídio pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4, cujo mapa final é mostrado em (E). Em (A), 1-padrão GeneRuler 1Kb; 2-pBBR1-SD linearizado (~6,5 Kb) por PCR com os iniciadores GApBBR1SD.Fw, representado pela **SEQ ID NO: 45**, e GA.pBBR1SD.Rv(**SEQ ID NO:44**)e 3- CrMT $\alpha\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 62**, ~972 pb) amplificada por PCR com os iniciadores GA.MTab4.Fw, representado pela **SEQ ID NO: 46**, e GA.MTab4.Rv, representado pela **SEQ ID NO: 47**, para clonagem por “Gibson assembly”. Em (B), estes mesmos fragmentos após purificação das bandas correspondentes a partir do gel de agarose, onde: 4-Padrão MassRulerHigh Range; 5-pBBR1-SD linearizado (~6,5 Kb) e 6- CrMT $\alpha\beta$ 4 (927 pb); 7-Padrão MassRuler Low Range. A confirmação inicial da clonagem foi feita por PCR, em (C), onde 8-Padrão GeneRuler 1Kb, 9-Amplicom dos iniciadores 300\_seqr2 + Sd.Rv (**SEQ ID NOs: 22 e 49**, respectivamente; ~1,6 Kb); 10-Amplicom dos iniciadores GA.MTab4.Fw + GA.MTab4.Rv (~972 pb). Em (D), confirmação da clonagem por digestão do plasmídio recombinante com enzimas de restrição, onde: 11-padrão GeneRuler 1Kb, 12-pBBR1-SD (~4,5 Kb + ~1,8 Kb) e 13-pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (~4,5 Kb + ~2,7 Kb) digeridos com XbaI e SacII. Por fim, a sequência do inserto foi também confirmada por sequenciamento de DNA com os iniciadores Sd.fw e Sd.rv (**SEQ ID NO: 49**).

**[103].** Figura 23 – Imunodeteção das proteínas de fusão em extratos protéicos totais através de western blot. As proteínas de fusão CrMT $\alpha\beta$ 4-IgA $\beta$  (primeira raia) e IgA $\beta$  (segunda raia) tem como peso molecular esperado ~79 KDa e ~50 KDa, respectivamente. Na terceira e última raia, foi analisado o extrato proteico da linhagem selvagem (LMG 1195), na qual nenhuma marcação era esperada.

**[104].** Figura 24 – Mapa do plasmídio pGEX-6P-1. Somente os sítios de restrição que fazem parte do sítio múltiplo de clonagem (MCS) estão representados. Insertos clonados neste plasmídio podem ser amplificados ou

sequenciados com os iniciadores pGEX Fwd e pGEX Rev, representados, respectivamente, pela **SEQ ID NO: 25** e **SEQ ID NO: 26**, cujos sítios de anelamento estão representados no mapa.

**[105]**. Figura 25 – Mapa do plasmídeo pBBR1MCS. Somente os sítios de restrição únicos que fazem parte do sítio múltiplo de clonagem (SMC) estão representados. O sentido e a posição de anelamento dos iniciadores M13 rev, representado pela **SEQ ID NO: 23**, M13 uni (**SEQ ID NO: 24**), SacII-LacDelFw e XbaI-LacDel-Rev estão indicadas.

**[106]**. Figura 26 – Mapa do plasmídeo pGEM-T.

**[107]**. Figura 27 – Sequências resultantes das reações de RACE 5' e RACE 3'. Foram alinhadas as sequências resultantes do RACE 5' (indivíduo BSJ6), do RACE 3' (indivíduo Sp1), a sequência parcial da CrMT e a sequência da CvMTI-A de *C. virginica*. Estão indicados na figura a posição e sentido de anelamento dos iniciadores utilizados no RACE 5' (MT.RACE5'.Rv, **SEQ ID NO: 20**) e no RACE 3' (MT.Start.Fw, **SEQ ID NO: 18**). Estão também destacados o códon de início da tradução, ATG, em verde, o códon de parada da tradução, TGA, em vermelho, e o sítio putativo de poliadenilação do mRNA, em rosa.

**[108]**. Figura 28 – Mapas dos plasmídios pJ364-CRMT $\alpha\beta$ 4 e pJ364-CRMT $\alpha$ 8.

**[109]**. Figura 29 – Resultados das buscas por similaridade (BLASTp) realizadas com as sete variantes de CrMT identificadas contra o banco não redundante de proteínas do NCBI.\*As posições de início e término dos alinhamentos se referem as sequências pesquisadas.

**[110]**. Figura 30 – Os gráficos mostram a concentração de cádmio em solução (a e c) e na biomassa (b e d) em função do tempo de adsorção. Azul - *C. metallidurans* LMG 1195; vermelho - *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (sem pré-indução); verde - *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (pré-induzida). Os resultados dos primeiro e segundo experimentos são mostrados em pares, (a e b) e (c e d), respectivamente. Todos os valores correspondem a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

[111]. Figura 31 – Os gráficos mostram a concentração de níquel em solução (a e c) e na biomassa (b e d) em função do tempo de adsorção. Azul - *C. metallidurans* LMG 1195; vermelho - *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (sem pré-indução); verde - *C. metallidurans* pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (pré-induzida). Os resultados dos primeiro e segundo experimentos são mostrados em pares, (a e b) e (c e d), respectivamente. Todos os valores correspondem a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

[112]. Figura 32 – Viabilidade durante adsorção em solução 1 mM de Cádmio (a e b) e níquel (c e d) em função do tempo de bioadsorção. Azul - *C. metallidurans* LMG 1195; vermelho - *C. metallidurans* pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (sem pré-indução); verde - *C. metallidurans* pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (pré-induzida). Os resultados dos primeiro e segundo experimentos são mostrados em pares, (a e b) e (c e d), respectivamente.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[113]. Os exemplos aqui descritos têm o intuito apenas de exemplificar algumas realizações possíveis da invenção, e não devem ser encarados como limitantes de variações dos objetos aqui apresentados.

### **[114]. Metais pesados**

[115]. Apesar de ser um termo amplamente utilizado, não existe um consenso científico e muitas são as definições de “metais pesados” descritas na literatura (Duffus, 2002). Frequentemente, este termo é utilizado para se referir a metais e semimetais (metalóides) associados com contaminação, toxicidade e/ou ecotoxicidade. Embora não haja um consenso, uma definição frequente é a de que metais pesados são elementos com densidade superior a 5 g/cm<sup>3</sup>. Fisiologicamente, os metais podem ser classificados em três grupos: (i) essenciais e basicamente não tóxicos (por exemplo Ca e Mg); (ii) essenciais, porém tóxicos em altas concentrações (por exemplo Fe, Mn, Zn, Cu) e (iii) tóxicos (por exemplo Cd e Hg). No entanto, esta classificação também pode variar entre diferentes organismos, que podem apresentar sensibilidade a metais distintas (Roane *et al.*, 2009, Vallse Lorenzo, 2002).

[116]. Para efeitos da presente invenção serão considerados metais pesados os elementos dos grupos 2 a 12 da tabela periódica, incluindo lantanídeos e actinídeos. Preferencialmente, os metais são escolhidos do grupo que compreende: Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cd e Hg e combinações dos mesmos, em qualquer estado de oxidação.

[117]. Organismo Geneticamente Modificado

[118]. O organismo geneticamente modificado da presente invenção pode ser qualquer organismo capaz de expressar as proteínas de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea*. Em especial este organismo é escolhido do grupo que compreende bactérias e fungos.

[119]. A cepa bacteriana da presente invenção, a qual é geneticamente modificada, é pertencente ao gênero *Cupriavidus*. Em especial, ela é escolhida do grupo que compreende *C. alkaliphilus*, *C. basilensis*, *C. campinensis*, *C. gilardii*, *C. laharis*, *C. metallidurans*, *C. numazuensis*, *C. oxalaticus*, *C. pampae*, *C. pauculus*, *C. pinatubonensis*, *C. respiraculi*, *C. taiwanensis* e combinações dos mesmos.

[120]. Preferencialmente a espécie é *Cupriavidus metallidurans*.

[121]. Proteínas derivadas de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea*

[122]. O organismo de escolha será transformado (geneticamente modificado) com genes de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea*. Conforme dito acima, o organismo de escolha é a bactéria *Cupriavidus sp.*

[123]. Para efeitos da presente invenção, estão incluídas na definição de proteínas derivadas, as proteínas que são derivadas e/ou inspiradas em proteínas das espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea* e que não existam na natureza.

[124]. As proteínas que serão incluídas nas cepas de *Cupriavidus* são proteínas que se ligam a metais com grande afinidade, como por exemplo metalotioneínas.

[125]. Em especial as metalotioneínas utilizadas são oriundas de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea*, podendo ser escolhida do grupo que compreende *C. angulata*, *C. ariakensis*, *C. chilensis*, *C. columbiensis*, *C.*

*corteziensis*, *C. gasar*, *C. gigas*, *C. glomerata*, *C. iredalei*, *C. rhizophorae*, *C. virginica* e combinações dos mesmos.

[126]. Em uma realização preferencial, utiliza-se metalotioneínas de *C. rhizophorae*. As metalotioneínas mais preferidas são as que estão listadas nas SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 11.

[127]. A transformação das cepas de *C. metallidurans* é realizada por métodos conhecidas do estado da técnica, e são detalhadas nos exemplos abaixo.

[128]. Processo de Biorremediação e Biomineração

[129]. Os OGMs da presente invenção são muito úteis em processos de biorremediação e de biomineração, onde é desejado a remoção de metais pesados de um determinado ambiente.

[130]. Desta forma, o processo de biorremediação de um ambiente contaminado com metais pesados compreende as etapas de:

- a) adição, de um inóculo compreendendo um organismo geneticamente modificado com proteínas de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea*, ao ambiente contaminado; e
- b) incubação de tal inóculo no dito ambiente contaminado por um período de tempo variando de 1 hora a 6 meses, para remover metais pesados do dito ambiente contaminado.

[131]. O detalhamento do organismo geneticamente modificado e das proteínas inseridas na bactéria está descrito nos parágrafos anteriores.

[132]. O processo de biomineração de um ambiente compreendendo metais pesados, compreende as etapas de:

- a) adição de um inóculo, compreendendo um organismo geneticamente modificado com proteínas de espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea*, ao ambiente compreendendo metais pesados; e
- b) incubação de tal inóculo no dito ambiente compreendendo metais pesados por um período de tempo variando de 1 hora a 6 meses, para minerar os metais pesados do dito ambiente.

[133]. Em uma realização preferencial, os processos de biomineração e biorremediação compreendem adicionalmente as etapas de:

- [134]. c) separação da biomassa após decorrido o tempo da etapa b); e
- [135]. d) isolamento do metal pesado da biomassa separada na etapa c).
- [136]. O detalhamento do organismo geneticamente modificado e das proteínas inseridas está descrito nos parágrafos anteriores.

[137]. **Exemplos**

[138]. **Animais**

[139]. As ostras *C. rhizophorae* utilizadas neste trabalho foram coletadas na foz do Rio São João (22°48'S e 43°22'W) em Barra de São João, distrito de Casimiro de Abreu (RJ), e na Baía de Sepetiba, localizada no sul do Estado do Rio de Janeiro (22-23°S 43-44°W). No total, foram utilizadas 11 ostras, seis coletadas no Rio São João (indivíduos BSJ1-6), e cinco coletadas em Sepetiba (indivíduos SP1-5).

[140]. **Plasmídios e Iniciadores**

[141]. As tabelas 2 e 3 detalham os plasmídios e iniciadores utilizados na presente invenção

**Tabela 2** – Lista de plasmídios utilizados neste trabalho.

Plasmídio	Descrição	Resistência antibiótico	<sup>a</sup> Referência	Mapa
pGEX-6P-1	Vetor de clonagem e expressão (em fusão com GST) para <i>E. coli</i> .	Ampicilina (Amp <sup>R</sup> )	GE Life Sciences	Figura 24
pBBR1MCS	Plasmídio de amplo espectro para bactérias gram-negativas.	Cloranfenicol (Cm <sup>R</sup> )	Kovach et al., 1994; Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)	Figura 25
pGEM-T	Vetor de clonagem de produtos de PCR pelo sistema T-A.	Ampicilina (Amp <sup>R</sup> )	Promega	Figura 26

**Tabela 3** – Lista de iniciadores utilizados neste trabalho.

Nome Iniciador	do Sequencia	Aplicação	Referência
SMART IV	SEQ ID NO 12	Síntese de cDNA para RACE 5'	Clontech
CDSIII	SEQ ID NO 13	Síntese de cDNA para RACE 5'	Clontech

3'-CDS primer A	SEQ ID NO 14	Síntese de cDNA para RACE 3'	Clontech
UPM long	SEQ ID NO 15	Amplificação por RACE 3' (UPM long + UPM short)	Clontech
UPM short	SEQ ID NO 16		Clontech
5' PCR primer	SEQ ID NO 17	Amplificação por RACE 5'	Clontech
MT.Start.Fw	SEQ ID NO 18	Amplificação da extremidade 3' da CrMT (RACE 3') e amplificação do gene CrMT.	Este trabalho
MT.Stop.Rv	SEQ ID NO 19	Amplificação do gene CrMT.	Este trabalho
MT.RACE5'.Rv	SEQ ID NO 20	Amplificação da extremidade 5' da CrMT (RACE 5')	Este trabalho
pTR	SEQ ID NO 21	Amplificação de insertos clonados no plasmídeo pJ364.	DNA2.0 Inc
300_seqr2	SEQ ID NO 22		DNA2.0 Inc
M13 rev (-29)	SEQ ID NO 23	Amplificação a partir do plasmídeo pBBR1MCS.	Kovack et al., 1994
M13 uni (-21)	SEQ ID NO 24		
pGEx for	SEQ ID NO 25	Sequenciamento e amplificação de insertos clonados em pGEX-6P-1.	GE Healthcare
pGExrev	SEQ ID NO 26		GE Healthcare
MT $\alpha$ HindIII-Fw	SEQ ID NO 27	Amplificação do domínio $\alpha$ com um sítio <i>HindIII</i> na extremidade 5'.	Este trabalho
MT $\alpha$ -Rv	SEQ ID NO 28		Este trabalho
MT $\alpha$ HindIII-Rv	SEQ ID NO 29	Amplificação do domínio $\alpha$ com um sítio <i>HindIII</i> na extremidade 3'.	Este trabalho
MT $\alpha$ -Fw	SEQ ID NO 30		Este trabalho
BamHI-MTa-Fw	SEQ ID NO 31	Amplificação da construção $\alpha$ - <i>HindIII</i> - $\alpha$ para subclonagem em pGEX-6P-1.	Este trabalho
Sall-MTa-Rv	SEQ ID NO 32		Este trabalho
VK-MTa.Fw	SEQ ID NO 33	Amplificação/Mutagênese da sequencia conectora da primeira versão da CrMT $\alpha$ 2	Este trabalho
K-MTb-Rv	SEQ ID NO 34		Este trabalho
BamHI-MTab4-Fw	SEQ ID NO 35	Mutagênese/Amplificação do gene sintético CrMT $\alpha$ $\beta$ 4 para clonagem em pGEX-6P-1.	Este trabalho
Sall-MTab4-Rv	SEQ ID NO 36		Este trabalho
EcoRI-MTa8-Fow	SEQ ID NO 37	Mutagênese/Amplificação do gene sintético CrMT $\alpha$ 8 para clonagem em pGEX-6P-1.	Este trabalho
Sall-MTa8-Rv	SEQ ID NO 38		Este trabalho
Sall-MTb-Rv	SEQ ID NO 39	Amplificação, em conjunto com o primer BamHI-MTa-Fw, do gene CrMTSp5 para subclonagem em pGEX-6P-1.	Este trabalho
M13/pUC-Foward	SEQ ID NO 40	Amplificação/sequenciamento de insertos clonados nos plasmídios pGEM-T	Promega
M13/pUC-Reverse	SEQ ID NO 41		Promega
LacDelFw	SEQ ID NO 42	Deleção do promotor lac/amplificação do plasmídeo pBBR1MCS.	Este trabalho
LacDel-Rev	SEQ ID NO 43		Este trabalho
GApBBR1SD.Rv	SEQ ID NO 44	Amplificação do plasmídeo pBBR1-SD para clonagem do gene sintético CrMT $\alpha$ $\beta$ 4 através de " <i>Gibson assembly</i> ".	Este trabalho
GApBBR1SD.Fw	SEQ ID NO 45		Este trabalho

GA.MTab4.Fw	SEQ ID NO 46	Amplificação do gene sintético CrMT $\alpha$ $\beta$ 4 para clonagem em pBBR1-SD através de "Gibson assembly".	Este trabalho
GA.MTab4.Rv	SEQ ID NO 47		Este trabalho
Sd.Fw	SEQ ID NO 48	Sequenciamento e amplificação de insertos clonados no cassete SD.	Este trabalho
Sd.Rv	SEQ ID NO 49		Este trabalho
Cat.Rv	SEQ ID NO.66	Detecção do inserto em pBBR1-SD.	Este trabalho

**[142].** Extração de RNA total e de DNA genômico

**[143].** As glândulas digestivas de *C. rhizophorae* foram dissecadas e mantidas em solução preservadora de RNA (RNA Later, Ambion), a -20°C, até o momento da extração. Para cada ostra, cerca de 100 mg deste tecido foram homogeneizados em 1 ml de TRIZOL (Invitrogen) e o isolamento de RNA total e de DNA genômico foram realizados de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante. As amostras de RNA total tiveram sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,2%) em condições desnaturantes de acordo com o protocolo descrito por (Masek, *et al.*, 2005). As concentrações de RNA e de DNA foram calculadas de acordo com o valor de absorbância a 260 nm e a pureza das amostras foi inferida a partir das razões 260/230 nm e 260/280 nm (Sambrook e Russel, 2001). Os valores de absorbância foram determinados em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

**[144].** Síntese de cDNA.

**[145].** Dois tipos de reações de síntese de cDNA foram realizadas de forma independente. Na reação #1, uma sequencia adaptadora (SMART IV – **SEQ ID NO:12**) foi adicionada a extremidade 5' do mRNA através do mecanismo de "troca de molde" (Zhu *et al.*, 2001) e na reação #2, uma sequencia adaptadora foi adicionada a extremidade 3' do mRNA, através de um oligo dT ancorado ("3'-CDS *primer A*", representado pela **SEQ ID NO: 14**). Para cada reação de síntese de cDNA, foram primeiramente adicionados água deionizada estéril, RNA total (1  $\mu$ g) e 12 pmol de cada um do(s) respectivo (s) iniciadores(s): SMART IV e CDSIII, representada pela **SEQ ID NO: 13**, nas reações #1 e 3' RACE CDS A, nas reações #2. Após uma incubação de 2 minutos a 72°C e de

2 minutos em gelo, os demais reagentes foram adicionados: tampão de reação 5X (fermentas), 1  $\mu\text{mol}$  de dNTP (desoxinucleotídeos) e a transcriptase reversa RevertAid M-MuL-V (Fermentas). As reações foram incubadas a 42°C durante 1h e 30 min e inativadas durante 10 minutos, a 70°C.

**[146].** Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

**[147].** As reações de amplificação envolvidas nas etapas de amplificação das extremidades do cDNA (RACE 5' e 3') e de isolamento do gene CrMT, representado pela **SEQ ID NO: 50**, a partir do DNA genômico foram realizadas com a enzima Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas). Em cada reação, foram utilizados volumes variáveis de DNA molde, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, além de 5  $\mu\text{l}$  de tampão 10X, 3  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{l}$  de dNTP 10  $\mu\text{M}$  (Fermentas), 0,2  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polimerase recombinante e água deionizada estéril para completar o volume final de 50  $\mu\text{l}$ .

**[148].** A DNA polimerase Q5 High-Fidelity (NEB) foi utilizada em todas as etapas de PCR envolvidas na construção e subclonagem da CrMT e dos genes sintéticos de metalotioneínas assim como na construção do plasmídeo pBBR1-SD. Em cada reação, usou-se quantidades e volumes variáveis de DNA molde, 5  $\mu\text{l}$  de tampão 5X (NEB), 0,5  $\mu\text{l}$  de dNTP 10 mM (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, 0,25  $\mu\text{l}$  de DNA polimerase Q5 High-Fidelity e água ultra pura (Millipore Ultrapure Water for Molecular Biology). Os ciclos de temperatura utilizados nas principais etapas de PCR realizadas estão descritos na tabela 4.

[149]. **Tabela 4** – Ciclos de temperatura utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) ao longo deste trabalho.

Alvo	Iniciadores	Desnatu- ração Inicial	Nº de ciclos	Ciclo			Extensão final
				Desnatu- ração	Anelamento	Extensão	
CrMT (RACE 5')	5' PCR primer e MT.RACE5.Rv	2'@94°C	40	30''@94°C	30''@60°C (- 1°C/ciclo, por 10 ciclos). 30''@55°C (por 30 ciclos)	45''@72°C	2'@72°C
CrMT (RACE 3')	MT.Start.Fw e UPM	2'@94°C	40	30''@94°C	30''@60°C (- 1°C/ciclo, por 10 ciclos). 30''@57°C (por 30 ciclos)	45''@72°C	2'@72°C
Gene CrMT	MT.Sart.Fw e MT.Stop.Rv	2'@94°C	40	30''@94°C	30''@60°C (- 1°C/ciclo, por 10 ciclos). 30''@55°C (por 30 ciclos)	1'@72°C	2'@72°C
Domínio $\alpha$ (#1)	MT $\alpha$ -Fw e MT $\alpha$ HindIII-Rv	1'@98°C	35	10''@98°C	30''@70°C	20''@72°C	2'@72°C
Domínio $\alpha$ (#2)	MT $\alpha$ HindIII-Fw e MT $\alpha$ -Rv	1'@98°C	35	10''@98°C	30''@69°C	20''@72°C	2'@72°C
$\alpha$ -HindIII - $\alpha$	BamHI-MTa-Fw e Sall-MTa-Rv	1'@98°C	35	10''@98°C	20''@72°C		2'@72°C
pGEX-6P-1- $\alpha$ -HindIII- $\alpha$ (mutagênese)	K-MTb-Rv e VK- MTa.Fw	2'@98°C	35	15''@98°C	30''@66°C	3'@72°C	2'@72°C
CrMT.Sp5	BamHI-MTa-Fw e Sall-MTb-Rv	2'@98°C	35	10''@98°C	30''@72°C		2'@72°C
CrMT $\alpha\beta$ 4	BamHI-MTab4-Fw e Sall-MTab4-Rv	2'@94°C	35	30''@94°C	2'30''@72°C		2'@72°C
CrMT $\alpha$ 8	EcoRI-MTa8-Fow e Sall-MTa8-Rv	2'@94°C	35	30''@94°C	20''@66°C	2'@72°C	2'@72°C
Cassete SD	pTR e 300_seqr2	2'@98°C	35	10''@98°C	15''@62°C	40''@72°C	2'@72°C
pBBR1MCS	LacDelFw e LacDel- rev	2'@98°C	35	10''@98°C	3'@72°C		2'@72°C
pBBR1-SD	GA.pBBR1SD.Fw e GA.pBBR1SD.Rv	2'@98°C	35	10''@98°C	15''@71,8°C	5'30''@72°C	2'@72°C
CrMT $\alpha\beta$ 4	GA.MTab4.Fw e GA.MTab4.Rv	2'@98°C	35	10''@98°C	15''@63°C	40''@72°C	2'@72°C

[150]. Síntese de DNA.

[151]. Sequências nucleotídicas de interesse foram desenhadas *in silico* e obtidas por síntese de DNA *de novo* pela empresa DNA 2.0 (EUA). No caso de sequências com repetições, que dificultam a síntese, as sequências originais foram ainda submetidas a um serviço de otimização, também oferecido pela empresa DNA 2.0, para diminuir tais repetições, através do uso de códons sinônimos, preservando a sequência de aminoácidos codificada e respeitando o padrão de uso de códons de *C. metallidurans*, organismo onde tais construções serão expressas. Os fragmentos de DNA sintéticos foram fornecidos clonados no plasmídeo pJ364.

[152]. Digestão de DNA com enzimas de restrição.

[153]. Em todas as reações de digestão de DNA com enzimas de restrição, os protocolos recomendados pelo fabricante (Fermentas/Thermo Scientific) foram seguidos, e, sempre que possível e necessário, reações de digestão duplas foram realizadas.

[154]. Eletroforese em gel de agarose.

[155]. Alíquotas dos produtos de PCRs e de digestão de DNA com enzimas de restrição foram fracionadas por eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio ( $17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5x (GIBCO) ou com o tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M; EDTA 1 mM). As concentrações de agarose utilizadas foram variáveis e estão indicadas nas legendas de cada figura. Todos os padrões de DNA utilizados foram adquiridos da Fermentas.

[156]. Purificação de fragmentos de DNA a partir de reações enzimáticas.

[157]. Os fragmentos de DNA foram purificados a partir de reações enzimáticas com o kit GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich), seguindo o protocolo indicado no mesmo. Quando necessário, os fragmentos de DNA foram purificados após fracionamento por eletroforese em gel de agarose com o sistema de eletroforese e isolamento de fragmentos de DNA CloneWell (Life Technologies), utilizando o gel comercial com 2% de agarose E-Gel® SizeSelect™ (Life Technologies) ou com o kit EUROGOLD Gel Extraction (EUROCLONE), em ambos os casos, seguindo-se os protocolos sugeridos pelos respectivos fabricantes.

[158]. Ligação de DNA.

[159]. Os produtos de cada reação de PCR/RACE 5' e PCR/RACE 3' assim como da amplificação do gene CrMT (**SEQ ID NO: 50**, DNA genômico) foram clonados no plasmídeo pGEM-T com o kit pGEM®-T Vector System I (Promega). Para isso, em cada reação de ligação de DNA, usou-se entre 1 e 1,5  $\mu\text{l}$  de amplicom purificado, 25 ng de pGEM-T, 2,5  $\mu\text{l}$  de tampão de ligação 2X, 0,5  $\mu\text{l}$  de T4 DNA Ligase e, se necessário, água deionizada estéril para completar o volume final de 5  $\mu\text{l}$ . As reações foram incubadas a 4°C durante cerca de 18h. As demais reações de ligação de DNA foram realizadas com o kit

Instant Sticky-end Ligase Master Mix (NEB), no caso de ligações coesivas, onde os fragmentos envolvidos foram previamente digeridos com as respectivas enzimas de restrição e purificados. O kit Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB) foi utilizado para as ligações não coesivas, de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. Neste caso, os insertos ou plasmídios (no caso de recircularização sem inserto) foram previamente fosforilados com a enzima T4 Polynucleotide Kinase (Fermentas), seguindo-se o protocolo do fabricante, e purificados.

**[160].** Clonagem molecular pela técnica de “Gibson assembly”.

**[161].** O método “Gibson assembly” (Gibson *et al.*, 2009) promove a ligação de dois ou mais fragmentos de DNA em uma única etapa isotérmica (50°C) e multi-enzimática, catalisada pela atividade de três enzimas: exonuclease 5', DNA polimerase e DNA ligase. Como pré-requisito, as extremidades dos fragmentos de DNA a serem ligados devem apresentar uma pequena região de sobreposição (15-80 pb) para que a ligação ocorra. Portanto, para a clonagem molecular de um fragmento de DNA (“inserto”) em um plasmídio, o inserto deve estar flanqueado pelas sequências que cercam o sítio de clonagem no plasmídio de destino. Estas sequências foram adicionadas ao inserto através de PCR com iniciadores ancorados com as mesmas. Por sua vez, o plasmídio linear foi gerado por PCR, com iniciadores que se anelam às sequências que flanqueiam o sítio de clonagem em questão (**Figura 6**). Todos os iniciadores utilizados nesta etapa foram desenhados com o auxílio da ferramenta NEBuilder (<http://nebuilder.neb.com/>).

**[162].** Como ilustrado na **Figura 7**, o fragmento de DNA e o plasmídio linear, quando incubados com o coquetel de enzimas, são ligados em três passos: 1) a exonuclease 5' degrada uma pequena região a partir da extremidade 5' de cada uma das fitas, gerando pontas coesivas, em fita simples, (2) as extremidades sobrepostas, agora em fita simples, dos dois fragmentos, plasmídio e inserto, se anelam e a DNA polimerase preenche as lacunas para, por fim, (3) a DNA ligase catalisar a ligação fosfodiéster entre as pontas dos dois fragmentos, gerando uma única molécula circular.

**[163].** A clonagem molecular por meio da técnica de “Gibsson Assembly” foi realizada com o kit Gibson Assembly Cloning (NEB). Para a reação, foram adicionados 50 ng de plasmídeo linear, ~22 ng do inserto, 10 µl de Gibson Assembly master mix 2X (NEB) e água ultra pura (Millipore) para completar o volume de 20 µl. A reação foi incubada a 50°C durante 1 hora.

**[164].** Transformação de *E. coli*.

**[165].** Os produtos das reações de clonagem foram transformados em *E. coli* por diferentes métodos. Quando as células competentes comerciais “Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells” (Invitrogen) foram utilizadas, a transformação foi feita de acordo com o protocolo de choque térmico indicado pelo fabricante. Alternativamente, o kit “TransformAid Bacterial Transformation” (Fermentas) foi utilizado para a indução de competência e transformação de células de *E. coli* (DH5-α ou JM109), seguindo-se as recomendações do fabricante. No caso da transformação com os produtos de clonagem obtidos pela técnica de “Gibson assembly”, foram utilizadas as células de *E. coli* competentes (NEB 5-alpha Competent *E. coli*- High Efficiency) fornecidas com este kit, de acordo com as instruções do fabricante.

**[166].** Extração e purificação de DNA plasmidial.

**[167].** Após cada etapa de transformação de *E. coli*, as suspensões de células transformantes foram plaqueadas em meio LB contendo agar (2%) e o antibiótico para seleção do plasmídeo em questão. Para os plasmídios pGEM-T e pGEX-6P-1 e os plasmídios derivados a partir deles, foi utilizado 100 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Enquanto que para o plasmídeo pBBR1MCS e seus derivados foi utilizado 25 µg.mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C durante pelo menos 18 horas.

**[168].** As colônias recombinantes foram identificadas por PCR de colônia. Cada colônia foi dissolvida em 25 µl de água deionizada estéril e aquecida a 98°C durante dois minutos e, em seguida, centrifugada durante dois minutos, a temperatura ambiente. Para cada colônia analisada, 1 µl do sobrenadante obtido foi utilizado como molde para detecção do inserto por PCR, com iniciadores plasmídeo-específicos que flanqueiam o sítio de clonagem do

plasmídio em questão (indicados, para cada plasmídio, no item 3.3). Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose para averiguação da presença e tamanho dos insertos.

**[169].** As colônias recombinantes assim selecionadas foram cultivadas em meio LB contendo o antibiótico apropriado (ampicilina ou cloranfenicol, dependendo do plasmídio) a 37°C com agitação de 250 RPM e durante 18h para posterior isolamento de DNA plasmidial em pequena escala pelo método da lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001), com o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) ou com o kit Plasmid Mini Prep (EUROCLONE), seguindo os protocolos indicados pelos fabricantes.

**[170].** Análise *in silico* de sequencias

**[171].** Os cromatogramas resultantes das etapas de sequenciamento foram convertidos em sequencias de nucleotídeos (“*base calling*”) e submetidos a uma etapa de limpeza onde trechos de baixa qualidade e referentes ao plasmídio utilizado foram removidos. Estas etapas foram realizadas com a ferramenta ESTpiper (Tang et al., 2009) ou Webtraceminer (Liang et al., 2007). Os alinhamentos múltiplos de sequencias foram gerados e visualizados, respectivamente, com os software ClustalX 2.1 (Larkin et al., 2007) e Jalview (Waterhouse et al., 2009). As sequencias de cDNA e genômica foram alinhadas com o software SIM4 (Florea, et al., 1998). A identificação de ORFs (“*Open Reading Frames*” – Quadros abertos de leitura) e a tradução predita das sequencias de aminoácidos correspondentes foram determinadas através da ferramenta ORF Finder do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Buscas por similaridade realizadas com algoritmos BLAST foram conduzidas através do servidor do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Todos os mapas de plasmídios e construções foram gerados a partir das respectivas sequencias com o programa SnapGene® (GSL Biotech, <http://snapgene.com>).

**[172].** Transformação de *C. metallidurans* por eletroporação.

**[173].** *C. metallidurans* CH34 (LMG 1195, coleção BCCM/LMG, Bélgica) foi transformada por meio de eletroporação, como descrito por Taghavi *et al.* (1994), com algumas modificações. Para cada transformação, 1 µl de DNA (25-

50 ng/ $\mu$ l) foi adicionado a uma alíquota de 40  $\mu$ l de células competentes, preparadas como descrito por Taghavi *et al.* (1994). A mistura de DNA e células competentes foi transferida para uma cubeta de 1 mm gelada e submetida a um pulso elétrico de 1800V. Em seguida, adicionou-se 1 ml de meio SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0.5%, NaCl 0.5%, KCl 2.5 mM, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glicose 20 mM) e incubou-se a suspensão celular a 30°C com agitação (180 RPM) durante 1 hora. As células transformantes foram plaqueadas em meio triptona de soja (Oxoid) contendo agar (2%) e cloranfenicol (250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas.

**[174]. SDS-PAGE e western blot.**

**[175].** Uma colônia de cada linhagem transformante de *C. metallidurans* e da linhagem selvagem (LMG 1195) foram inoculadas, separadamente, em 10 ml de meio triptona de soja (Tryptone Soya Broth, Oxoid), suplementado com cloranfenicol (250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), no caso das linhagens transformantes. Os inóculos foram cultivados a 30°C com agitação (180 RPM) até atingirem DO<sub>600m</sub> ~1.0. Neste ponto, para cada linhagem, 5 ml de células foram centrifugados a 5000xg durante cinco minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos de células foram ressuspensos em 500  $\mu$ l de tampão de lise (SDS 5%, Tris 50 mM, pH 8,6) pré-aquecido a 100°C. Estas suspensões foram fervidas durante pelo menos 10 minutos para a lise celular e obtenção dos extratos totais de proteína. A quantidade de proteínas em cada amostra foi determinada com o kit Micro BCA protein assay (Pierce), seguindo o protocolo para microplacas indicado pelo fabricante.

**[176].** Para cada extrato proteico total, o volume correspondente a 35  $\mu$ g de proteína foi diluído com tampão de amostra 2X (Tris-Cl 100 mM, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol), 1,5  $\mu$ l de DTT (1 M) e água para completar o volume final de 20  $\mu$ l. As amostras foram fervidas durante cinco minutos e resolvidas em um gel de poliacrilamina 12% (12% Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Gel, BIO-RAD) em tampão TRIS/Glicina/SDS (Sambrook e Russel, 2001). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF em um sistema de

transferência semi-seca (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell - BIO-RAD), de acordo com as instruções do fabricante.

[177]. A membrana foi bloqueada em leite desnatado 10% em TBS-T (Tris-cl 50 mM, NaCl 150 mM, 0,01% Tween 20, pH 7,4) durante 1 h, a temperatura ambiente. Após esta etapa, a membrana foi incubada com o anticorpo primário Anti etag (Abnova, cat# PAB12765), diluído 1:1000 com leite desnatado 10% em TBS-T, durante três horas, a temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos cada com TBS-T, a membrana foi incubada durante 1 h com o anticorpo secundário Goat Anti-Rabbit IgG Fc HRP (Abnova, cat#PAB12765) diluído 1:5000 com leite desnatado 10% em TBS-T. Por fim, após três lavagens de 10 minutos cada em TBS-T e uma última lavagem de cinco minutos em TBS (Tris-cl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), a membrana foi revelada com o kit Immuno-Star HRP (BIO-RAD) no sistema Molecular Imager Gel Doc XR+ System (BIORAD).

#### [178]. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

[179]. Sequenciamento e anotação do gene da metalotioneína de *C. rhizophorae*.

[180]. Sequenciamento do mRNA da CrMT.

[181]. A ostra de mangue *C. rhizophorae* é ainda um organismo pouquíssimo representado nos bancos de sequencias de nucleotídeos e de proteínas. De tal forma que a sequencia da metalotioneína desta espécie é apenas parcialmente conhecida e contém aparentemente um fragmento de domínio  $\alpha$ , o conector e um fragmento de um domínio  $\beta$ . Portanto, a primeira etapa deste trabalho consistiu no sequenciamento e caracterização do gene metalotioneína de *C. rhizophorae*, por nós denominado CrMT.

[182]. Para isso, uma sequencia parcial do mRNA da CrMT (GI:14017404) foi utilizada como base para o desenho de um iniciador anti-senso gene-específico para amplificação da sua extremidade 5' através da técnica de RACE 5', como descrito na **Figura 8A**. Esta etapa resultou na obtenção de um fragmento com tamanho aparente entre 300 e 400 pb (**Figura 8B**) e em uma sequencia de 167

pb contendo o domínio  $\alpha$  completo, o códon de início da tradução (ATG) e a UTR 5' (53 pb) do mRNA da CrMT (**SEQ ID NO:.61**)

**[183]**. A partir deste resultado, foi possível desenhar um iniciador senso gene-específico complementar aos primeiros 20 nucleotídeos, a partir do códon de início da tradução, para amplificar a região codificante completa e a UTR 3', em um único amplicon por meio da técnica de RACE 3' (**Figura 8C**). Com o objetivo de verificar a existência de variantes polimórficas da CrMT e, possivelmente, isolar variantes com um maior número de domínios de ligação de metais, a amplificação por RACE 3' foi realizada em um total de 10 indivíduos. Ostras de duas populações foram analisadas, unicamente com o objetivo de aumentar as chances de encontrar novas variantes da MT. Enquanto metade das ostras foi coletada na Baía de Sepetiba (RJ), a outra metade foi coletada no Rio São João (Barra de São João, Casimiro de Abreu, RJ).

**[184]**. As reações de RACE 3' resultaram em amplicons com aproximadamente 400 pb (**Figura 8D**), cujas sequências incluem quadros abertos de leitura (ORFs) de 225-228 pb (**SEQ ID NO 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60**). Somando-se os resultados do RACE 5' e 3' foi possível determinar a sequência e organização do transcrito da CrMT, incluindo suas UTR's 3' e 5'. Entre os 10 indivíduos sequenciados, foram identificadas oito sequências codificantes distintas (ORFs), quatro em cada local de coleta. O alinhamento destas oito ORFs (**Figura 9**) evidenciou a existência de 85 posições polimórficas (variáveis), além de 12 posições com eventos de inserção/deleção ("*indels*") na região codificante da CrMT.

**[185]**. O número de substituições não sinônimas, das quais resultam alterações na sequência de aminoácidos da proteína, também foi consideravelmente alto. A tradução predita das ORFs identificadas resultou em um conjunto de sete variantes proteicas (**SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 10**), três derivadas das ostras do Rio São João e quatro, da Baía de Sepetiba. O alinhamento destas sete sequências de aminoácidos evidenciou a ocorrência de 30 posições variáveis e/ou com *gaps* (**Figura 10**). Entre elas, duas variantes (BSJ5 e Sp2) se

mostraram mais curtas, com 74 aminoácidos, ao invés de 75, como nos demais indivíduos. Para fins de comparação, as metalotioneínas canônicas de ostras do gênero *Crassostrea* depositadas no GenBank possuem entre 74 e 87 aminoácidos.

**[186].** O alto número de posições variáveis observado entre as sequências de MT identificadas em *C. rhizophorae* é compatível com os relatos de que bivalves estão entre as espécies animais com as maiores taxas de polimorfismos já observadas (Harrang *et al.*, 2013; Tanguy *et al.*, 2008). No entanto, até o momento, a ocorrência de polimorfismos especificamente em metalotioneínas destes animais foi investigada em poucos trabalhos. Tanguy *et al.*, 2002 analisaram a ocorrência de polimorfismos nos éxons 2 e 3 da CgMT1 em mais de 800 ostras individuais (*C. gigas*) através da técnica de PCR-SSCP (“*Single-strand conformation polymorphism*”) e identificaram um total de oito padrões polimórficos. Através do sequenciamento de indivíduos representativos de cada padrão polimórfico, foi identificado um total de 19 posições variáveis. Através da mesma metodologia, David *et al.* (2012) identificaram quatro padrões polimórficos para o éxon 2 da MT4 de *C. gigas*, mas não especificaram o total de posições polimórficas observado no estudo.

**[187].** Embora os resultados não sejam comparáveis devido às diferentes metodologias empregadas e números de indivíduos analisados, a metalotioneína de *C. rhizophorae* parece ter uma densidade de polimorfismos muito maior quando comparada a MT1 e a MT4 de *C. gigas*, com 85 posições polimórficas e oito sequências nucleotídicas distintas identificadas através do sequenciamento de apenas 10 indivíduos de *C. rhizophorae*. No entanto, a possibilidade de que múltiplos genes de MTs existam no genoma de *C. rhizophorae*, de forma semelhante a *C. gigas*, por exemplo, deve ser levada em consideração. Desta forma, é possível que as variantes de CrMT observadas aqui não sejam resultantes de um mesmo *locus* gênico, ou seja, podem não representar polimorfismos de um mesmo gene, mas serem derivadas de genes

parálagos, o que poderia explicar o alto número de posições variáveis observado.

**[188].** Em todo caso, nas variantes de CrMT identificadas, foram observadas somente variações pontuais e todas apresentaram a organização de domínios canônica para o gênero *Crassostrea*, ou seja, um domínio  $\alpha$  (N-terminal) e um domínio  $\beta$  (C-terminal), invertidos em relação às metalotioneínas de outros grupos taxonômicos. Buscas por similaridade contra o banco de dados não redundante de proteínas (NCBI) usando o algoritmo BLASTp mostraram que das sete variantes de CrMT, seis apresentaram maior identidade, entre 86 e 97%, com a MT-IA de *C. virginica*, enquanto uma variante (CrMTBSJ5) apresentou maior identidade (79%) com a metalotioneína do mexilhão *Hyriopsis cumingii*. A MT-IA de *C. virginica* apresenta a organização canônica de metalotioneínas e um total de 75 aminoácidos, dos quais 21 (28%) são resíduos de cisteína que coordenam a ligação de um total de sete íons de metais divalentes (Jenny *et al.*, 2004; Roesijadi *et al.*, 1989). Os resultados detalhados de BLAST de cada uma das sequências, incluindo valor *e*, porcentagem de identidade e descrição do melhor *hit*, estão descritos na Figura 30.

**[189].** As variantes identificadas para CrMT foram também alinhadas com todas as sequências proteicas completas de MTs canônicas do gênero *Crassostrea* (**Figura 11**). Apenas 22 resíduos (29%) são conservados em todas as sequências, dos quais 16 são cisteínas, o que é compatível com o papel central exercido por este aminoácido na função de ligação de metais, indicando também uma menor conservação dos demais resíduos que compõem as metalotioneínas nestas ostras. Além das cisteínas, no entanto, o curto conector (“*linker*”, de sequência “K-V-K”) que separa os dois domínios também é bastante conservado e apenas duas sequências de *C. gigas* diferem deste motivo, em um aminoácido cada.

**[190].** Como é característico de metalotioneínas, todas as sete variantes de CrMT não apresentam aminoácidos aromáticos (histidina, triptofano, tirosina e fenilalanina) e têm alto teor de cisteína (26-28%), além de lisina (12-14%) e

serina (8-9.5%). Além disso, as CrMTs apresentam alto teor de glicina (14-17%), em contraste com as MTs de mamíferos, e de forma semelhante às de mexilhões (Vergani *et al.*, 2005). Os resíduos de lisina e de serina das metalotioneínas parecem ser particularmente importantes para a estabilidade dos complexos metal-tiolato (Emoto *et al.*, 1996). Em particular, as lisinas estão, em sua maioria, justapostas às cisteínas, formando unidades “C-K” ou “K-C”, onde a sua carga positiva, possivelmente, ajuda a estabilizar os complexos metal-tiolato vizinhos, como sugerido por Cody e Huang, (1994) e Pan *et al.*, (1994).

**[191].** No entanto, os resíduos de cisteína são os mais críticos para a função de ligação de metais das MTs. Embora outros aminoácidos, como glutamato e ácido glutâmico e metionina, também se liguem a metais, em metalotioneínas são as cisteínas que majoritariamente coordenam este tipo de ligação através do seu grupamento tiol (-SH). As únicas exceções conhecidas são algumas MTs de cianobactérias (por exemplo *Synechococcus*PCC 7942, **Figura 4**) que coordenam a ligação de íons metálicos através de resíduos de histidina e cisteína (Blindauer e Leszczyszyn, 2010; Blindauer, 2008). Desta forma, a substituição de uma cisteína por qualquer outro aminoácido, exceto histidina, pode alterar significativamente as propriedades de ligação de metais destas proteínas (Romeyer *et al.*, 1990, Cismowski *et al.*, 1991).

**[192].** Neste sentido, duas variantes, CrMTBSJ1 (**SEQ ID NO 5**) e CrMTBSJ5 (**SEQ ID NO: 7**), apresentaram apenas 20 cisteínas em suas sequências primárias, uma cisteína a menos que as demais variantes. Em ambos os casos, uma cisteína, C55 e C38, respectivamente, foi trocada por uma arginina. Esta é uma substituição não conservativa e não foi observada em nenhuma das outras MTs canônicas de ostras do gênero *Crassostrea spp* (**Figura 11**). Portanto, as substituições C55R e C38R podem potencialmente afetar negativamente as habilidades das variantes BSJ1 e BSJ5, respectivamente, ligarem íons metálicos.

**[193].** As cinco variantes de CrMT remanescentes apresentaram todas as 21 cisteínas conservadas, caracteristicamente organizadas em nove motivos C-X-

C, cinco no domínio  $\alpha$  e quatro, no domínio  $\beta$ . Esta mesma organização é observada em todas as MTs canônicas de ostras do gênero *Crassostrea*, exceto nas MTs do tipo IV que tipicamente também apresentam motivos C-X-C-C e C-C-C. Além de ostras, a MT-10 do mexilhão *M. galloprovincialis* também possui nove motivos C-X-C, no entanto, os seus domínios  $\alpha$  e  $\beta$  estão organizados de forma semelhante às MTs de mamíferos e de forma invertida em relação às MTs de ostras (Vergani *et al.*, 2005).

**[194].** Sequenciamento e anotação da estrutura éxon-íntron do gene CrMT.

**[195].** A sequencia genômica e a organização éxon-íntron da CrMT (**SEQ ID NO: 50**) foram determinadas com o objetivo de completar a sua caracterização e verificar também a conservação da sua estrutura genômica. Para isso, o gene CrMT foi amplificado a partir do DNA genômico isolado do indivíduo Sp4. Um amplicom com 800-900 pb (**Figura 12A**) foi obtido por PCR com iniciadores que amplificam a CrMT desde o seu códon de início até o seu códon de parada da tradução. A sequencia genômica resultante (879 pb), alinhada com a de cDNA, determinada para o mesmo indivíduo, permitiu identificar a estrutura éxon-íntron do gene CrMT e confirmar a sua sequencia codificante, uma vez que as regiões exônicas codificantes do gene apresentaram 100% de identidade com a sequencia de cDNA (**Figura 12B**).

**[196].** Como ilustrado na **Figura 13A**, o gene CrMT é composto por três éxons codificantes (28, 123 e 77 pb) e dois íntrons (175 e 476 pb). Ambos os íntrons tem fase 1, ou seja, se inserem após a primeira base de um códon, e estão flanqueados pelos sítios canônicos de processamento do RNA “GT” (5’) e “AG” (3’). Esta organização genômica tripartida é bastante conservada em genes de MTs de deuterostomados, incluindo mamíferos, peixes, aves e outros bivalves (Fernando e Andrews, 1989; Ceratto *et al.*, 2002; Klaassen *et al.*, 1999; Zafarullah & Gedamu, 1988). No entanto, em *C. rizhophorae* e em todas as sequencias genômicas de MT de ostras do gênero *Crassostrea* já descritas, o domínio  $\alpha$  é codificado pelos éxons 1 e 2 e o domínio  $\beta$ , pelos éxons 2 e 3 (**Figura 13A**), diferentemente dos demais deuterostomados, onde o domínio  $\beta$  é codificado pelos éxons 1 e 2 e o  $\alpha$ , pelo éxon 3. Portanto, não só a sequencia

primária da CrMT como a sua organização genômica são conservadas em relação às demais metalotioneínas canônicas conhecidas em ostras *Crassostrea spp*, as quais estão organizadas em três éxons codificantes e dois íntrons, com comprimentos variáveis (**Figura 13B**).

**[197].** Construção de genes sintéticos de metalotioneínas multidomínio.

**[198].** A estratégia utilizada para identificar variantes da CrMT não resultou no isolamento de MTs multidomínio em *C. rhizophorae*, o que não significa que tais genes não existam no genoma desta ostra, uma vez que a busca realizada neste trabalho não foi exaustiva. No entanto, como nosso interesse nestes genes reside na sua potencial aplicação biotecnológica, ao invés de investir em outras estratégias de prospecção, genes sintéticos de metalotioneínas multidomínio foram construídos com múltiplas cópias dos domínios de ligação de metal identificados na CrMT canônica. Para isso, a sequência CrMT.Sp5, representada pela **SEQ ID NO: 4**, foi utilizada como base para o desenho e a construção das metalotioneínas multidomínio. Esta variante apresentou a maior conservação (97% de identidade) em relação a MT-IA de *C. virginica*, incluindo todas as 21 cisteínas conservadas necessárias para a ligação de um total de sete íons de metais por molécula.

**[199].** Diante das potenciais diferenças entre os domínios  $\alpha$  e  $\beta$  quanto ao número e tipo de íons de metais preferencialmente por eles ligados, optamos por construir dois tipos de metalotioneínas sintéticas: (1) com cópias *in tandem* da CrMT.Sp5 (**SEQ ID NO: 4**) completa, portanto, com ambos os domínios  $\alpha$  e  $\beta$  e (2) com cópias *in tandem* apenas do domínio  $\alpha$  da CrMT.Sp5. No total, foram construídos três genes sintéticos, a CrMT $\alpha$ 2 (**SEQ ID NO: 64**) e a CrMT $\alpha$ 8 (**SEQ ID NO: 63**) com duas e oito cópias do domínio  $\alpha$ , respectivamente, e a CrMT $\alpha\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 62**), com quatro cópias da CrMT.

**[200].** Nestes três genes sintéticos, as múltiplas cópias dos domínios foram intercaladas pelo conector de três aminoácidos (“K-V-K”), idêntico ao da CrMT selvagem, como esquematizado na **Figura 14**. Estudos realizados com MTs mutantes, geradas por mutação sítio dirigida, indicaram que alterações no comprimento e na composição de aminoácidos do conector da MT afetam a

ligação de metais (Xiong *et al.*, 1999). Além disso, as metalotioneínas multidomínio conhecidas na natureza, como as da família CvMTII de *C. virginica*, tem todos os seus domínios separados por conectores. Portanto, a separação dos domínios de ligação de metais, sejam eles  $\alpha$  e/ou  $\beta$ , por um curto conector parece ser importante para o correto funcionamento da proteína. Por isso, todos as cópias dos domínios  $\alpha$  e/ou  $\beta$  dos genes sintéticos construídos foram intercaladas por um conector.

**[201].** Em um primeiro momento, foi desenvolvida uma estratégia *in vitro*, ilustrada e descrita na **Figura 15**, para construir o gene sintético CrMT $\alpha$ 2 (**SEQ ID NO: 64**). Os resultados da principais etapas da construção da CrMT $\alpha$ 2 por esta estratégia estão descritos na **Figura 16**. A primeira etapa consistiu na amplificação paralela de duas versões do domínio  $\alpha$ : (1) com sítio de restrição *HindIII* na extremidade 5' e (2) com sítio de restrição *HindIII* em sua extremidade 3'. Para isso, foram realizadas duas PCRs independentes: uma reação (1) onde somente o iniciador anti senso é ancorado com o sítio *HindIII* e outra (2) onde somente o iniciador senso é ancorado com este mesmo sítio de restrição, como ilustrado na Etapa I da **Figura 15** e **Figura 16A**.

**[202].** Na etapa II da **Figura 15**, os amplicons purificados foram digeridos com a enzima *HindIII*, em duas reações independentes. Após esta digestão, os amplicons #1 e #2, agora com terminações coesivas e complementares em suas extremidades 5' e 3', respectivamente, foram submetidos a uma nova etapa de purificação. Em seguida, na etapa III, estes dois fragmentos foram unidos em uma reação de ligação de DNA (coesiva). Para isolar a construção de interesse ( $\alpha$ -*HindIII*- $\alpha$ ), o produto desta reação de ligação foi usado como molde para amplificação da mesma, com iniciadores ancorados com sítios de restrição (*BamHI* e *Sall*) para a sua posterior clonagem no plasmídeo pGEX-6P-1.

**[203].** Estas duas etapas, a ligação dos dois domínios  $\alpha$  e a amplificação da construção por PCR, foram as mais críticas neste processo. Embora a ligação dos dois domínios  $\alpha$  através das suas extremidades coesivas e, portanto, na organização de interesse, seja a mais provável, outras possibilidades de

ligação não coesiva existiam. Além disso, por se tratar de uma construção com duas cópias idênticas do domínio  $\alpha$ , cada iniciador utilizado na etapa de PCR tinha duas possibilidades de anelamento. Como resultado, o produto da reação de amplificação obtido (**Figura 16B**) foi bastante complexo e apresentou múltiplos amplicons: uma banda intensa com tamanho referente a uma única cópia do domínio  $\alpha$  ( $< 0,25$  Kb), uma banda também intensa com o tamanho compatível com a construção de interesse ( $\sim 272$  pb) e ainda algumas bandas maiores e menos intensas. A banda com tamanho compatível foi, portanto, isolada a partir do gel de agarose e clonada nos sítios de restrição *Bam*HI-*Sall* do plasmídeo pGEX-6P-1.

**[204]**. A última etapa (VI) consistiu na substituição do sítio *Hind*III, que nesta primeira da versão da CrMT $\alpha$ 2 separa os dois domínios  $\alpha$ , pela sequência correta do conector que separa os domínios  $\alpha$  e  $\beta$  da CrMT. Para isso, o plasmídeo foi linearizado por *Hind*III e amplificado por PCR com um par de iniciadores cujas extremidades 5' foram desenhadas para modificar (mutagênese) o sítio *Hind*III (AAGCTT) dando origem a sequência do conector correto (AAGGTGAAG). O amplicom resultante (**Figura 16C**) foi recircularizado e transformado em *E. coli*.

**[205]**. Para pré-selecionar os clones que potencialmente apresentavam a sequência conectora correta, alíquotas de DNA plasmidial de diferentes colônias foram digeridas com a enzima *Hind*III. Os clones linearizados por esta enzima foram descartados, uma vez que este sítio de restrição teria sido eliminado nos clones onde a mutagênese houvesse funcionado com sucesso. Para confirmação da construção final, um clone resistente a digestão por *Hind*III foi sequenciado com iniciadores plasmídeo-específicos. O mapa do plasmídeo recombinante final, pGEX-6P-1-CrMT $\alpha$ 2 está descrito na **Figura 16D** e a sequência e a tradução predita da CrMT $\alpha$ 2 estão descritas na listagem de sequências.

**[206]**. Embora esta estratégia tenha funcionado com sucesso para a construção do gene CrMT $\alpha$ 2, ela não seria viável para, através de duplicações sequenciais, construir genes sintéticos com números maiores de cópias dos

domínios  $\alpha$  e/ou  $\beta$ . Além de ser um procedimento longo e trabalhoso, com o número crescente de cópias de domínios adicionados, cresceriam também as possibilidades de anelamento dos iniciadores utilizados na etapa de PCR. Conseqüentemente, a cada etapa de duplicação, seria mais difícil amplificar e isolar a construção de interesse.

[207]. Diante disso, os genes sintéticos CrMT $\alpha\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 01**) e CrMT $\alpha$ 8 (**SEQ ID NO: 63**) foram obtidos por síntese de DNA *de novo*, tecnologia que não requer DNA molde e que permite a síntese virtualmente de qualquer sequência nucleotídica (Kosuri e Church, 2014). Desta forma, as sequências destes dois genes sintéticos foram desenhadas *in silico* de forma a conter em suas extremidades regiões adaptadoras contendo sítios de restrição (*Sbf*I e *Apa*LI) para a sua posterior subclonagem direcional em um plasmídeo de expressão para *C. metallidurans*.

[208]. Assim como a CrMT $\alpha$ 2 (**SEQ ID NO: 64**), clonada em pGEX-6P-1 durante o seu processo de construção, os demais genes (CrMT.Sp5 (**SEQ ID NO: 4**), CrMT $\alpha\beta$ 4 e CrMT $\alpha$ 8) também foram subclonados no plasmídeo de expressão pGEX-6P-1. Neste vetor, as quatro metalotioneínas poderão ser expressas em *E. coli*, em fusão com a proteína Glutathione-S-transferase (GST), e purificadas por cromatografia de afinidade por glutathione. Este mesmo sistema de expressão e purificação foi usado de forma eficiente em outros trabalhos para obter as MTs purificadas de invertebrados como mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) e peixes (*Oncorhynchus mykiss*) (Buico *et al.*, 2008; Vergani *et al.*, 2005; Vergani *et al.*, 2003), justificando a sua escolha também neste trabalho.

[209]. A subclonagem do gene CrMT.Sp5 em pGEX-6P-1 foi realizada de forma convencional, onde este gene foi amplificado por PCR com a concomitante adição dos sítios de restrição *Bam*HI (5') e *Sal*I (3') às suas extremidades (**Figura 17A**) sendo, em seguida, clonado na fase de leitura correta nos sítios *Bam*HI-*Sal*I deste plasmídeo, gerando o plasmídeo recombinante (**Figura 17C**), cujo o inserto CrMT foi inicialmente detectado por PCR (**Figura 17B**) e posteriormente confirmado por sequenciamento.

**[210]**. No entanto, a subclonagem dos genes sintéticos CrMT $\alpha\beta$ 4 e CrMT $\alpha$ 8 poderia ser complicada pelas múltiplas repetições e, portanto, múltiplas possibilidades de anelamento para os iniciadores utilizados na etapa de amplificação por PCR. Para contornar este problema, foram desenhados iniciadores longos (28-29 pb) com apenas uma pequena região (5 pb) das suas extremidades 5' complementares ao início (iniciador senso) ou ao fim (iniciador antisenso) da MT multidomínio em questão, sendo a maior extensão dos iniciadores complementar às sequências flanqueadoras dos genes sintéticos. Além disso, estes iniciadores foram desenhados de forma a introduzir as modificações necessárias (inserções, deleções e substituições) nas primeiras bases das sequências flanqueadoras para criar um sítio *Bam*HI (CrMT $\alpha\beta$ 4) ou *Eco*RI (CrMT $\alpha$ 8) na extremidade 5' do respectivo gene sintético e ainda um códon de parada da tradução e um sítio *Sal*I à extremidade 3' destes genes. Estes iniciadores, somados a uma elevada temperatura de anelamento, permitiram a amplificação específica das construções CrMT $\alpha\beta$ 4 e CrMT $\alpha$ 8 a partir dos plasmídios de origem, pJ364 (Figura 28), como observado nas **figuras 18A e 19A**. Estas duas construções foram, então, clonadas na fase de leitura correta nos sítios *Bam*HI-*Sal*I (CrMT $\alpha\beta$ 4) ou *Eco*RI-*Sal*I (CrMT $\alpha$ 8) do sítio múltiplo de clonagem do plasmídio pGEX-6P-1 (**figuras 18B e 19B**). A detecção dos insertos por PCR (**figuras 18C e 19C**) e posterior sequenciamento confirmaram a correta clonagem destes dois genes em pGEX-6P-1.

**[211]**. A obtenção destas construções em pGEX-6P-1 é um pré-requisito essencial para que, em etapas futuras, as propriedades de ligação de metais, como o conteúdo de metal, a afinidade por diferentes metais e ainda a estabilidade térmica dos complexos metal-tiolato e a cinética de liberação de metal destas proteínas recombinantes sejam determinadas através de ensaios *in vitro*, realizados com as proteínas recombinantes purificadas, assim como descrito na literatura para outras metalotioneínas (Buico *et al.*, 2008; Vergani *et al.*, 2005; Vergani *et al.*, 2003).

[212]. Com isso, será possível comparar a CrMT com outras metalotioneínas já descritas, além de conduzir análises comparativas experimentais entre as propriedades de ligação de metais das proteínas com domínios  $\alpha\beta$  e aquelas somente com domínios  $\alpha$ . Neste sentido, o gene sintético CrMT $\alpha$ 2 foi construído de forma a ser comparável (em número de domínios) com o gene selvagem CrMTSp5, enquanto que os dois genes sintéticos maiores são também comparáveis entre si, contendo, cada um, oito domínios de ligação de metais.

[213]. As metalotioneínas sintéticas construídas neste trabalho potencialmente apresentam capacidades de ligação de metais distintas entre si e maiores que a CrMT.Sp5 selvagem (**Tabela 5**) e que qualquer metalotioneína natural já descrita. A CrMT $\alpha$ 2 corresponde, em sua organização de domínios, à CvMTII-C de *C. virginica*. No entanto, a CrMT $\alpha$ 8 não corresponde a nenhuma proteína já observada na natureza, uma vez que as CvMTII-G e CvMTI-IH são as proteínas com o maior número de domínios  $\alpha$  já descritas, com quatro cópias deste domínio, cada (Jenny *et al.*, 2004). Da mesma forma, ainda não foi descrita uma metalotioneína cujos ambos os domínios sejam repetidos *in tandem*, de forma semelhante ao gene sintético CrMT $\alpha\beta$ 4.

[214]. Os dois tipos de metalotioneínas,  $\alpha\beta$  (CrMT e CrMT $\alpha\beta$ 4) e  $\alpha$  (CrMT $\alpha$ 2 e CrMT $\alpha$ 8), também devem se diferenciar quanto as suas afinidades por diferentes metais, uma vez que, o domínio  $\alpha$  de MTs tem grande preferência por metais divalentes (principalmente, cádmio), enquanto o  $\beta$  tem maior afinidade por metais monovalentes (principalmente, cobre). Portanto, biossorbentes baseados nestes dois tipos de MTs sintéticas potencialmente irão apresentar uma maior afinidade por metais distintos, o que pode ter aplicações importantes em situações onde o objetivo seja a remediação e/ou recuperação de metais pesados específicos. No entanto, como as MTs, em geral, se ligam ainda a uma grande diversidade de metais, com afinidades diferentes, a possibilidade de imobilização de outros metais por estas proteínas também existe.

**[215]. Tabela 5** – Descrição das principais propriedades previstas das proteínas codificadas pela CrMT e pelos genes sintéticos CrMT $\alpha\beta$ 4, CrMT $\alpha$ 2 e CrMT $\alpha$ 8.

	Número de aminoácidos	Organização dos domínios	Número de Cisteínas	Nº de íons metálicos divalentes ligantes (predito)*	Massa Molecular (KDa) **
CrMT	75	$\alpha\beta$	21	7	7,40
CrMT $\alpha\beta$ 4	309	$(\alpha\beta)$ 4	84	28	30,61
CrMT $\alpha$ 2	85	$(\alpha)$ 2	24	8	8,39
CrMT $\alpha$ 8	349	$(\alpha)$ 8	96	32	34,58

\*Foi considerado que a CrMT liga-se a sete íons divalentes (quatro em seu domínio  $\alpha$  e três, no  $\beta$ ), da mesma forma que a CvMTI-A, proteína com a qual apresenta 97% de identidade. Para os genes sintéticos, o número de íons divalentes ligantes foi predito multiplicando-se o número de íons ligantes em cada tipo de domínio pelo número de cópias presentes no gene sintético.

\*\*Massa molecular teórica calculada com a ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)

**[216].** Os genes sintéticos CrMT $\alpha\beta$ 4 e CrMT $\alpha$ 8 também se destacam em relação aos poucos trabalhos onde MTs multidomínio sintéticas foram construídas e expressas em diferentes microrganismos com o objetivo de incrementar o acúmulo de metais pelos mesmos. Apenas três trabalhos deste tipo são do nosso conhecimento. Mauro e Pazirandeh (2000) expressaram, no periplasma de *E. coli*, construções com 1, 2, 3, 6, 9 e 12 cópias da metalotioneína de *N. crassa*, uma proteína pequena, com apenas 25 aminoácidos e sete cisteínas, e, portanto, uma menor capacidade de ligação de metais em comparação com as metalotioneínas de ostras que contam com um maior número de cisteínas. Neste trabalho, o melhor resultado obtido consistiu em um aumento significativo (65X) no acúmulo de cádmio observado na linhagem com nove cópias da MT. Em 2006, Kuroda e Ueda expressaram MTs sintéticas contendo entre duas e oito cópias da MT de *S. cerevisiae* (YMT) na superfície celular desta levedura, cujo monômero se liga a quatro íons de cádmio, o que resultou em um aumento significativo da tolerância desta levedura a este metal. Por fim, mais recentemente, He *et al.* (2012) expressaram uma MT sintética com quatro cópias *in tandem* do domínio  $\alpha$  da MT de macaco na superfície celular de *P. putida*. Interessantemente, a linhagem resultante, expressando uma MT

composta exclusivamente por domínios  $\alpha$ , porém em menor número que a CrMT $\alpha$ 8, apresentou alta afinidade por cádmio e foi capaz de remover este metal da solução de forma seletiva mesmo na presença de altas concentrações de cobre e zinco (10 mg/L).

[217]. Apesar de consistirem na expressão de MTs com menor ou igual capacidade de ligação de metais que os genes sintéticos construídos aqui, estes trabalhos indicam que a expressão de metalotioneínas multidomínio sintéticas, maiores que as metalotioneínas naturais, são viáveis, ou seja, podem ser expressas de forma heteróloga em diferentes organismos hospedeiros e são funcionais, pois resultam em um maior acúmulo e/ou resistência a metais pesados pelo organismo hospedeiro, sustentando, portanto, a estratégia de multiplicação dos domínios de ligação da CrMT utilizada neste trabalho.

[218]. A tabela 6 ilustra todos os plasmídios construídos para a presente invenção

[219]. Tabela 6 - Lista de plasmídios construídos neste trabalho.

Nome	Descrição	Resistência a antibiótico	Referência
pGEM-T-CrMTSp1	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídio pGEM-T (indivíduo Sp1)	Ampicilina	Este trabalho
pGEM-T-CrMTSp2	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídio pGEM-T (indivíduo Sp2)	Ampicilina	Este trabalho
pGEM-T-CrMTSp3	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídio pGEM-T (indivíduo Sp3)	Ampicilina	Este trabalho
pGEM-T-CrMTSp4	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídio pGEM-T (indivíduo Sp4)	Ampicilina	Este trabalho
pGEM-T-CrMTSp5	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídio pGEM-T (indivíduo Sp5)	Ampicilina	Este trabalho
pGEM-T-CrMTBSJ1	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídio pGEM-T (indivíduo BSJ1)	Ampicilina	Este trabalho
pGEM-T-CrMTBSJ2	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídio pGEM-T (indivíduo BSJ2)	Ampicilina	Este trabalho
pGEM-T-	Produto do RACE 3' da MT selvagem de	Ampicilina	Este trabalho

<b>CrMTBSJ3</b>	<i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídeo pGEM-T (indivíduo BSJ3)		
<b>pGEM-T-CrMTBSJ4</b>	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídeo pGEM-T (indivíduo BSJ4)	Ampicilina	Este trabalho
<b>pGEM-T-CrMTBSJ5</b>	Produto do RACE 3' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídeo pGEM-T (indivíduo BSJ5)	Ampicilina	Este trabalho
<b>pGEM-T-CrMTBSJ6.5'</b>	Produto do RACE 5' da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> clonada no plasmídeo pGEM-T (indivíduo BSJ6)	Ampicilina	Este trabalho
<b>pJ364-CrMT<math>\alpha</math>8</b>	Gene sintético CrMT $\alpha$ 8 clonado no plasmídeo pJ364.	Ampicilina	Este trabalho/DNA2.0
<b>pJ364-CrMT<math>\alpha</math><math>\beta</math>4</b>	Gene sintético CrMT $\alpha$ $\beta$ 4 clonado no plasmídeo pJ364.	Ampicilina	Este trabalho/DNA2.0
<b>pJ364-SD</b>	Cassete SD clonado no plasmídeo pJ364.	Ampicilina	Este trabalho/DNA2.0
<b>pGEX6P1-CrMTSp5</b>	Sequencia codificante completa da MT selvagem de <i>Crassostrea rhizophorae</i> (indivíduo Sp5) clonada no plasmídeo pGEX-6P-1 (BamHI/Sall)	Ampicilina	Este trabalho
<b>pGEX6P1-CrMT<math>\alpha</math>2</b>	Gene sintético CrMT $\alpha$ 2 clonado em pGEX-6P-1 (BamHI/Sall)	Ampicilina	Este trabalho
<b>pGEX6P1-CrMT<math>\alpha</math><math>\beta</math>4</b>	Gene sintético CrMT $\alpha$ $\beta$ 4 clonado em pGEX-6P-1 (BamHI/Sall)	Ampicilina	Este trabalho
<b>pGEX6P1-CrMT<math>\alpha</math>8</b>	Gene sintético CrMT $\alpha$ 8 clonado em pGEX-6P-1 (EcoRI/Sall)	Ampicilina	Este trabalho
<b>pBBR1-SD</b>	Cassete SD clonado no plasmídeo pBBR1MCS.	Cloranfenicol	Este trabalho
<b>pBR1SD-CrMT<math>\alpha</math><math>\beta</math>4</b>	Gene sintético CrMT $\alpha$ $\beta$ 4 clonado no plasmídeo pBBR1-SD.	Cloranfenicol	Este trabalho

[220]. Expressão heteróloga na membrana externa de *C. metallidurans*.

[221]. Construção do plasmídeo pBBR1-SD.

[222]. O maior potencial biotecnológico das MTs multidomínio reside na sua expressão na superfície celular de um microrganismo metabolicamente versátil e resistente a metais, como *C. metallidurans*. Para viabilizar a expressão das MTs sintéticas neste microrganismo, um plasmídeo, denominado pBBR1-SD, foi construído para expressá-las na superfície celular de *C. metallidurans*, através do sistema de autotransporte baseado na fusão da proteína de interesse com o domínio autotransportador da protease IgA de *N. gonorrhoeae*. Além de ser um sistema já validado em *C. metallidurans* (Biondo *et al.*, 2012, Valls *et al.*, 2000a) o domínio  $\beta$  da protease IgA de *N. gonorrhoeae* tem capacidade para translocar e ancorar proteínas de grandes dimensões, uma vez que a protease

IgA, originalmente translocada e ancorada através deste sistema, possui 106 KDa (Veiga *et al.*, 2004). Esta é uma característica muito importante para a expressão de MTs multidomínio que podem ter alto peso molecular. Por exemplo, Mauro e Pazirandeh (2000) observaram um efeito platô no acúmulo de cádmio pelas linhagens de *E. coli* com construções com seis ou mais cópias da MT de *N. crassa*. Este efeito muito provavelmente foi resultado de uma ineficiência do sistema de transporte (fusão com MalE – proteína periplasmática ligante de maltose) em exportar as proteínas com seis ou mais cópias de MT para o periplasma de *E. coli*, indicando que o sistema de transporte utilizado pode ser um fator limitante para a correta localização celular de MTs multidomínio longas. Como a MT sintética com a maior massa molecular (CrMT $\alpha$ 8) apresenta ~35 KDa (**Tabela 5**), o tamanho das CrMTs sintéticas não deve ser uma limitação para a sua ancoragem através do sistema de autotransporte da protease IgA.

**[223]**. O primeiro passo para a construção do plasmídio pBBR1-SD consistiu no desenho *in silico* e síntese *de novo* de um cassete de expressão e ancoragem na superfície celular, denominado cassete SD (“*surface display*”, (**SEQ ID NO: 8**). Conforme descrito na **Figura 20**, o cassete SD é constituído pelos seguintes elementos:

**[224]**. O promotor do gene *mrgA* de *Bacillus subtilis*(GI:852080).

**[225]**. Este promotor, originalmente descrito por Chen *et al.* (1993), foi escolhido para controlar a expressão da construção, uma vez que, mais recentemente, foi demonstrado que o mesmo, quando expresso heterologicamente em *C. metallidurans*, apresenta altos níveis de expressão basal, além de ter sua expressão aumentada por metais como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2010). A sequência utilizada foi a depositada por Chen e colaboradores no banco de dados GenBank com o código identificador GI:852080.

**[226]**. Uma ORF contendo a sequência codificante de diferentes elementos da proteína de fusão:

**[227]**. Peptídeo sinal *pelB* (N-terminal)

[228]. Sequencia do peptídeo sinal do gene *pelB* e *Erwinia carotovora* (GI:148457) que direciona a proteína recém sintetizada para o espaço periplasmático (Lei *et al.*, 1987).

[229]. Sítio múltiplo de clonagem (SMC)

[230]. Os sítios de restrição para as enzimas *SbfI* e *ApaI* foram adicionados para a clonagem do gene de interesse entre o peptídeo sinal e o e-tag. Entre eles, ainda foram adicionados outros sítios de restrição únicos alternativos, formando um sítio múltiplo de clonagem (SMC).

[231]. E-tag

[232]. Sequencia do epítipo e-tag, para imunodeteccção da proteína recombinante em etapas subsequentes.

[233]. Domínio  $\beta$  da protease IgA de *N. gonorrhoeae* (C-terminal)(GI:44868)

[234]. Domínio autotransportador, tem como função transportar e ancorar a proteína de fusão na superfície externa da membrana bacteriana.

[235]. Desta forma, qualquer gene de interesse inserido, na fase de leitura correta, no sítio de clonagem deste cassete será expresso como uma proteína fusionada ao peptídeo sinal, ao epítipo e-tag e ao domínio IgA $\beta$ , que irá ancorar a proteína de interesse na superfície da célula. A sequencia do cassete SD(**SEQ ID NO: 65**), foi sintetizada e clonada no plasmídio pJ364 (**Figura 20A**).

[236]. Para a replicação e expressão deste cassete em *C. metallidurans*, o mesmo foi subclonado em pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994), um plasmídio de amplo espectro para bactérias gram negativas. A replicação estável de pBBR1MCS e plasmídios derivados já foi demonstrada em *C. metallidurans* (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2011; Sichert *et al.*, 2011). A estratégia inicial de clonagem do cassete SD em pBBR1MCS consistiu em subcloná-lo nos sítios *XbaI*-*SacII* deste plasmídio, o que foi feito em um primeiro momento. No entanto, a expressão do cassete SD a partir deste primeiro plasmídio recombinante não pôde ser detectada por RT-PCR, embora a expressão do gene de resistência a cloranfenicol, presente no plasmídio pBBR1MCS, e do

RNA ribossomal 16S de *C. metallidurans*, utilizados como controles positivos, tenham sido detectadas com sucesso (dados não mostrados).

**[237].** Como, neste primeiro plasmídio recombinante, o cassete SD foi clonado na mesma orientação do promotor *lac* de pBBR1MCS (Figura 25), localizado a montante em relação ao promotor *mrgA*, consideramos a hipótese de que a expressão a partir do promotor *lac* poderia ter interferido com a expressão do promotor *mrgA*. De fato, com a clonagem do cassete SD, uma ORF, que inclui parte do promotor *mrgA*, foi formada e poderia estar sendo expressa sob o controle do promotor *lac*, possivelmente impedindo a atividade do promotor *mrgA*.

**[238].** Para evitar maiores problemas, um novo plasmídio recombinante foi construído, onde o promotor *lac* do plasmídio pBBR1MCS foi deletado, uma vez que não exerceria nenhum papel essencial para o correto funcionamento da construção de interesse. Para isso, o plasmídio pBBR1MCS foi amplificado por PCR de forma a deletar um pequeno segmento contendo o promotor *lac* (**Figura 21A, raia 3**). Em paralelo, o cassete SD foi amplificado por PCR a partir do plasmídio de origem pJ364-SD (**Figura 21A, raia 2**) e o amplicom obtido, ligado ao pBBR1MCS $\Delta$ lac linear em uma ligação não coesiva, originando o plasmídio recombinante final, pBBR1-SD, cujo mapa é mostrado na **Figura 21C**. A presença e orientação do cassete SD no plasmídio recombinante foram inicialmente determinadas por PCR com diferentes combinações de iniciadores e por digestão com enzimas de restrição, como descrito na **Figura 21B**, além de ter sido também confirmada por sequenciamento de DNA.

**[239].** Subclonagem do gene sintético CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 em pBBR1-SD e expressão em *C. metallidurans*.

**[240].** O gene sintético CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 1**), projetado para ligar quatro vezes mais metal que a CrMT selvagem, foi a primeira das MTs sintéticas geradas aqui a ser expressa na superfície celular de *C. metallidurans*, a fim de verificar de imediato a viabilidade de expressão de uma metalotioneína multidomínio neste microorganismo. Para isso, o gene CrMT $\alpha$  $\beta$ 4 foi subclonado

no plasmídio pBBR1-SD, gerando o plasmídio pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (**figura 22E**). Em princípio, esta clonagem, e das demais MTs, seriam realizadas através dos sítios de restrição *Sbf*I e *Apa*LI, presentes no sítio múltiplo de clonagem do cassete SD. No entanto, após inúmeras tentativas, onde diferentes estratégias de otimização, enzimas de restrição e DNA ligases de diferentes fabricantes foram testadas, não foi possível obter clones recombinantes (dados não mostrados).

**[241]**. Por isso, foi utilizada a técnica “Gibson assembly” (Gibson *et al.*, 2009), que dispensa o uso de enzimas de restrição, para a ligação de fragmentos de DNA. Descrita em detalhes na sessão de materiais e métodos, esta técnica exige apenas uma etapa pré-clonagem no preparo dos fragmentos a serem ligados: (1) a adição de sequências flanqueadoras ao inserto (CrMT $\alpha\beta$ 4) homólogas as extremidades do sítio de clonagem no plasmídio de destino (pBBR1-SD) e a (2) linearização deste plasmídio. Estas duas etapas foram realizadas através de PCR, como observado na **Figura 22A**. Pelo menos três bandas são observadas na amplificação da CrMT $\alpha\beta$ 4 devido às múltiplas possibilidades de anelamento dos iniciadores utilizados. Os dois fragmentos, plasmídio e inserto, foram, no entanto, purificados a partir do gel de agarose, o que resultou na obtenção de bandas únicas com os tamanhos correspondentes aos mesmos (**Figura 22B**).

**[242]**. Através da reação de Gibson assembly, o gene sintético CrMT $\alpha\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 62**) foi subclonado, na fase correta de leitura, no plasmídio pBBR1-SD, entre a sequência do peptídeo sinal pelB e do epítipo etag. A construção do plasmídio pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 foi inicialmente confirmada por PCRs realizadas com duas combinações de iniciadores e por digestão com as enzimas de restrição *Xba*I e *Sac*II que excisam o cassete SD deste plasmídio. Em ambos os casos, foram observados fragmentos dentro da faixa de tamanho esperada para o plasmídio recombinante, como detalhado na **Figura 22 C e D**.

**[243]**. Em seguida, células de *C. metallidurans* foram transformadas com o plasmídio pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 para a expressão da proteína de fusão CrMT $\alpha\beta$ 4-IgA $\beta$  na sua superfície celular. Uma linhagem transformante com o

plasmídeo pBBR1-SD também foi gerada e utilizada como controle positivo nas etapas de imunodeteção da proteína de fusão. Primeiramente, a expressão da CrMT $\alpha\beta$ 4-IgA $\beta$  foi demonstrada por western blot (anti etag), onde foram analisados extratos protéicos totais obtidos a partir das duas linhagens transformantes (pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 e pBBR1-SD) e da linhagem selvagem (LMG 1195), utilizada como controle negativo. Neste experimento, o promotor *mrgA*, que controla a expressão da proteína de fusão, não foi pré-induzido e, portanto, foram verificados os níveis basais de expressão destas proteínas nas linhagens transformantes.

[244]. Como observado na **Figura 23**, uma única marcação (>70 KDa) foi observada em *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4, compatível com o peso molecular esperado para a proteína de fusão CrMT $\alpha\beta$ 4-IgA $\beta$  (~79 KDa). Uma marcação com ~50 KDa foi observada no controle positivo (*C. metallidurans*/pBBR1-SD), correspondente a proteína IgA $\beta$ , e nenhuma marcação foi observada na linhagem selvagem (*C. metallidurans*/LMG 1195), o que indica a especificidade do anticorpo utilizado para detectar o epítipo etag adicionado às proteínas de fusão em questão. Estes resultados demonstram que a expressão do cassete SD é funcional em *C. metallidurans*, que a CrMT $\alpha\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 1**) fusionada à IgA $\beta$  é expressa pela linhagem transformante obtida e que, portanto, a expressão de metalotioneínas multidomínio em *C. metallidurans* é viável.

[245]. Vale a pena lembrar que a funcionalidade de tal sistema de ancoragem na membrana externa, via peptídeo sinal pelB e o domínio autotransportador IgA $\beta$ , já foi demonstrada em *C. metallidurans* em duas ocasiões (Biondo *et al.*, 2012; Valls *et al.*, 2000a). Portanto, a linhagem pBBR1-SD, que expressa apenas a proteína de fusão contendo a IgA $\beta$ , é de fato um controle positivo, sendo nosso objetivo aqui apenas verificar a viabilidade deste sistema em ancorar a CrMT $\alpha\beta$ 4(**SEQ ID NO: 1**).

[246]. No entanto, outros experimentos precisarão ser realizados para determinar de forma precisa a localização final da proteína CrMT $\alpha\beta$ 4-IgA $\beta$ . Uma das possibilidades é a utilização de um protocolo para microscopia

imunoeletrônica onde as células são incubadas com o anticorpo antes de serem incluídas em resina, o que é particularmente indicado para antígenos localizados na superfície celular (Oliver, 2010;Bozzola & Russel, 1999). Isso diminuiria significativamente o número de incubações e lavagens aos quais os cortes ultrafinos seriam expostos e, portanto, reduziria também as chances de danificá-los neste processo. Alternativamente, a localização da CrMT $\alpha\beta$ 4-IgA $\beta$  poderá ser determinada por western blot anti etag, técnica já padronizada neste trabalho, em frações de proteínas (1) solúveis, (2) da membrana interna e (3) externa, separadas por ultracentrifugação (Valls *et al.*, 2000a,b).

[247]. *C. metallidurans* tem grande potencial biotecnológico devido à sua grande versatilidade metabólica e resistência a metais pesados e a outras condições adversas, o que a torna especialmente apta para aplicações em efluentes altamente contaminados por estes elementos. No entanto, a sua manipulação por engenharia genética ainda é pouco explorada. A expressão heteróloga de peptídeos e proteínas ligantes de metal em microrganismos tem sido desenvolvida de forma experimental principalmente em *E. coli*, que tem as vantagens de ser um microrganismo modelo há décadas utilizado na área de genética, mas a desvantagem de não exibir uma resistência expressiva a metais pesados, o que limita a sua utilização em tais processos.

[248]. Assim, em *C. metallidurans*, que teve seu genoma sequenciado há relativamente pouco tempo (Janssen *et al.*, 2010), apenas três linhagens geneticamente modificadas para biorremediação de metais já foram desenvolvidas até o momento. Uma destas linhagens foi gerada especificamente para a biorremediação de mercúrio através da volatilização metabólica deste metal (Roja *et al.*, 2011), enquanto que as outras duas linhagens se baseiam na expressão de pequenas proteínas ligantes de metais pesados na superfície celular de *C. metallidurans*: a MT de camundongo (Valls *et al.*, 2000a) e uma fitoquelatina sintética (Biondo *et al.*, 2012), que ligam sete e onze íons divalentes de metais por molécula, respectivamente. Portanto, a expressão da metalotioneína sintética CrMT $\alpha\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 1**) em *C. metallidurans*, com capacidade de ligação de 24 íons divalentes de metais por

molécula, tem potencial para aumentar significativamente a capacidade deste microrganismo de imobilizar diferentes metais pesados não somente em comparação com a linhagem selvagem, como em relação as outras linhagens geneticamente modificadas para este mesmo fim.

**[249].** Portanto, a expressão da CrMT $\alpha\beta$ 4 (**SEQ ID NO: 1**) em fusão com IgA $\beta$  em *C. metallidurans* demonstrou a viabilidade de expressão de uma MT multidomínio neste organismo e resultou na obtenção de uma linhagem com grande potencial para imobilização de metais que pode servir a dois processos biotecnológicos: a biorremediação de efluentes contaminados e a recuperação de metais pesados com valor comercial a partir destes efluentes.

**[250].** Adsorção de metais (cádmio e níquel) pela linhagem *Cupriavidus metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4

**[251].** 1. Materiais e métodos

**[252].** As linhagens *C. metallidurans* LMG 1195 e *C. metallidurans* /pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 foram submetidas a dois experimentos independentes de adsorção de metais (cádmio e níquel). Cada experimento independente foi realizado em triplicata. A linhagem *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 foi submetida aos testes de adsorção com e sem pré-indução da expressão da proteína MT $\alpha\beta$ 4.

**[253].** Os experimentos começaram com a ativação das linhagens a partir de estoques mantidos a -20°C. Para obter colônias individuais, *C. metallidurans* LMG 1195 foi transferida para placas contendo meio triptona de soja (Oxoid) com agar (BD) – TSA, enquanto que a linhagem *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 foi transferida para placas contendo TSA e cloranfenicol (Sigma Aldrich) na concentração final de 230  $\mu$ g/ml. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas.

**[254].** Em seguida, uma colônia de *C. metallidurans* LMG 1195 foi transferida para um tubo cônico de 50 ml contendo 10 ml de TSM (“Tris Salt Media”, preparado como descrito por Mergeay et al., 1985) suplementado com 2% (p/v) de sódio gluconato (Sigma Aldrich). Em paralelo, duas colônias de *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 foram transferidas, separadamente, para dois tubos cônicos de 50 ml com 10 ml de TSM com cloranfenicol (230  $\mu$ g/ml)

em cada. Para induzir a expressão da proteína MT $\alpha\beta$ 4, em um dos inóculos de *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4, foi adicionado CdCl<sub>2</sub> na concentração final de 300  $\mu$ M (Cd<sup>2+</sup>). Os inóculos foram incubados a 30°C, com agitação de 180 rpm, durante 48 horas. Após este período, estes cultivos foram utilizados para inocular volumes maiores dos mesmos respectivos meios de cultura. O período de crescimento para produção de biomassa em volumes maiores foi de 72 horas para *C. metallidurans* LMG 1195 e de 96 horas para *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (com e sem indução por cádmio).

**[255].** Parte da biomassa de cada linhagem foi utilizada para determinar o peso seco e o restante foi centrifugado (4°C, 10000xg, 10 minutos). A biomassa precipitada foi ressuspensa com tampão fosfato salino (PBS) e centrifugada novamente, nas mesmas condições. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os precipitados de células foram ressuspensos em água deionizada estéril para obter uma suspensão celular concentrada para os testes de adsorção dos metais alvo (Cd<sup>2+</sup> ou Ni<sup>2+</sup>).

**[256].** Soluções frescas de 1 mM de CdCl<sub>2</sub> e de NiCl<sub>2</sub> (ambos os reagentes de grau analítico, Sigma Aldrich) foram preparadas para cada experimento e tiveram o pH ajustado para 5 com HCl (1 M), como sugerido por Meulenaar et al. (1985), para aumentar a estabilidade dos complexos metal-proteína. A biomassa obtida para cada linhagem foi incubada nas soluções de cádmio (1 mM) e níquel (1 mM). A adsorção foi realizada em tubos cônicos de 50 ml, a 30°C e com agitação de 180 rpm. Os tempos de amostragem foram 0, 12 e 24 horas. Para cada amostra, a biomassa foi separada da solução por centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente. Sobrenadantes e os precipitados de células foram armazenados a -20°C até serem analisados. O conteúdo de metal foi determinado por espectroscopia de absorção atômica (AAS) seguindo o procedimento padrão estabelecido previamente ("SMEWW 3120B standard procedure", 1999). A taxa de sobrevivência das linhagens durante a adsorção de metais foi analisada pelo método Miles Mirsa (Miles et al., 1928). As placas referentes à esta análise foram incubadas a 30°C durante 72h.

**[257].** Resultados e Discussão

**[258].** A figura 30 mostra os resultados da adsorção de íons de cádmio por *C. metallidurans* LMG 1195 e *C. metallidurans/pBBR1-SD-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4* (com e sem pré-indução), enquanto a figura 31 mostra os resultados de adsorção de níquel pelas mesmas linhagens.

**[259].** No primeiro experimento, foi observado que a maior redução na concentração de cádmio em solução foi obtida pela linhagem *C. metallidurans pBBR1-SD-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4* pré-induzida, onde a remoção de cádmio da solução foi superior a 58%, enquanto que as outras duas linhagens mostraram uma eficiência limitada (figura 30a). A quantidade final de cádmio adsorvida na biomassa foi de 3500, 680 e 302 mg por quilo de biomassa para as linhagens *C. metallidurans pBBR1-SD-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4* (pré-induzida), *C. metallidurans pBBR1-SD-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4* (sem indução) e *C. metallidurans* LMG 1195, respectivamente. No entanto, a adsorção de níquel teve uma dinâmica um pouco diferente. Novamente, os melhores resultados foram observados com a linhagem *C. metallidurans/pBBR1-SD-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4* (pré-induzida), mas para o níquel, o pico de adsorção foi atingido após 12 horas de exposição a solução de metal, seguindo-se de um período de lenta liberação de níquel de volta para a solução, sugerindo que 24 horas não seja o tempo ótimo para a adsorção de níquel. Ainda assim, o pico de concentração de níquel (~500 mg/Kg de biomassa) observado na linhagem *C. metallidurans/pBBR1-SD-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4* (pré-induzida) foi bem maior que aquele observado em *C. metallidurans/pBBR1-SD-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4* sem indução (125 mg/Kg) e em *C. metallidurans* LMG 1195 (117 mg/Kg). É importante notar que a adsorção de cádmio foi significativamente maior que a de níquel. Uma possível explicação para isso é que metalotioneínas, de forma geral, exibem maior afinidade de ligação por cádmio. No entanto, no caso da metalotioneína sintética investigada neste trabalho (MT $\alpha$  $\beta$ 4), esta característica ainda será investigada.

**[260].** Os resultados do segundo experimento de adsorção foram similares aos obtidos no primeiro experimento. *C. metallidurans/pBBR1-SD-CrMT $\alpha$  $\beta$ 4* (pré-induzida) foi a linhagem mais eficiente e removeu 83% do cádmio em solução

após 24h de incubação. Houve, no entanto, uma liberação do cádmio após o período de 12h, com a concentração de cádmio na biomassa caindo de 1800 mg/Kg (12h) para 1140 mg/Kg (24h). As quantidades finais de cádmio adsorvido na biomassa foram 520 e 195 mg/Kg de biomassa de *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (sem indução) e *C. metallidurans* LMG 1195, respectivamente. A dinâmica de remoção de níquel foi consistente com a observada no primeiro experimento de adsorção. O pico de acúmulo de níquel na biomassa após 12h foi confirmado, com 675 mg de níquel/Kg de biomassa de *C. metallidurans*/pBBR1MCS/MT $\alpha\beta$ 4 (pré-induzida).

**[261].** Os testes de viabilidade das linhagens durante os experimentos de adsorção de metais (figura 32) mostraram que a taxa de sobrevivência de *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4(pré-induzida) foi pouco menor que a das outras duas linhagens (redução de 1 log). Por outro lado, a taxa de sobrevivência da mesma linhagem em níquel foi maior que a das outras duas linhagens. Enquanto a viabilidade de *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4(pré-induzida) caiu no máximo 1 log, a redução da viabilidade de *C. metallidurans* LMG 1195 e *C. metallidurans*/pBBR1-SD-CrMT $\alpha\beta$ 4 (sem indução) chegou a 3 log.

**[262].** Biondo et al. (2012) ressaltaram que a literatura apresenta resultados de adsorção de metais conflitantes para a mesma linhagem. De fato, para *C. metallidurans* CH34, Valls et. al. (2001) reportaram uma adsorção de cádmio de 14 nmol/mg de biomassa (peso seco), enquanto Diels et al. reportou 1200 nmol de Cd<sup>2+</sup>/mg biomassa (peso seco) e Biondo et al. 2012 observou um acúmulo de 10.8 nmol de Cd<sup>2+</sup>/mg de biomassa (peso seco). Além disso, em comparação com a concentração de metais utilizada nos experimentos deste trabalho, a concentração observada em efluentes pode ser bem menor. A concentração nominal utilizada nos experimentos foi de 1 mM, ou seja, o equivalente a 112,4 mg/L para cádmio e 58,7 mg/L para níquel. Singh & Chandel (2006) encontraram níquel em efluentes industriais na faixa de concentração 0,01-0,07 mg/L. Deepali (2010) detectou cádmio em efluentes de

indústria têxtil ( $0.018 \pm 4.472$  mg/L) e no solo ( $83.62 \pm 0.119$  µg/g) e água ( $0.04 \pm 0.02$  mg /L) associados

### **Reivindicações**

1. Organismo geneticamente modificado **caracterizado por** compreender proteínas pertencentes ao gênero *Crassostrea*.

2. Organismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** organismo ser escolhido dentre bactérias e/ou leveduras.

3. Organismo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** bactéria ser escolhida do gênero *Cupriavidus*.

4. Organismo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pela** bactéria ser escolhida do grupo que compreende *C. alkaliphilus*, *C. basilensis*, *C. campinensis*, *C. gilardii*, *C. laharis*, *C. metallidurans*, *C. numazuensis*, *C. oxalaticus*, *C. pampae*, *C. pauculus*, *C. pinatubonensis*, *C. respiraculi*, *C. taiwanensis* e combinações dos mesmos.

5. Organismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** proteínas pertencentes ao gênero *Crassostrea* serem proteínas que se ligam a metais com grande afinidade.

6. Organismo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelas** proteínas serem metalotioneínas listadas nas SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e/ou 11.

7. Organismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** espécies pertencentes ao gênero *Crassostrea* serem escolhidas do grupo que compreende *C. angulata*, *C. ariakensis*, *C. chilensis*, *C. columbiensis*, *C. corteziensis*, *C. gasar*, *C. gigas*, *C. glomerata*, *C. iredalei*, *C. rhizophorae*, *C. virginica* e combinações dos mesmos.

8. Processo de biorremediação de um ambiente contaminado com metais pesados **caracterizado por** compreender as etapas de:

a) adição, de um inóculo compreendendo um organismo geneticamente modificado conforme reivindicações 1 a 7, ao ambiente contaminado; e

b) incubação de tal inóculo no dito ambiente contaminado por um período de tempo variando de 1 hora a 6 meses, para remover metais pesados do dito ambiente contaminado.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** compreender adicionalmente as etapas de:

- c) separação da biomassa após decorrido o tempo da etapa b); e
- d) isolamento do metal pesado da biomassa separada na etapa c).

10. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** metal pesado ser escolhido dos grupos 2 a 12 da tabela periódica, incluindo lantanídeos e actinídeos.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** metal pesado ser escolhido do grupo que compreende Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cd e Hg e combinações dos mesmos, em qualquer estado de oxidação.

12. Processo de biomineração de um ambiente contaminado com metais pesados **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a) adição, de um inóculo compreendendo um organismo geneticamente modificado conforme reivindicações 1 a 7, ao ambiente contaminado; e
- b) incubação de tal inóculo no dito ambiente contaminado por um período de tempo variando de 1 hora a 6 meses, para remover metais pesados do dito ambiente contaminado.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado por** compreender adicionalmente as etapas de:

- c) separação da biomassa após decorrido o tempo da etapa b); e
- d) isolamento do metal pesado da biomassa separada na etapa c).

14. Processo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** metal pesado ser escolhido dos grupos 2 a 12 da tabela periódica, incluindo lantanídeos e actinídeos.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** metal pesado ser escolhido do grupo que compreende Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cd e Hg e combinações dos mesmos, em qualquer estado de oxidação.

**FIGURAS**

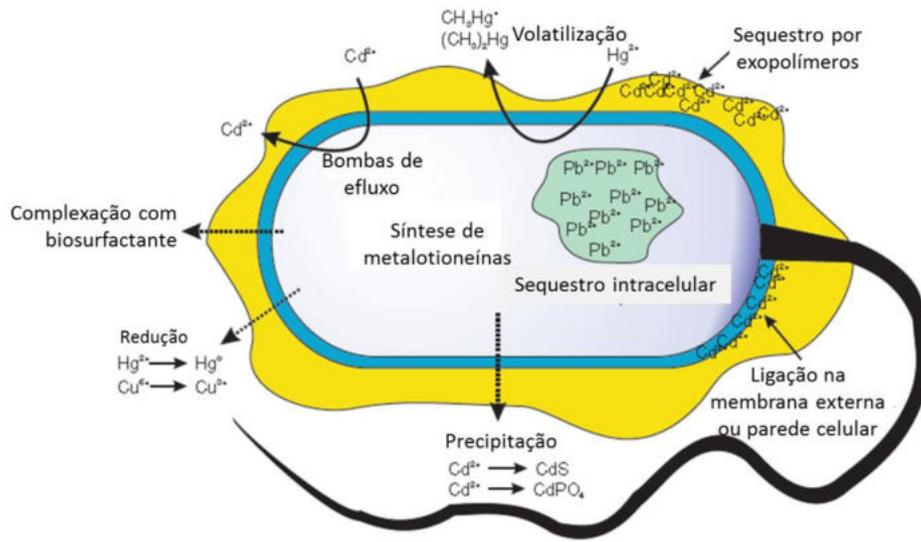


Figura 1

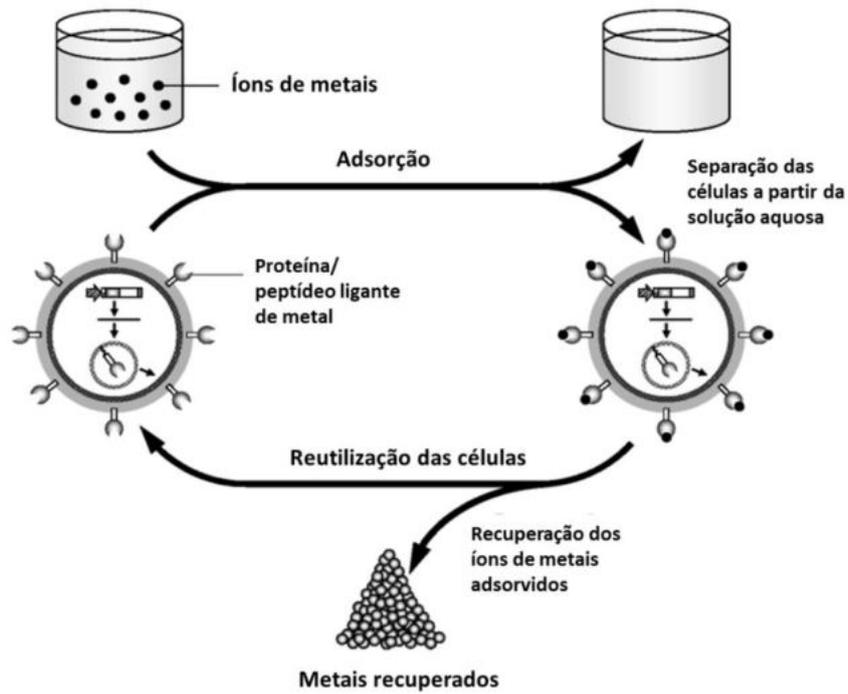


Figura 2

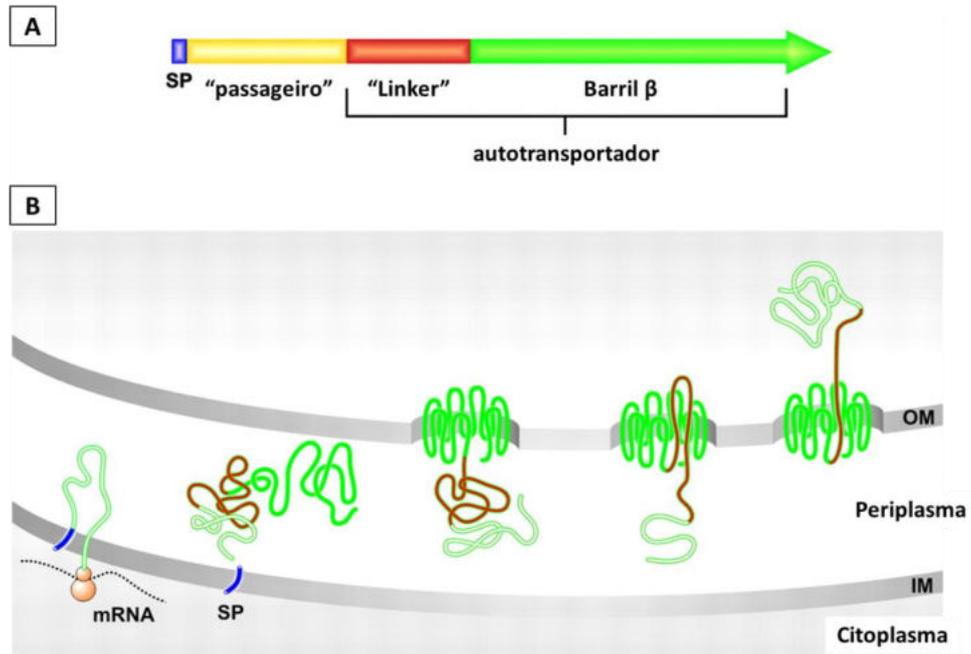


Figura 3

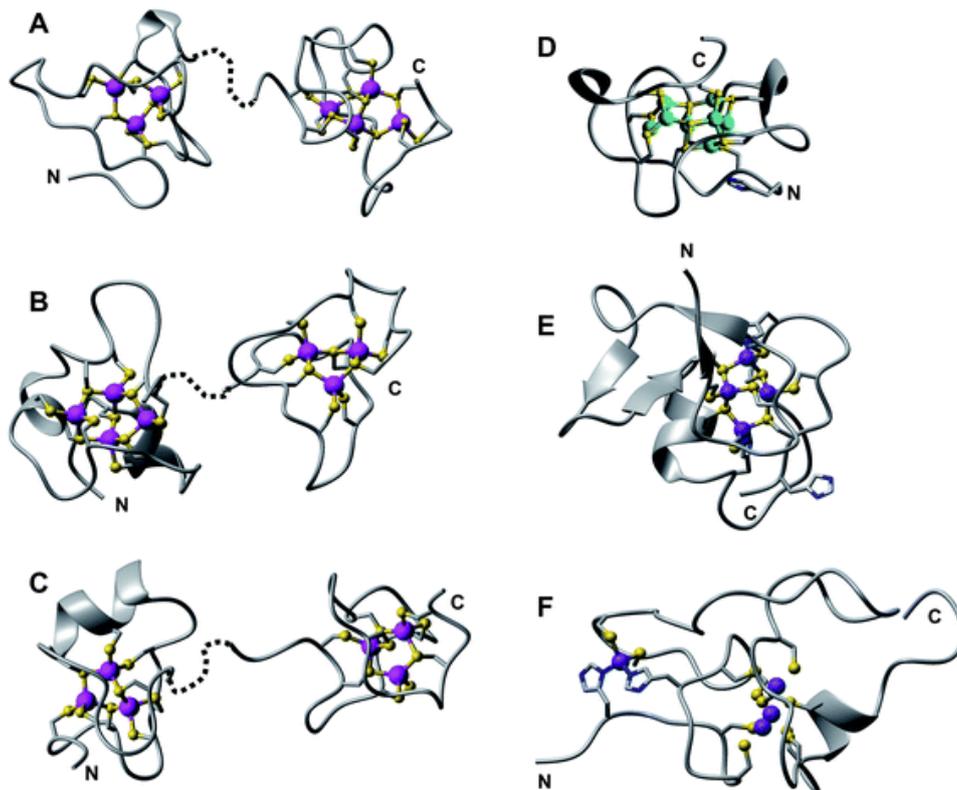


Figura 4

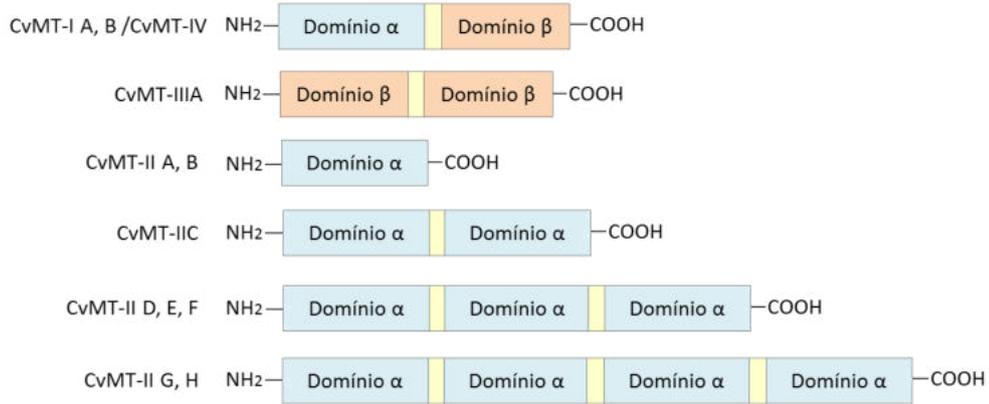
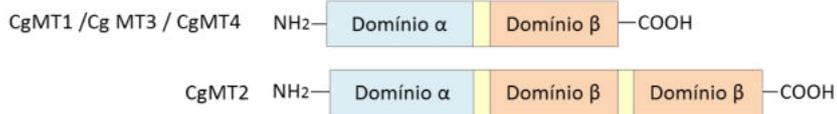
***Crassostrea virginica******Crassostrea gigas******Crassostrea rhizophorae***

Figura 5

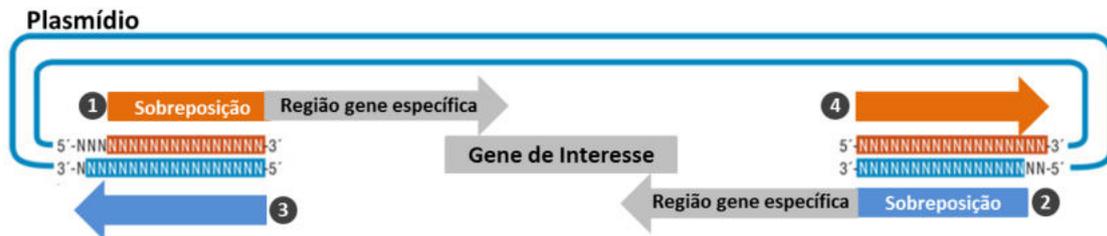


Figura 6

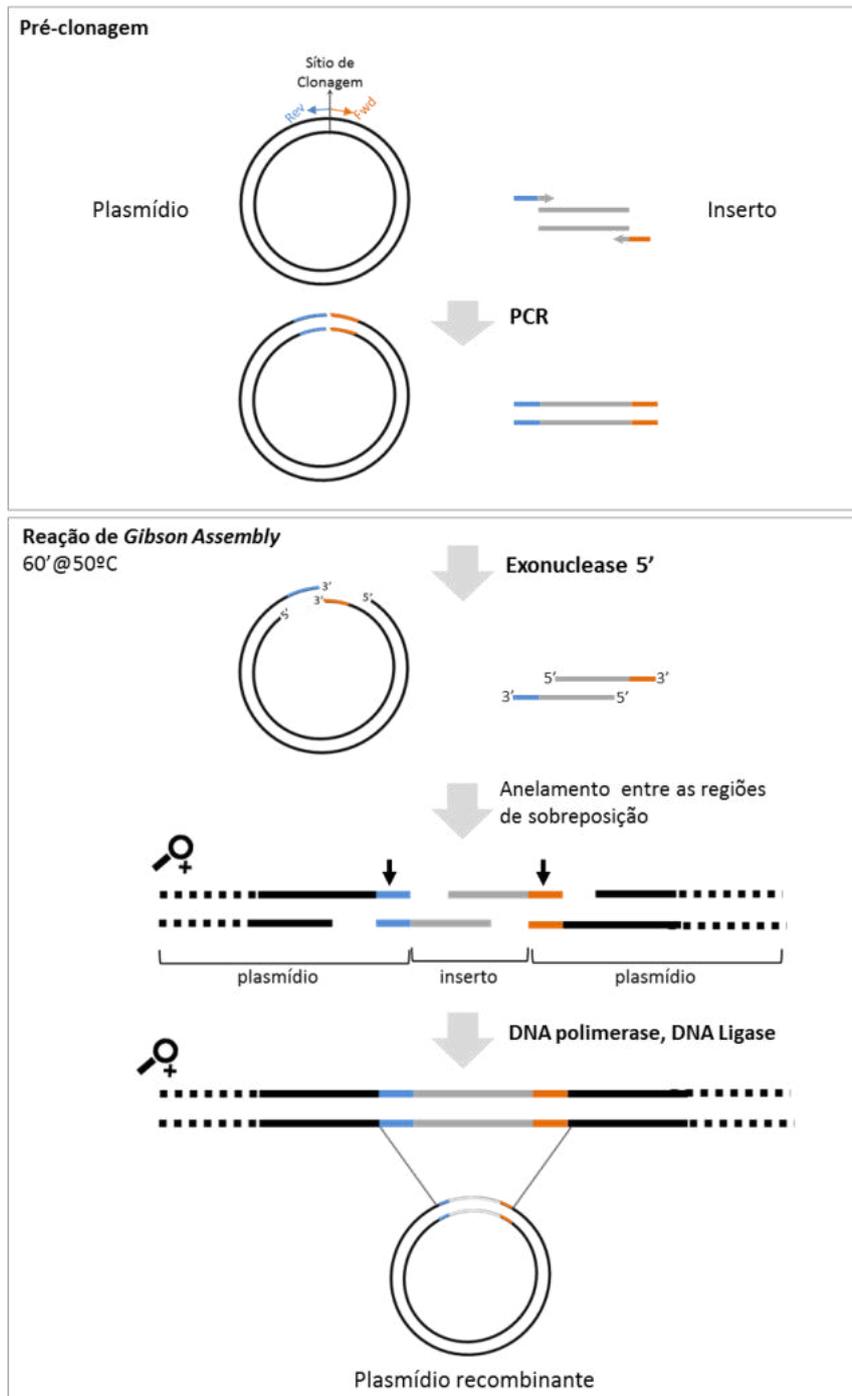


Figura 7

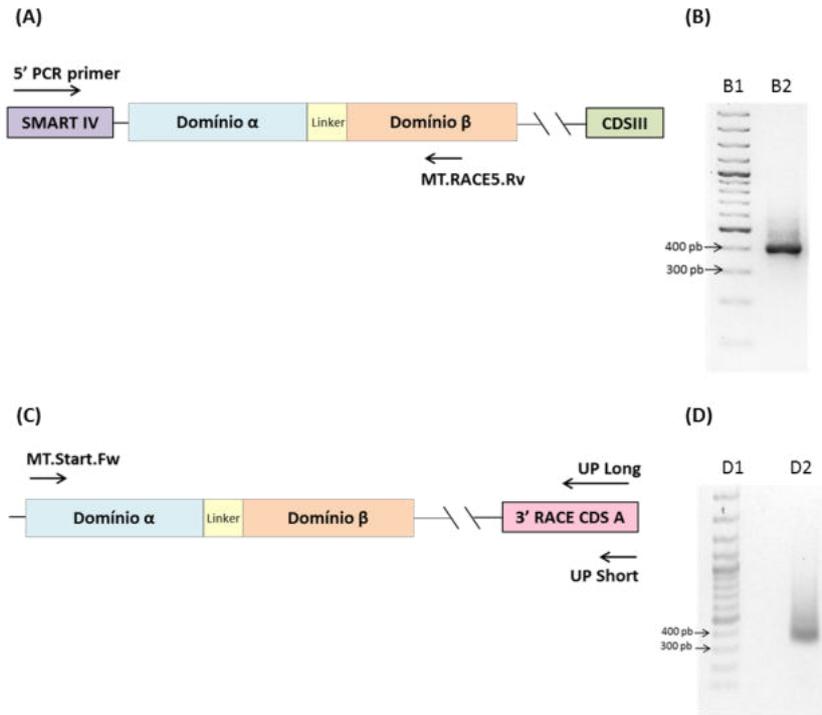


Figura 8

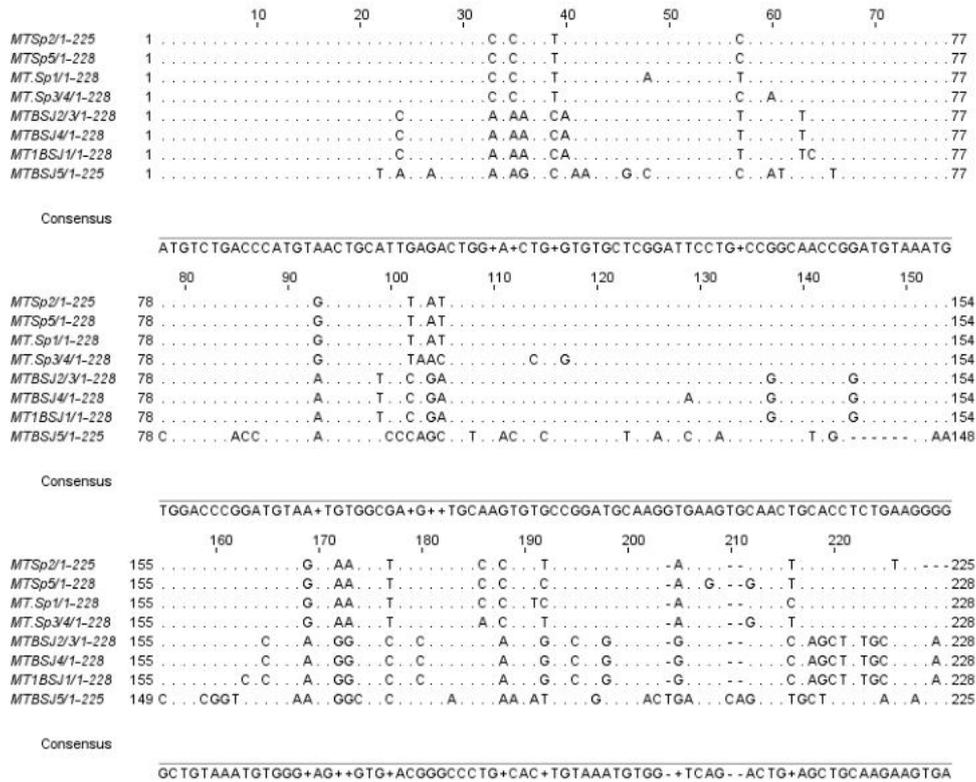


Figura 9

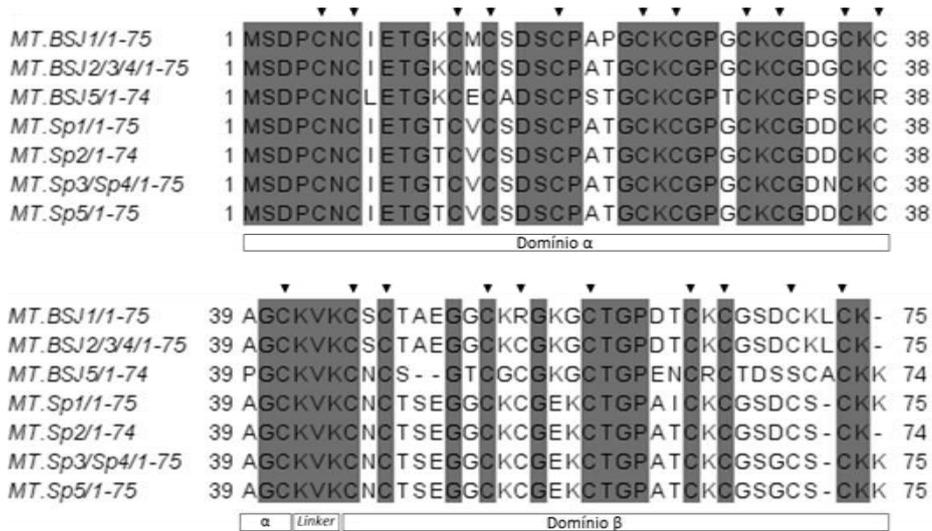


Figura 10

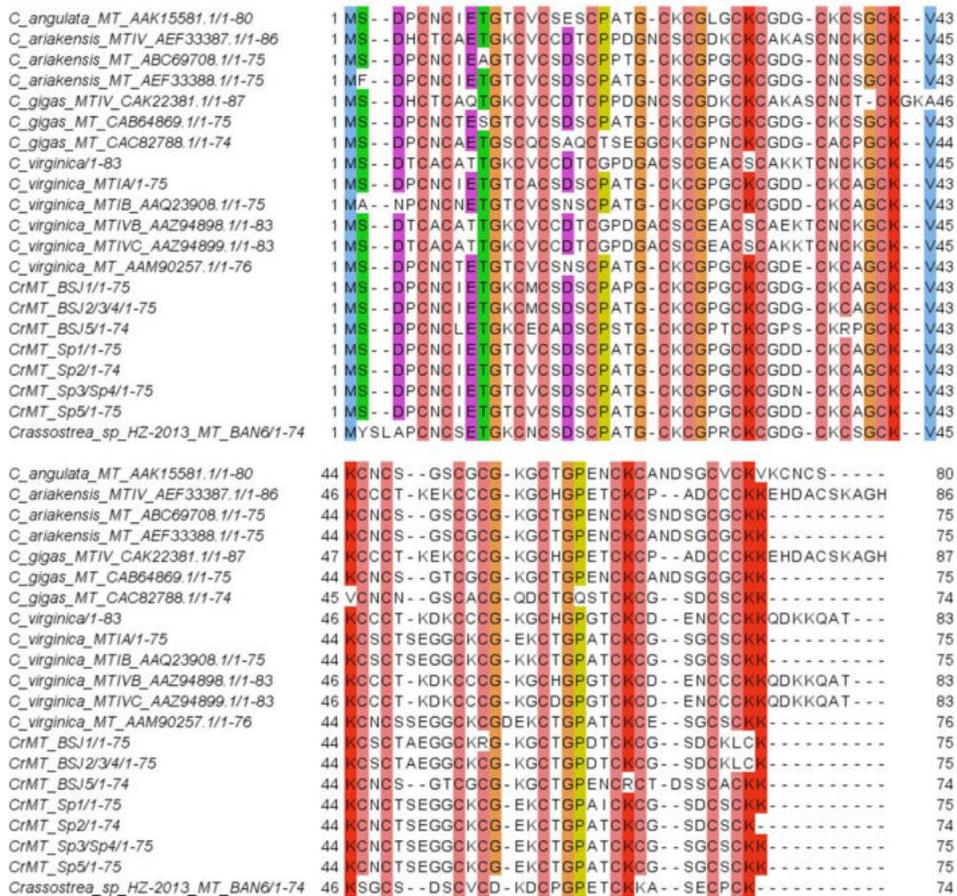


Figura 11

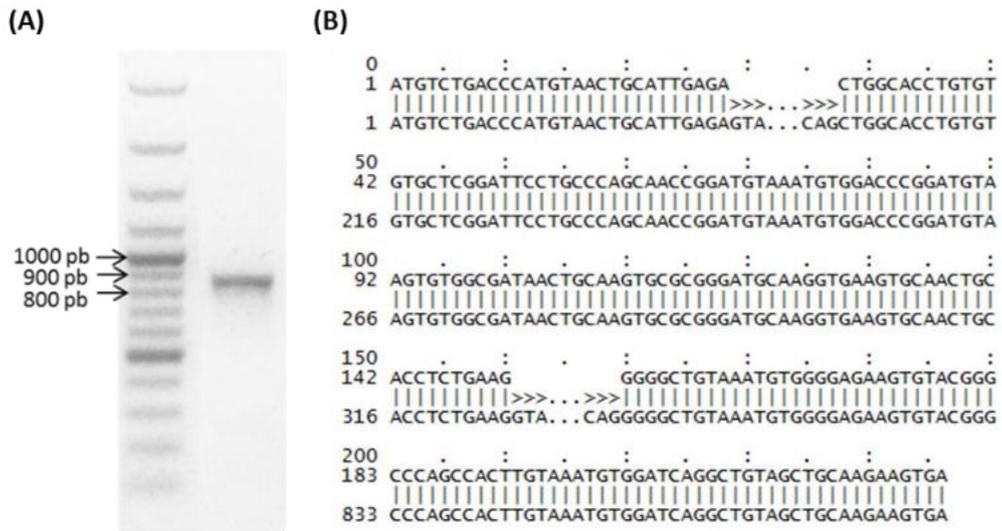


Figura 12

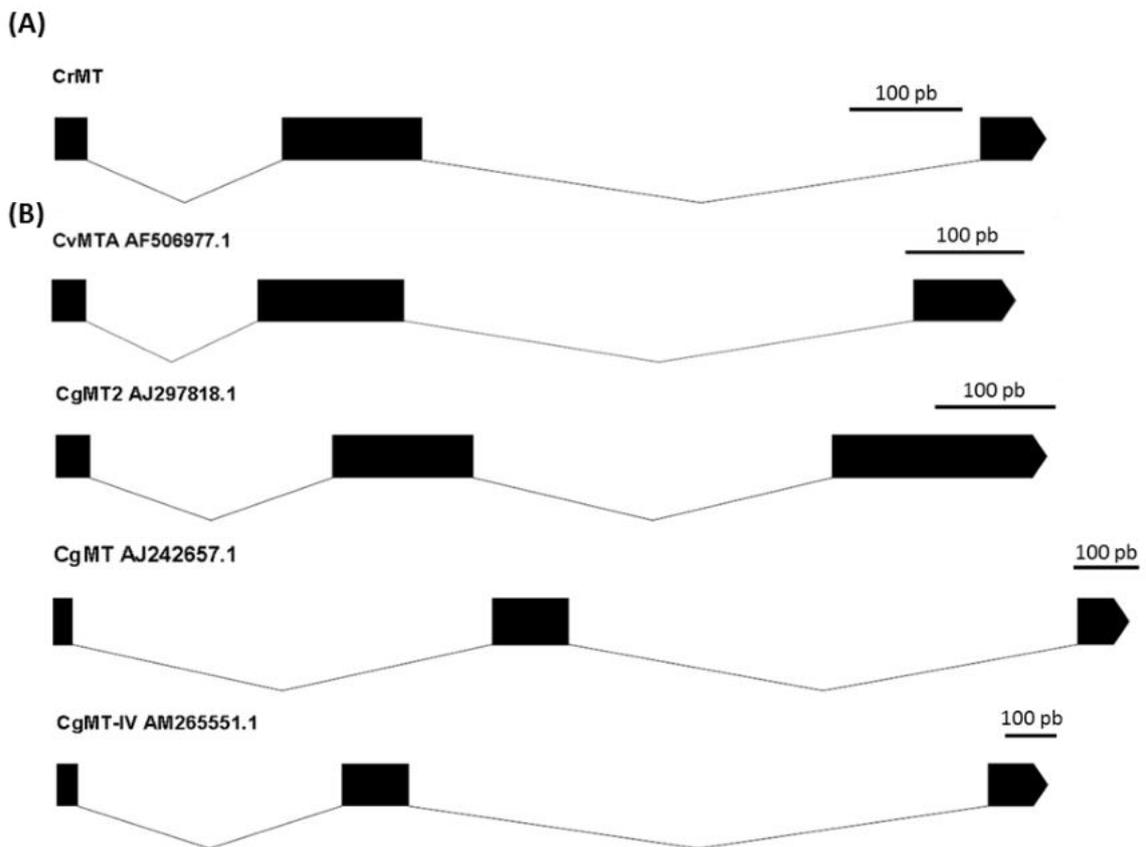


Figura 13

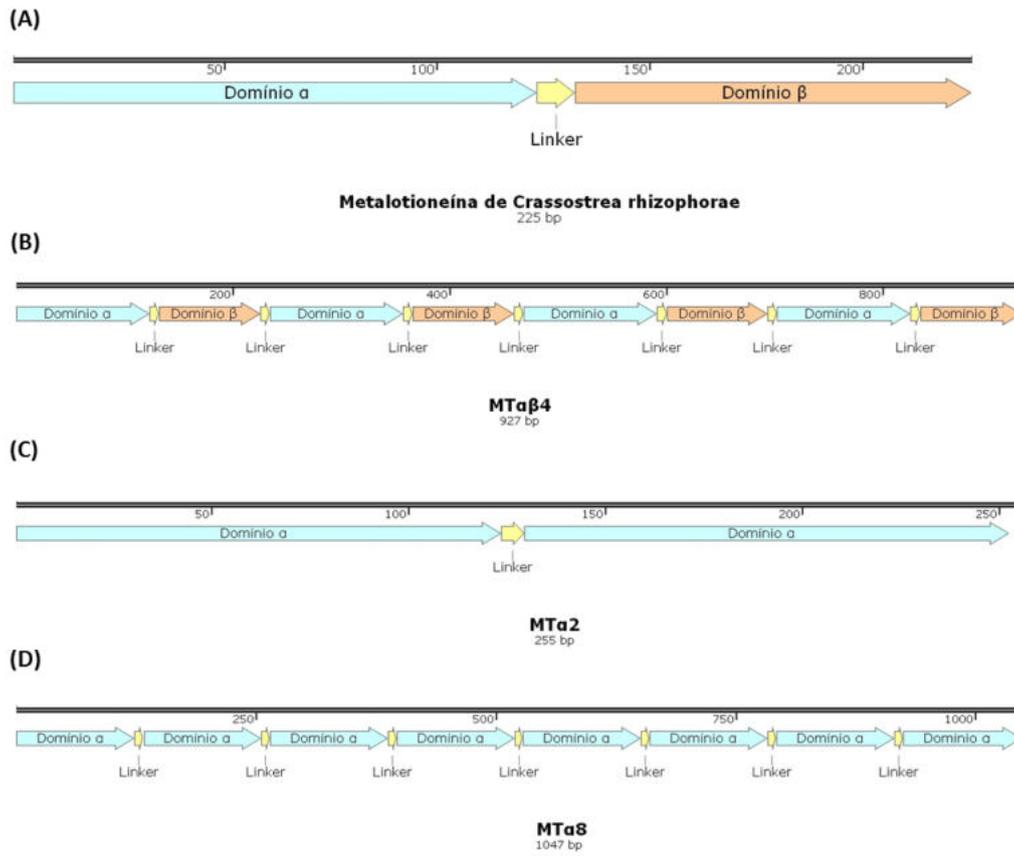


Figura 14

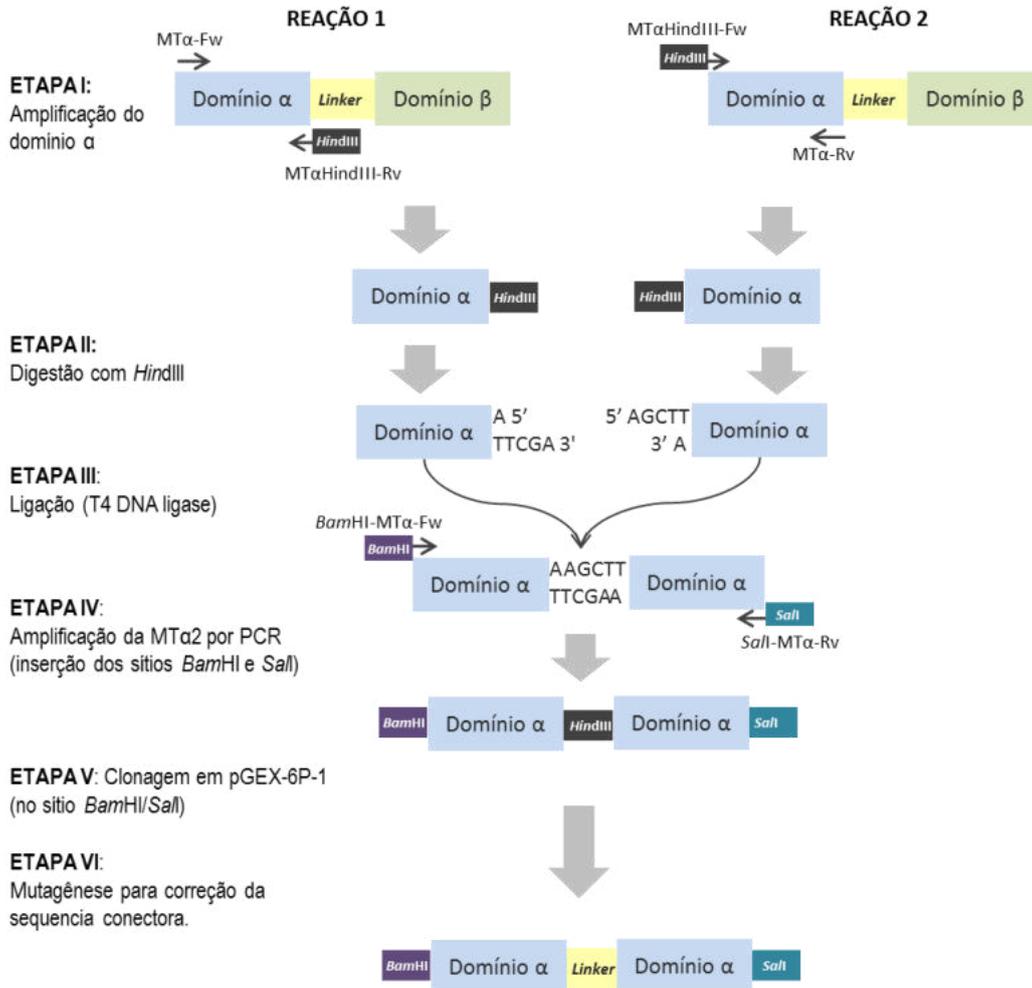


Figura 15

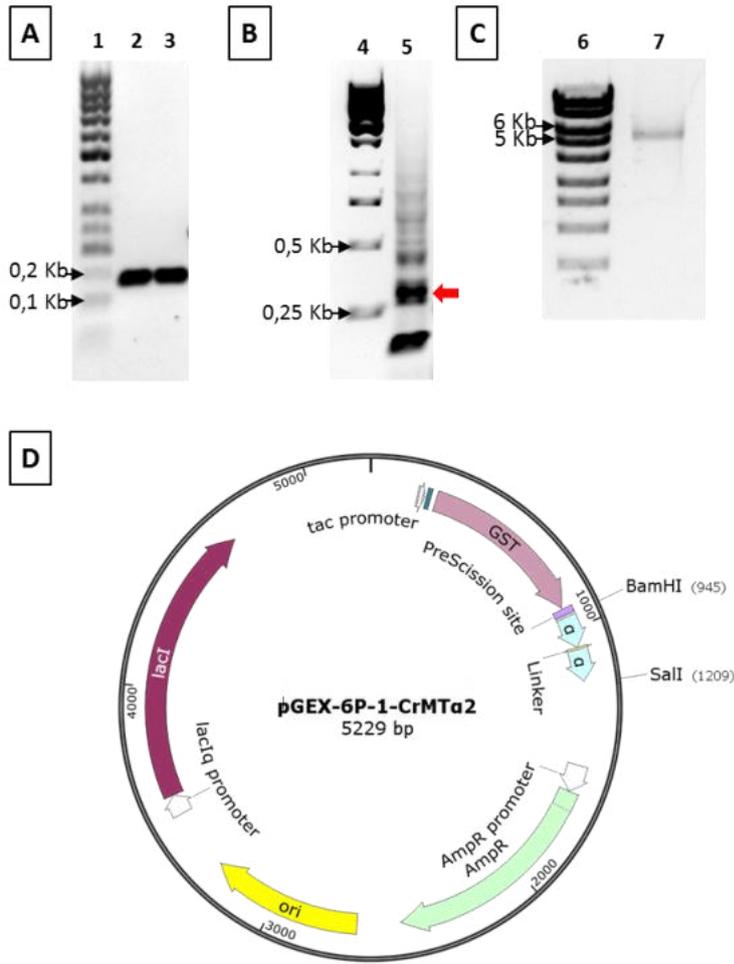


Figura 16

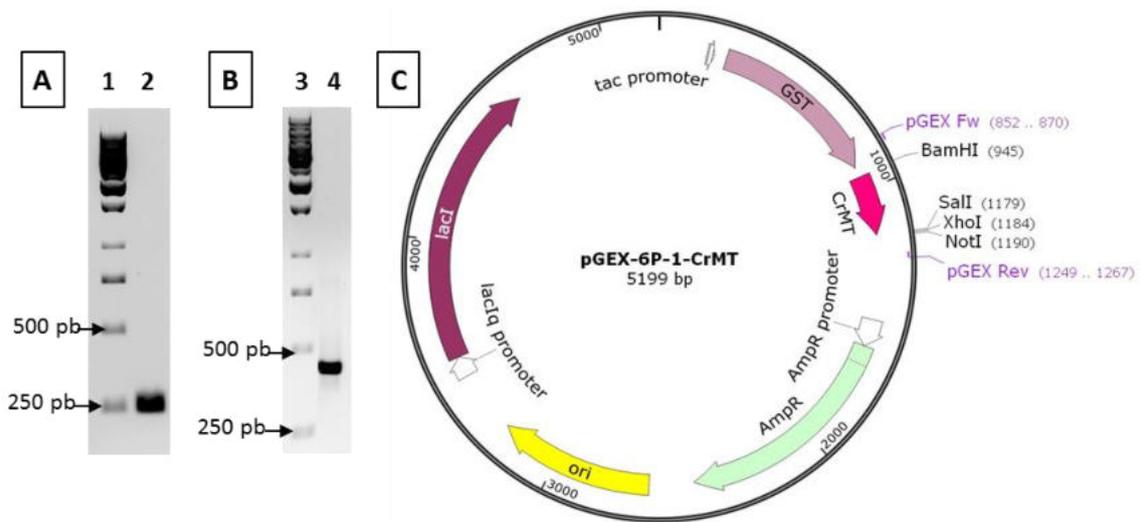


Figura 17.

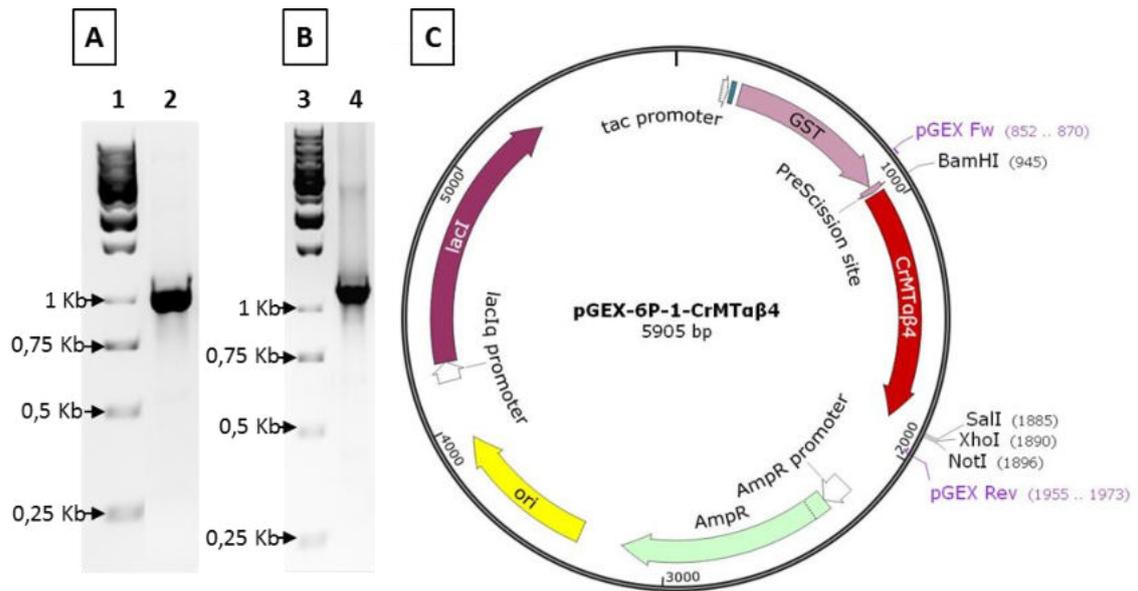


Figura 18

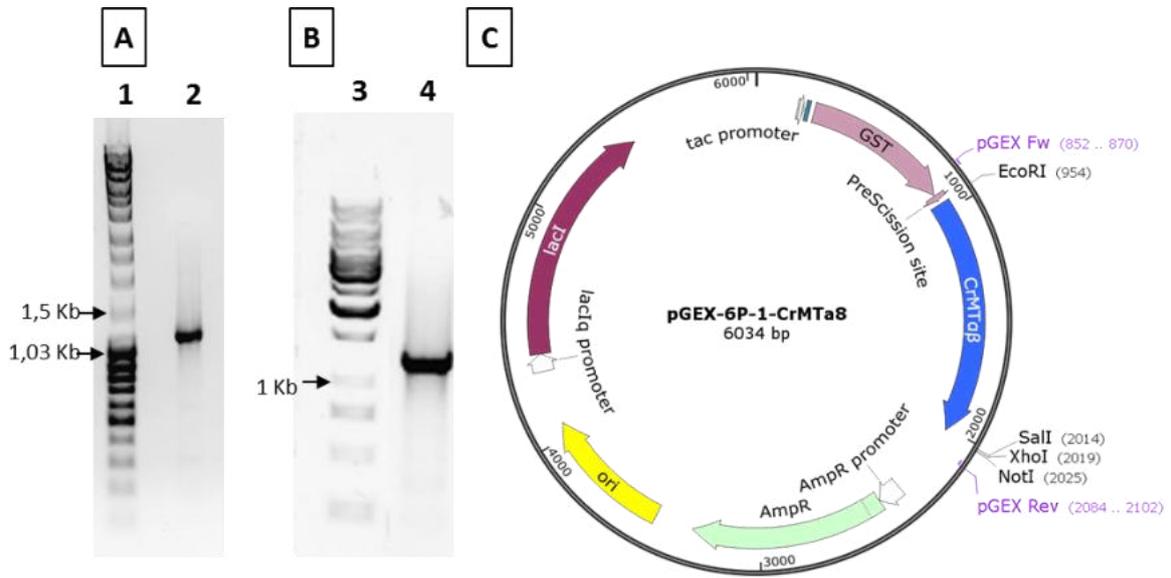


Figura 19

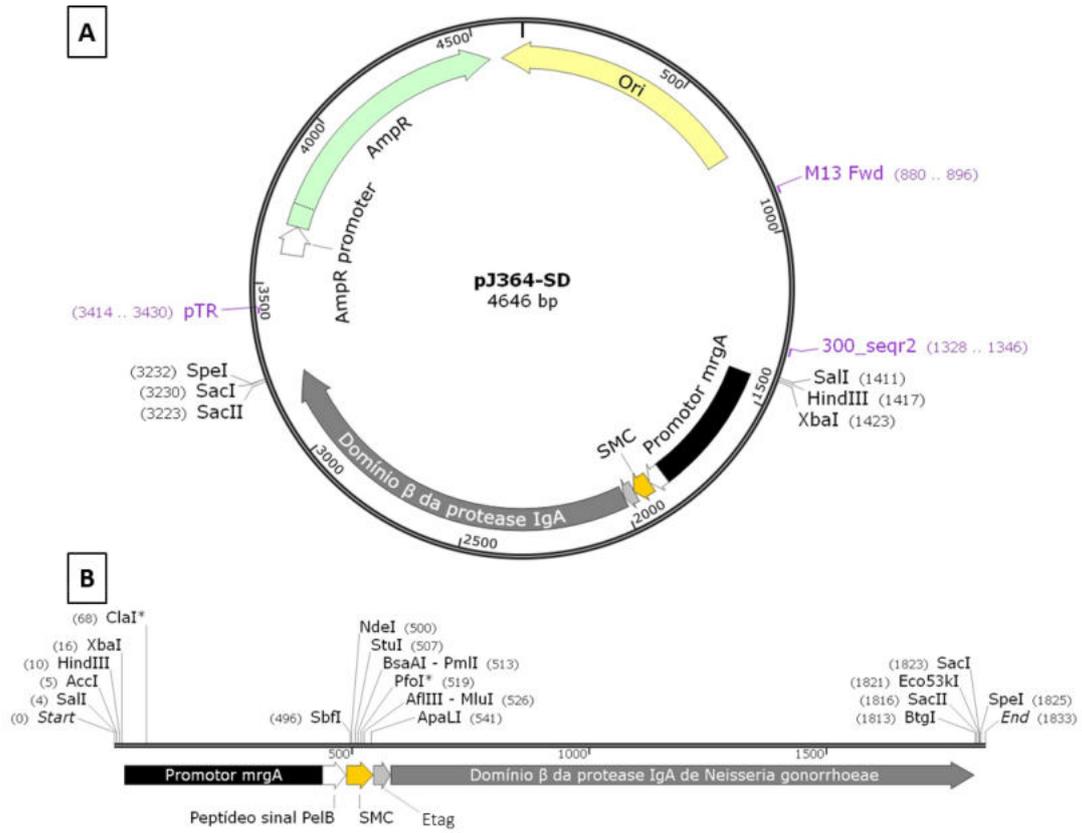


Figura 20

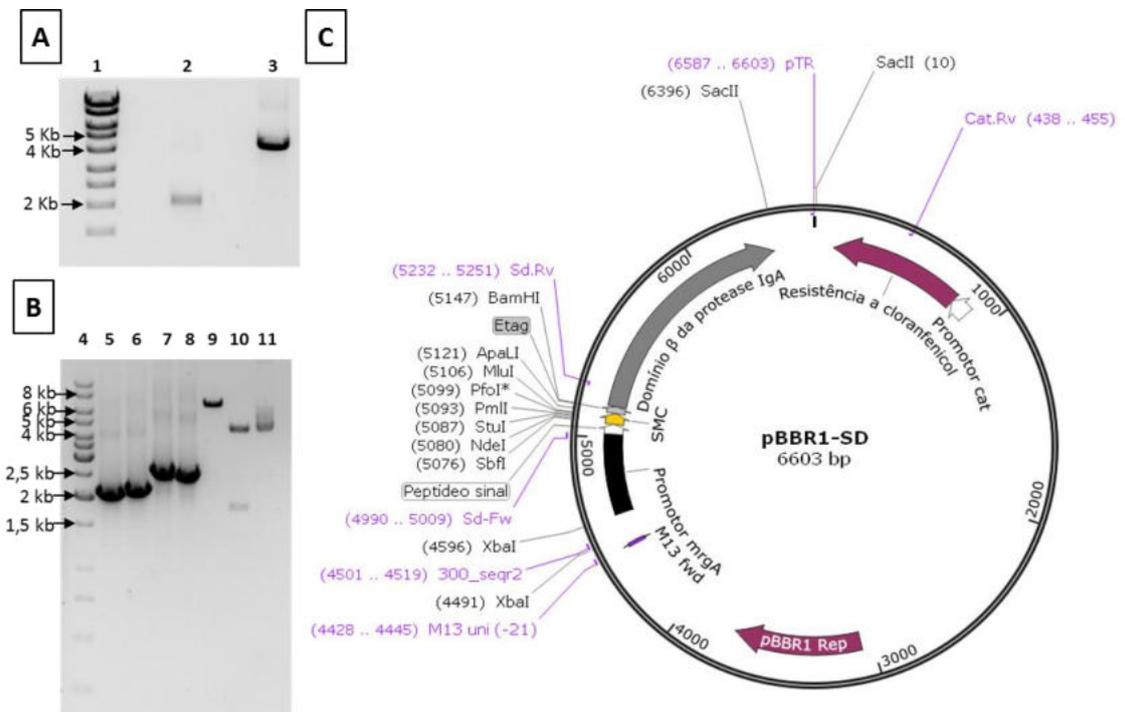


Figura 21

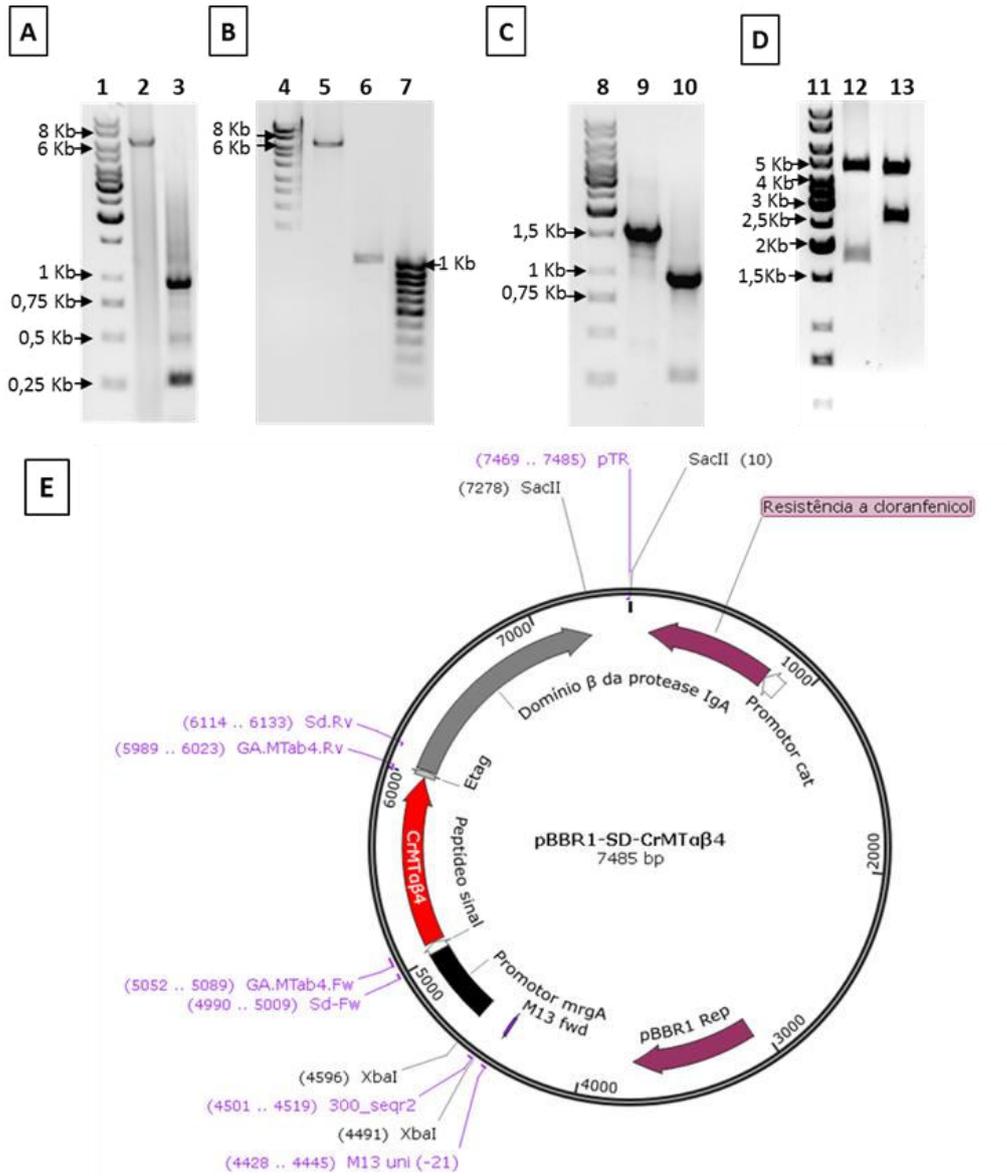


Figura 22

Extrato total de <i>C. metallidurans</i> /pBBR1-SD-MT $\alpha\beta$ 4	+	-	-
Extrato total de <i>C. metallidurans</i> /pBBR1-SD	-	+	-
Extrato total de <i>C. metallidurans</i> LMG1195	-	-	+

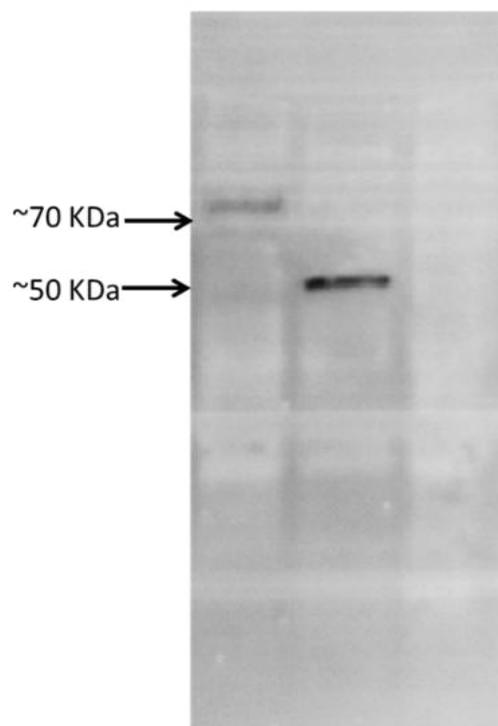


Figura 23

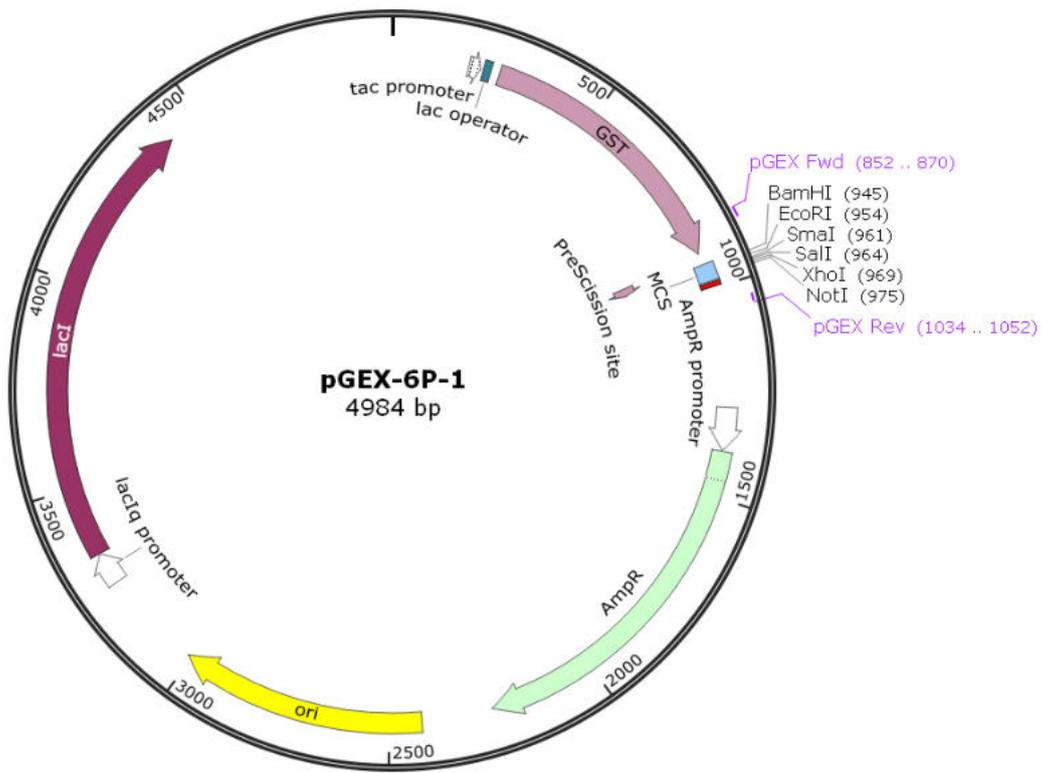


FIGURA 24

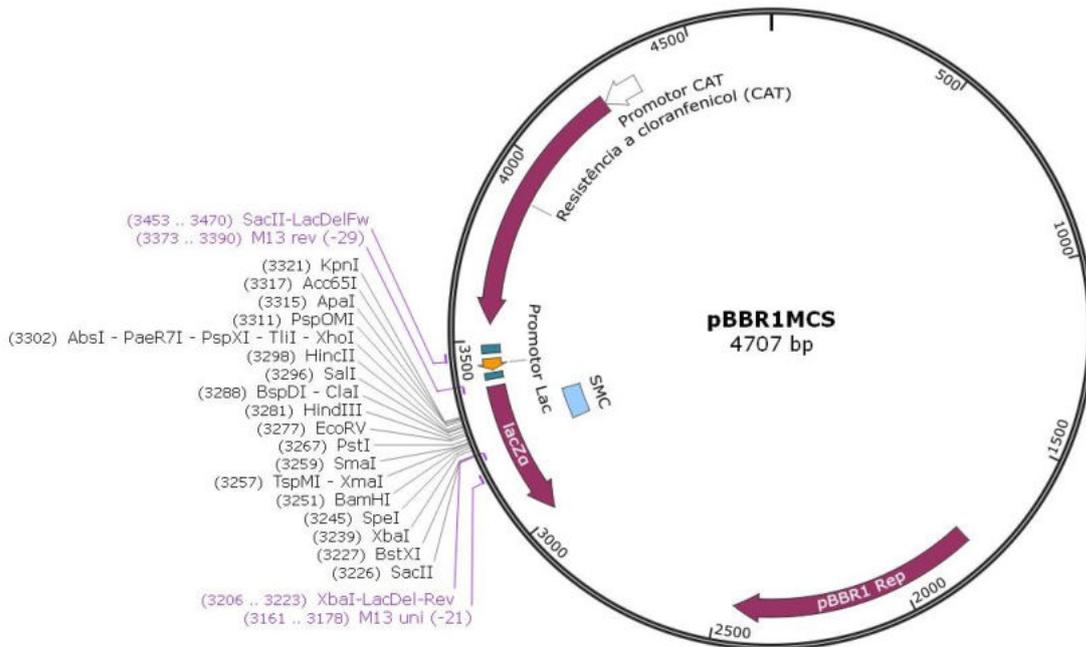


FIGURA 25

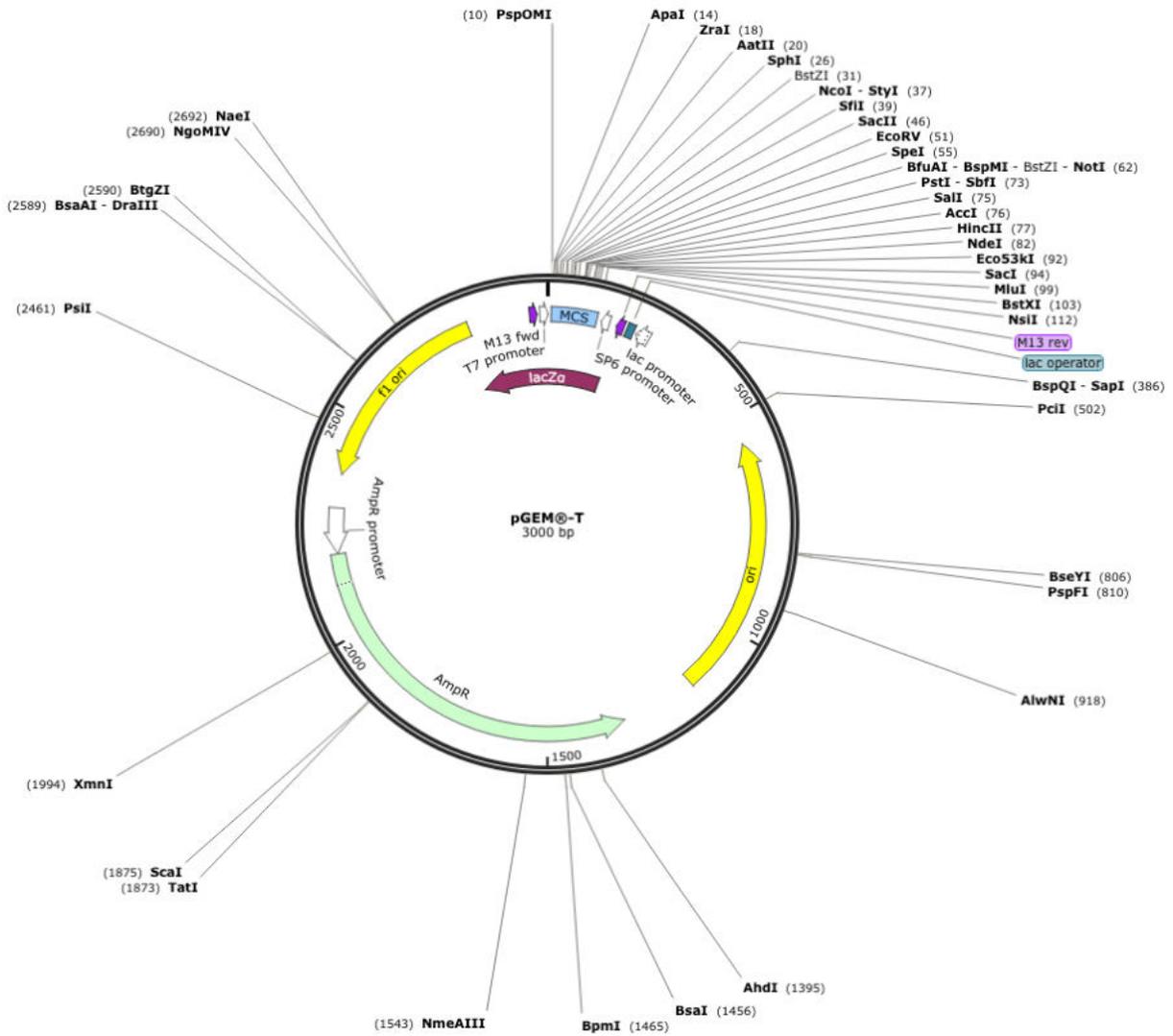


FIGURA 26

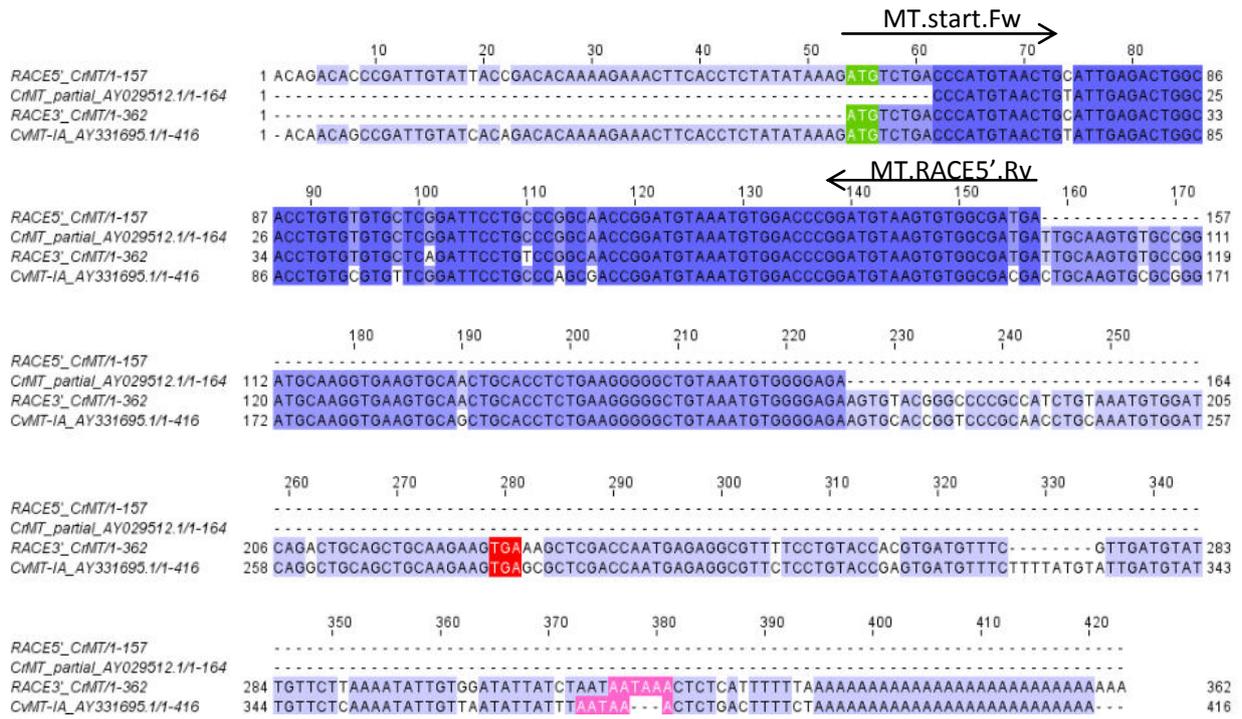


FIGURA 27

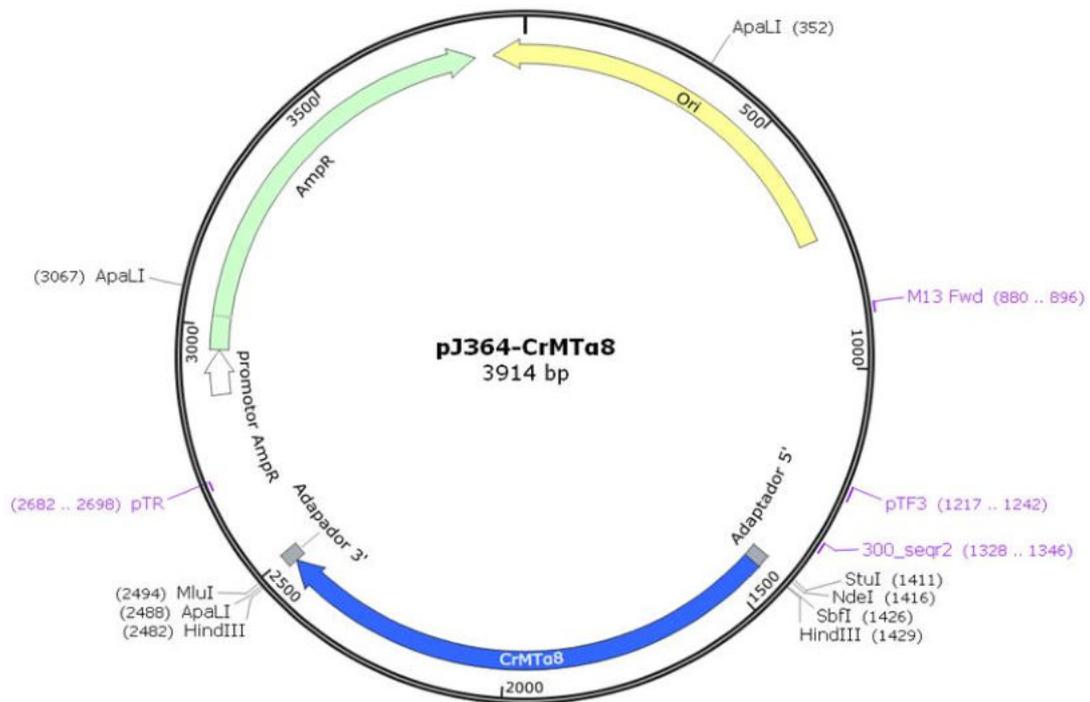
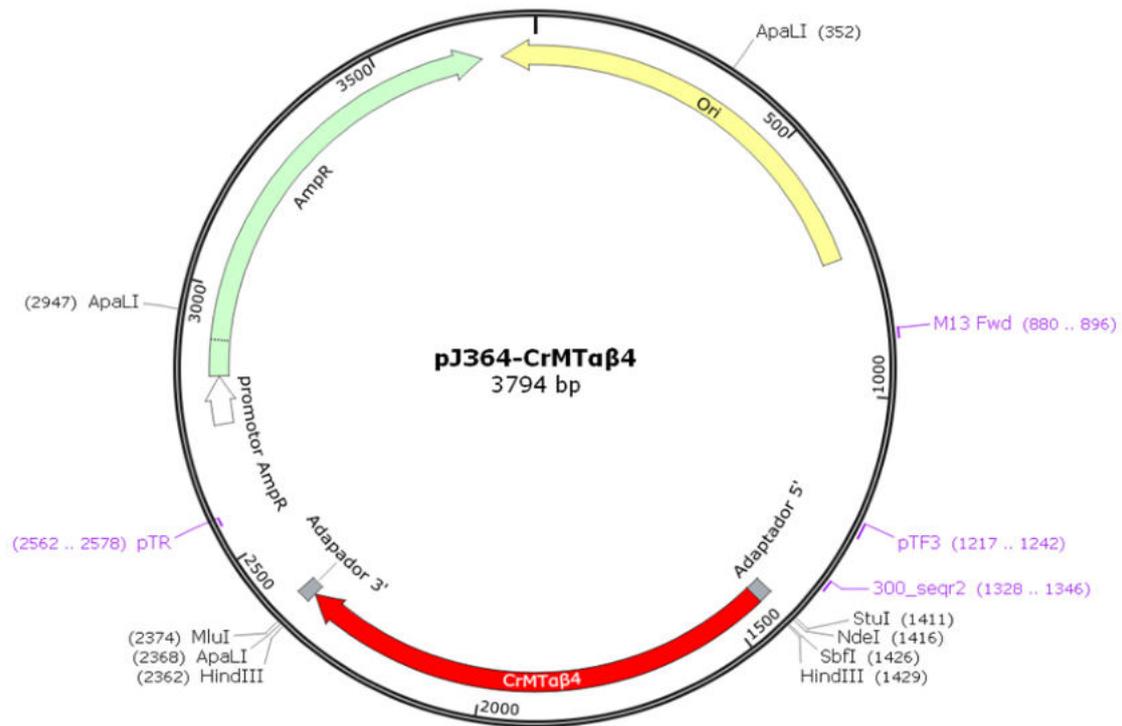


FIGURA 28

Sequencia pesquisada ( <i>query</i> )	N° de aminoácidos	Melhor hit - BLASTp									
		Descrição	Código de acesso	Número de aminoácidos	<i>e-value</i>	Identicidades (%)	Positivos (%)	Gaps	<i>Score</i>	Início do Alinhamento	Término do alinhamento
CrMT.Sp1	75	metallothionein IA [ <i>Crassostrea virginica</i> ]	AAQ23906	75	3,00E-35	71/75 (95%)	72/75 (96%)	0/75(0%)	125 bits	1	75
CrMT.Sp2	74	metallothionein IA [ <i>Crassostrea virginica</i> ]	AAQ23906	75	4,00E-35	71/74 (96%)	72/74(97%)	0/74(0%)	124 bits	1	74
CrMT.Sp3=Sp4	75	metallothionein IA [ <i>Crassostrea virginica</i> ]	AAQ23906	75	4,00E-36	72/75(96%)	74/75(98%)	0/75(0%)	127 bits	1	75
CrMT.Sp5	75	metallothionein IA [ <i>Crassostrea virginica</i> ]	AAQ23906	75	1,00E-36	73/75(97%)	74/75(98%)	0/75(0%)	128 bits	1	75
CrMT.BSJ1	75	metallothionein IA [ <i>Crassostrea virginica</i> ]	AAQ23906	75	3,00E-27	61/71(86%)	63/71(88%)	0/71(0%)	104 bits	1	71
CrMT.BSJ2=BSJ3=BSJ4	75	metallothionein IA [ <i>Crassostrea virginica</i> ]	AAQ23906	75	3,00E-29	63/71(89%)	65/71(91%)	0/71(0%)	109 bits	1	71
CrMT.BSJ5	74	metallothionein [ <i>Hyriopsis cumingii</i> ]	FJ861993.1	75	4,00E-26	59/75(79%)	64/75(85%)	1/75(1%)	101 bits	1	75

FIGURA 29

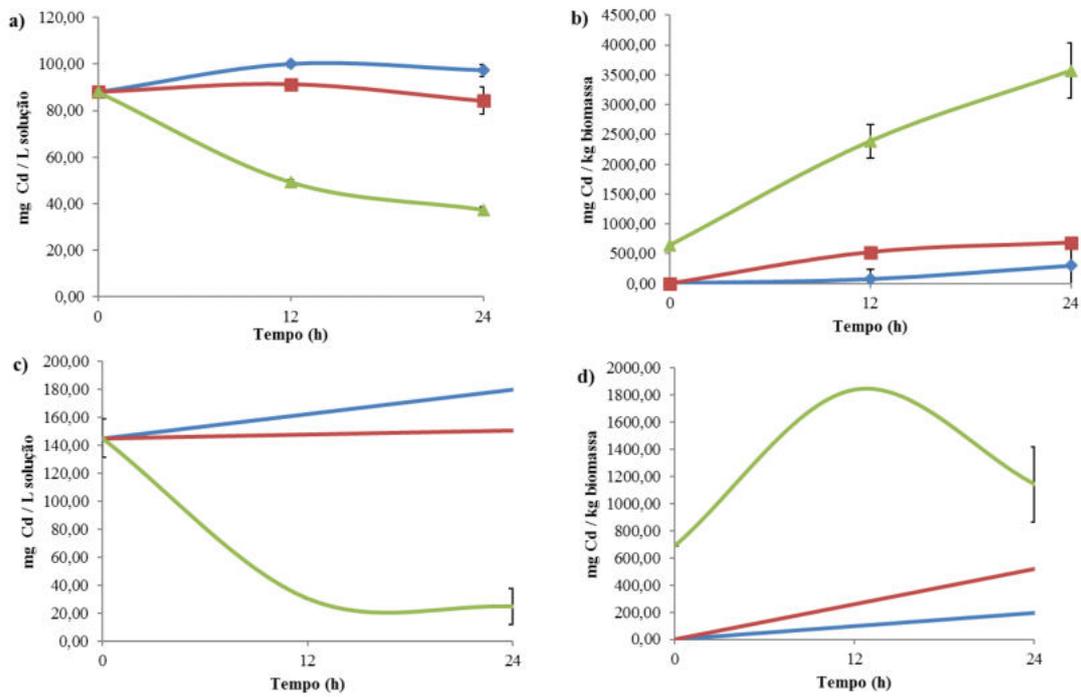


FIGURA 30

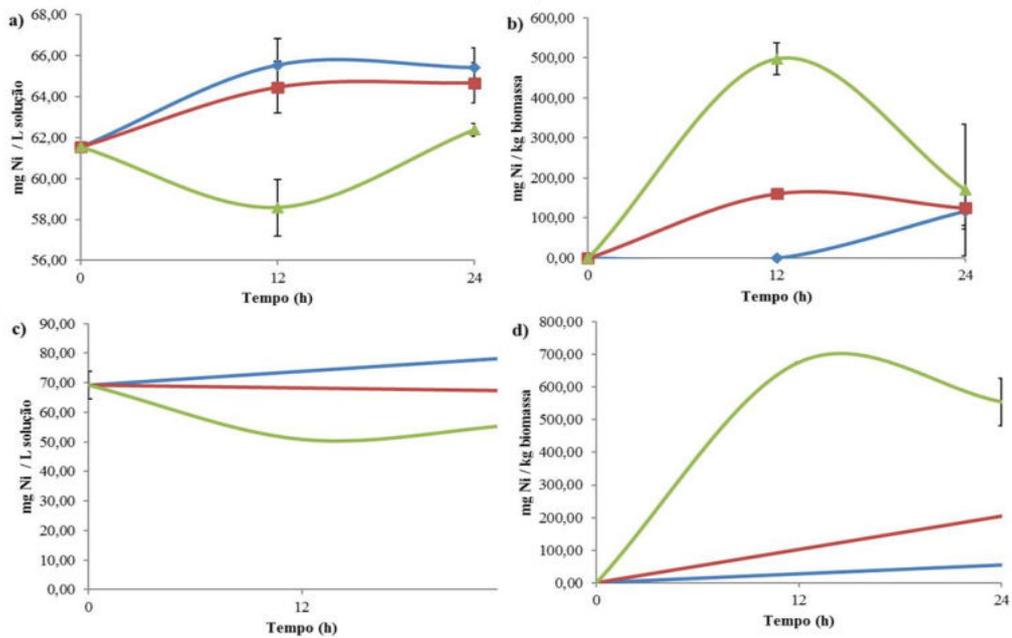


FIGURA 31

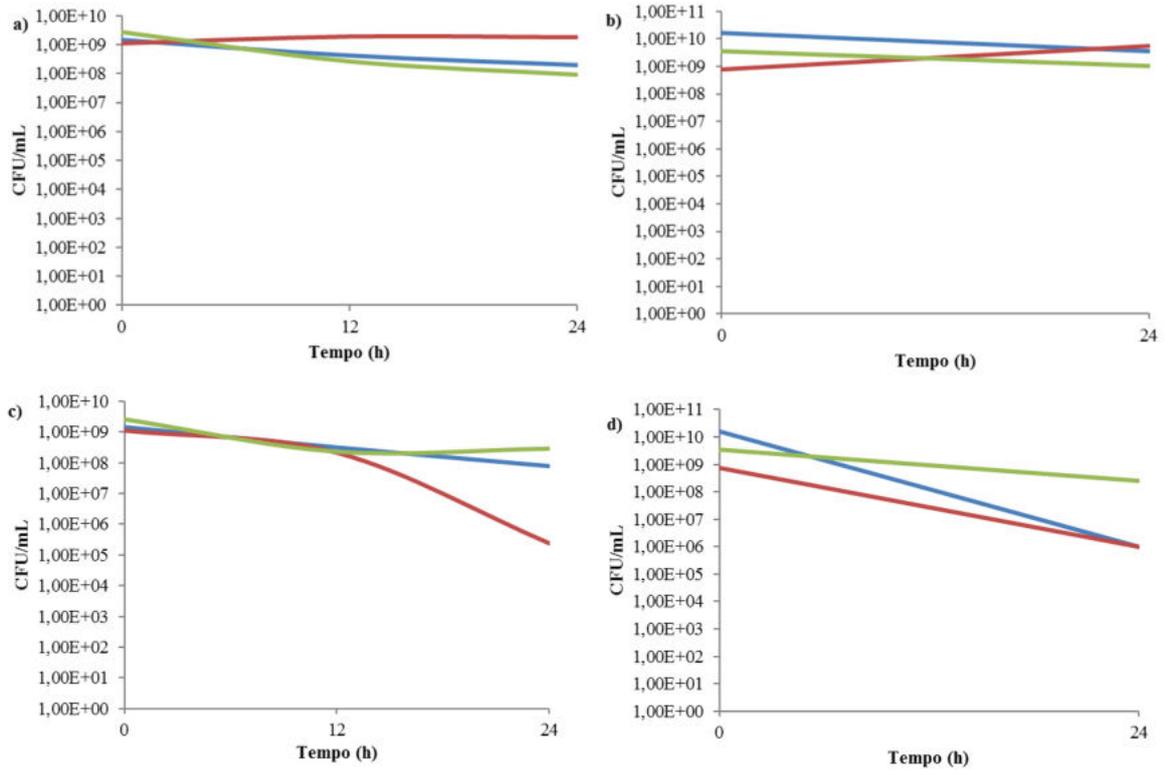


FIGURA 32

## Resumo

ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO COM PROTEÍNAS DERIVADAS DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *CRASSOSTREA*, PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE UM AMBIENTE COMPREENDENDO METAIS PESADOS, E PROCESSO DE BIOMINERAÇÃO DE UM AMBIENTE COMPREENDENDO METAIS PESADOS

A presente invenção descreve organismos geneticamente modificados capazes de expressar um gene sintético com múltiplas cópias dos domínios de ligação de metal da metalotioneína de *Crassostrea rhizophorae*. Este novoorganismo é capaz de remover metais pesados de ambientes como solos, fluidos naturais e industriais. A presente invenção também descreve um produto para a biorremediação que contém este organismo e a um processo de biorremediação de ambientes compreendendo metais pesados. A presente invenção ainda descreve um produto para a biomineração que contém este organismo e a um processo de biomineração de metais pesados.