JESSICA PAOLA FUENTES RIVERA NAVARRO

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
LINHAGEM DE LEVEDURA DESENHADA PARA A
BIORREMEDIAÇÃO
DE MERCÚRIO**

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

São Paulo
2012

JESSICA PAOLA FUENTES RIVERA NAVARRO

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
LINHAGEM DE LEVEDURA DESENHADA PARA A
BIORREMEDIAÇÃO
DE MERCÚRIO**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Elisabete José Vicente

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Navarro, Jessica Paola Fuentes Rivera.

Construção e caracterização de uma linhagem de levedura
desenhada para a biorremediação de mercúrio / Jessica Paola
Fuentes Rivera Navarro. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Elisabete José Vicente.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética de Microorganismos.

Versão do título para o inglês: Construction and characterization of a
yeast strain designed for mercury bioremediation.

1. Levedura 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. MerR 4. Biosorção 5.
Mercúrio I. Vicente, Profa. Dra. Elisabete José II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan
III. Título.

ICB/SBIB0165/2012

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

Candidato(a): Jessica Paola Fuentes Rivera Navarro.

Título da Tese: Construção e caracterização de uma linhagem de levedura desenhada para a biorremediação de mercúrio.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **404/10** referente ao projeto intitulado: *“Construção de leveduras especialmente desenhadas para a biorremediação de mercúrio”* sob a responsabilidade de **Jessica Paola Fuentes Rivera Navarro**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 28 de junho de 2010.

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

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

Dedico este trabalho a meus pais
pelo amor incondicional, pela força
e os ensinamentos
ao longo da vida

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por iluminar meus caminhos.

A minha família, meus pais Manuel e Teresa, meus irmãos Carlos e Sofia, meus cunhados Pilar e Jesus, e meus amados sobrinhos-filhos: Manuel, Alvaro e Julio, sem o amor de vocês e o apoio incondicional houvesse sido impossível realizar este sonho.

À professora Dra. Elisabete José Vicente pela oportunidade, orientação e confiança nesses anos.

À professora Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg pela atenção e colaboração científica.

Aos Profs. Drs. Jorge Sarkis e Marcos Hortelani pela colaboração nos ensaios de Espectrometria de Absorção Atômica a Vapor Frio.

Aos meus amigos pelo carinho, pelos bons momentos de convívio, pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Aos meus colegas de laboratório de Genética pela ajuda, colaboração e por todo ao longo deste período.

À Leninha, Kazui e Norma pelo auxílio e apoio técnico necessário.

Às secretarias do Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia UPS/Instituto Butantã/IB/ICB/IPT, pela atenção, compreensão e ajuda.

Aos funcionários da biblioteca do ICB/USP pela atenção e correções.

À companhia Vale e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

*“No meio da confusão, encontre a simplicidade.
A partir da discórdia, encontre a harmonia.
No meio da dificuldade reside a oportunidade”*

Albert Einstein

RESUMO

Fuentes Rivera JPN. Construção e caracterização de uma linhagem de levedura desenhada para a biorremediação de mercúrio. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Organismos vivos estão expostos a níveis tóxicos de íons metálicos provenientes de atividades antropogênicas e queima de combustíveis fósseis. O mercúrio (Hg^{2+}) é um dos metais mais tóxicos para o desenvolvimento do sistema nervoso do feto e de crianças. Para a biorremediação de mercúrio, um candidato promissório é a proteína metaloreguladora MerR, que exibe alta afinidade e seletividade ao íon Hg^{2+} . O presente trabalho visou a construção de uma linhagem recombinante de levedura que apresentasse a proteína MerR ancorada à sua superfície celular externa, utilizando a região C-terminal da proteína Flo1p, como âncora. Para que este objetivo fosse atingido, numa primeira etapa, o gene *merR* foi amplificado por PCR utilizando como molde o DNA total da bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEMT-Flo428, obtendo-se o plasmídeo recombinante pGEMT-MF, que contem a fusão gênica “*merR*-Flo428”. A seguir, o fragmento de DNA “*merR*-Flo428” foi clonado a jusante da sequência sinal do fator alfa (SS) no vetor de expressão e excreção de *P. pastoris* pPIC9K, gerando o plasmídeo recombinante pPIC9KMF. O fragmento de DNA “SS-*merR*-Flo428” foi inserido no vetor de expressão de *S. cerevisiae* pMA91, entre as sequências codificadoras do promotor e terminador de transcrição do gene da *fosfoglicerato quinase* (*PGK*) de *S. cerevisiae*, obtendo-se o plasmídeo recombinante pMA91MF. Esse plasmídeo contendo o cassete de expressão e ancoragem de MerR foi empregado na transformação genética da linhagem de *S. cerevisiae* YPH252. A seleção dos clones transformantes foi realizada por complementação gênica do fenótipo Leu^+ . Confirmou-se o sucesso da ancoragem da proteína MerR à parede celular da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). O plasmídeo pMA91MF confere aumento de resistência aos íons Hg^{2+} de 90 ηM para 120 ηM da linhagem *S. cerevisiae* YPH252. Após 10 min de incubação em presença de 5,0 μM HgCl_2 , a linhagem recombinante YPH252/pMA91MF adsorveu 109,6 μg de Hg^{2+} /g peso seco de célula, equivalente a uma capacidade 54% maior a da linhagem controle YPH252/pMA91. Após 10 min de incubação em presença de 10,0 μM HgCl_2 , a linhagem recombinante adsorveu 173,8 μg de Hg^{2+} /g peso seco de célula, 84% maior que a da linhagem controle (94,5 μg de Hg^{2+} /g peso seco de célula). A rápida adsorção inicial de Hg^{2+} pela linhagem recombinante sugere a ligação do metal à proteína MerR ancorada à superfície celular. Foi observado que a taxa de ligação ao Hg^{2+} atingiu a saturação com o incremento da concentração externa do metal e alcançou a saturação em 15,0 μM de HgCl_2 , após 120 min de incubação. Provavelmente a entrada de Hg^{2+} no interior celular afeta as funções celulares; porém os mecanismos de detoxificação devem estar ainda ativos, e protegem as células do efeito tóxico dos íons Hg^{2+} . Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a construção da linhagem recombinante *S. cerevisiae* YPH252/pMA91MF e a funcionalidade do sistema de ancoragem de MerR à superfície celular de levedura aumentando a bioadsorção de mercúrio pela linhagem recombinante, com potencial para ser utilizada como uma ferramenta biotecnológica para a biorremediação de águas contaminadas com mercúrio.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Ancoragem. MerR. Bioadsorção. Mercury.

ABSTRACT

Fuentes Rivera JPN. Construction and characterization of a yeast strain designed for mercury bioremediation. [Ph.D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Living organisms are exposed to toxic levels of metal ions from a number of sources, both natural and as a result of environmental pollution. Among heavy metals, mercury is highly toxic to the nervous system, particularly the developing nervous system of fetus or young child. Current interest is focused on developing microbial-based biosorbents for the efficient removal of mercury. For mercury bioremediation, one promising candidate would be the bacterial metalloregulatory protein MerR, which exhibits high affinity and selectivity toward mercury. This work describes the construction of recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by anchoring MerR on the cell wall, using the C-terminal region of the Flo1 protein as an anchor. The *merR* gene was PCR amplified from the *Cupriavidus metallidurans* CH34 total DNA. The amplified fragment was inserted in the pGEMT-Flo428 plasmid, obtaining the pGEMT-MF plasmid, which contains the gene fusion “*merR*-Flo428”. This gene fusion was cloned downstream of the α -factor secretion signal peptide coding sequence in the pPIC9K plasmid, obtaining the pPIC9KMF plasmid. The DNA fragment “SS-*merR*-Flo428” was inserted in the *S. cerevisiae* expression vector pMA91 under control of the *S. cerevisiae* 3-phosphoglycerate kinase (PGK) promoter, the resulting plasmid was named pMA91MF. This plasmid carrying the anchoring and expression cassette MerR was used to transform the *S. cerevisiae* YPH252 strain. The transformants were selected by genetic complementation the Leu⁺ phenotype. The display of MerR on the cell surface of recombinant strain YPH252/pMA91MF was confirmed by transmission electron microscopy (TEM). The *Saccharomyces cerevisiae* strain YPH252 transformed with pMA91MF plasmid showed an increased resistance to Hg²⁺ ions from 90 η M to 120 η M. After 10 min of incubation with 5.0 μ M HgCl₂, recombinant strain YPH252/pMA91MF adsorbed 109.6 μ g Hg²⁺/g dry cell weight, 54% higher than the Hg²⁺ binding capacity of control strain YPH252/pMA91. After 10 min of incubation with 10.0 μ M HgCl₂, recombinant strain adsorbed 173.8 μ g Hg²⁺/g dry cell weight, 84% higher than the Hg²⁺ binding capacity of control strain (94.5 μ g de Hg²⁺/g dry cell weight). The rapid initial adsorption of Hg²⁺ suggests an instantaneous binding of Hg²⁺ to MerR anchored on the cell surface of the recombinant yeast strain. It was observed that the binding rate to Hg²⁺ showed saturation with increasing external ion concentrations and reached saturation of HgCl₂ in 15.0 μ M after 120 min of incubation. Probably the input Hg²⁺ inside the cells affected cell function, but detoxification mechanisms are still active, protecting the cells from the toxic effect of Hg²⁺. The results confirm the construction of the recombinant strain YPH252/pMA91MF and functionality of the anchoring system for MerR on the yeast cell surface, increasing the mercury biosorption by recombinant yeast strain, with potential for use as a biotechnological tool for the bioremediation of contaminated water with mercury.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Anchoring. MerR. Biosorption. Hg²⁺.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo bacteriano para a detoxificação de mercúrio e a regulação dos genes <i>mer</i>	29
Figura 2 - Proteína MerR	30
Figura 3 - Alinhamento da proteína MerR de bactérias Gram negativas e Gram positivas mostrando a sequência consenso	31
Figura 4 - Adsorção de íons metálicos em micro-organismos.....	37
Figura 5 - Parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	49
Figura 6 - Componentes estruturais de Glicosilfosfatidilinositol (GPI)	50
Figura 7 - Mecanismo de transporte de proteína ligadora de metal fusionada com o domínio de ancoragem da proteína de parede celular α -aglutinina	51
Figura 8 - Esquema de construção molecular de uma proteína heteróloga expressa e ancorada à superfície celular de levedura <i>S. cerevisiae</i> (“yeast cell surface display”)	52
Figura 9 - Esquema da proteína Flo1p de <i>S. cerevisiae</i>	53
Figura 10 - Fluxograma das etapas realizada	72
Figura 11 - Análise do crescimento final de diferentes linhagens de leveduras ..	73
Figura 12 - Esquema da amplificação por PCR do gene <i>merR</i> sem códon de terminação(460 pb)	75
Figura 13 - Amplificação por PCR do gene <i>merR</i> sem códon de terminação	75
Figura 14 - Clonagem do <i>amplicon merR</i>	77
Figura 15 - Perfis de migração dos produtos de PCR	78
Figura 16 - Subclonagem de <i>merR</i>	79
Figura 17 - Análise de restrição do plasmídeo pGEMT-MF com diferentes enzimas de restrição	80
Figura 18 - Esquema da clonagem da fusão gênica “ <i>merR</i> -Flo428” no vetor pPIC9K e obtenção do plasmídeo recombinante pPIC9KMF	81
Figura 19 - Análises de restrição do plasmídeo pPIC9KMF	82
Figura 20 - Esquema da clonagem do fragmento de DNA “SS - <i>merR</i> - Flo428”	83
Figura 21 - Análise de restrição do plasmídeo pPIC9KMF com a enzima <i>HindIII</i>	84
Figura 22 - Sequência da fusão gênica “SS- <i>merR</i> -Flo428”	85

Figura 23 - Estabilidade do clone recombinante YPH252/pMA91MF ao longo de 50 gerações cultivadas em meio completo YPD	86
Figura 24 - Determinação de MIC das linhagens transformantes de levedura	87
Figura 25 - Crescimento celular das linhagens transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	88
Figura 26 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de cortes histológicos de células das linhagens <i>S. cerevisiae</i>	89
Figura 27 - Adsorção de Hg^{2+} pela linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e da linhagem controle YPH252/pMA91	90
Figura 28 - Adsorção de íons Hg^{2+} da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e de sua respectiva linhagem controle, após 10 min de incubação	91
Figura 29 - Capacidade de adsorção de íons Hg^{2+} da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e de sua respectiva linhagem	92
Figura 30 - Viabilidade celular da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e da linhagem controle YPH252/pMA91	93
Figura 31 - Curvas de crescimento da linhagem transformada YPH252/pMA91MF e da linhagem hospedeira não transformada YPH252 (controle)	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites máximos aceitáveis de alguns metais em água destinada ao consumo humano	23
Tabela 2 - Concentrações máximas permitidas para o lançamento de efluentes, de acordo com o CONAMA, Resolução Nº 397, de 03 de abril de 2008	23
Tabela 3 - Alguns micro-organismos geneticamente modificados que expressam citoplasmaticamente peptídeos ligadores de metal.....	36
Tabela 4 - Biossorção de íons metálicos pelas proteínas/peptídeos ancorados à superfície celular de micro-organismos	39
Tabela 5 - Biossorção de alguns íons metálicos em <i>S. cerevisiae</i>	41
Tabela 6 - Sistema de ancoragem de peptídeos ou proteínas ligadores de metal tóxico na superfície celular da levedura <i>S. cerevisiae</i>	54
Tabela 7 - Linhagens de bactéria	56
Tabela 8 - Linhagens de levedura	56
Tabela 9 - Plasmídeos empregados neste trabalho	57
Tabela 10 - Iniciadores utilizados para ampliações de fragmentos de DNA	64
Tabela 11 - Comparação das resistências a HgCl ₂ das diferentes linhagens de levedura	73
Tabela 12 - Comparação da capacidade de bioacumulação de mercúrio das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> descritas na literatura	100

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs - Absorbância

ADE2 - Gene selvagem codificador da fosforibosil aminoimidazol carboxilase, enzima que catalisa o sexto passo na síntese *de novo* nucleotídeos púricos, em *S. cerevisiae*.

Amp^R - Resistência a ampicilina

ATP - adenosina trifosfato

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - ácido desoxirribonucléico

DNTPs - desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

EPA - Environmental Protection Agency

FDA - Unites States food and drug administration

FLO1 - Gene selvagem codificador da proteína de floculação

Flo428 - Fragmento protéico de 428 aminoácidos da região C-terminal de Flo1p

GPI - Glucosilfosfatidilinositol

GSH - Glutathione

HIS3 - Gene selvagem codificador da imidazol glicerol-fosfato desidratase, enzima que catalisa o sexto passo da via de biosíntese de histidina, em *S. cerevisiae*.

IPTG - isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo

kb - quilobases

kDa - quilodaltons

kg - quilogramas

L - litro

LB - Luria-Bertani

LEU2 - Gene selvagem codificador da beta-isopropilmalate desidrogenase, enzima que catalisa o terceiro passo da via de biosíntese de leucina, em *S. cerevisiae*.

LiAc - Acetato de Lítio

MATa - *locus* codificador do feromônio de tipo de acasalamento a

MAT α - *locus* codificador do feromônio de tipo de acasalamento α

mer - operon de resistência a mercúrio

MET - microscopia eletrônica de transmissão

mg - miligramas

mL - mililitros

MIC - concentração inibitória mínima de crescimento

MT - Metalotioneína

ng - nanogramas

pb - pares de bases

RNAse - ribonuclease A

PC - Fitoquelatina

PCR - reação em cadeia da polimerase

PGK - Gene codificador da enzima fosfoglicerato quinase de *S. cerevisiae*

RNAse - Ribonuclease A

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

SD-THUAL - meio mínimo SD suplementado com: **T**imina, **H**istimina, **U**racila, **A**denina e **L**isina

SS - Sequência codificadora do peptídeo sinal

TRP1 - Gene selvagem codificador da fosforibosil antranilato isomerase, enzima que catalisa o terceiro passo da via de biosíntese de triptofano, em *S. cerevisiae*.

U - unidade

µg - microgramas

µL - microlitro

µm – micrometro

URA3 - Gene selvagem codificador da orotidina-5-fosfato descarboxilase (ODCase), enzima envolvida na síntese *de novo* nucleotídeos pirimídicos, em *S. cerevisiae*.

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosídeo

WHO - World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

ELEMENTOS QUÍMICOS

-SH - grupo sulfidríla

Ag⁺ - íon prata

As - arsênio

As⁰ - arsênio elementar

As³⁺ - íon arsênio trivalente ou arsenito

As⁵⁺ - íon arsênio pentavalente ou arsenato

Cd²⁺ - íon cádmio bivalente

Co²⁺ - íon cobalto bivalente

Cu²⁺ - íon cobre bivalente

Hg - mercúrio

Hg⁰ - mercúrio metálico ou elementar

Hg⁺ - íon mercúrio monovalente, ou íon mercurioso

Hg²⁺ - íon mercúrio, ou íon mercúrico

HgCl₂ - cloreto de mercúrio

Mg²⁺ - íon magnésio bivalente

Mn²⁺ - íon manganês bivalente

Ni²⁺ - íon níquel bivalente

Pb²⁺ - íon chumbo bivalente

Sb³⁺ - íon antimônio trivalente

Se²⁺ - íon selênio bivalente

U²⁺ - íon urânio bivalente

Zn²⁺ - íon zinco bivalente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Poluição do meio ambiente por metais altamente tóxicos	21
2.2 Mercúrio como contaminante ambiental.....	24
2.3 Toxicidade do mercúrio	26
2.4 Mecanismo de resistência bacteriana a Hg²⁺ - Operon <i>mer</i>	27
2.4.1 Proteína MerR	29
2.5 Mecanismo de resistência a mercúrio presente em <i>C. metallidurans</i> CH34	31
2.6 Métodos convencionais para remoção de mercúrio	32
2.7 Biorremediação de ambientes contaminados por metais potencialmente tóxicos	33
2.8 Adsorção de íons tóxicos por micro-organismos.....	36
2.8.1 Acumulação intracelular de íons metálicos: Bioacumulação	37
2.8.2 Biossorção	37
2.9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.9.1 <i>S. cerevisiae</i> como biossorvente	41
2.9.2 Mecanismos de toxicidade inducidos por íons metálicos	43
2.9.2.1 Estresse oxidativo	43
2.9.2.2 Impacto sobre proteínas e enzimas	44
2.9.3 Sistemas de detoxificação de metal	45
2.9.3.1 Efluxo de íons de metais tóxicos	45
2.9.3.2 Transporte de metais para o vacúolo	46
2.9.3.3 Proteínas e peptídeos ligadores de metal	47
2.9.4 Sistema “cell surface display” em <i>S. cerevisiae</i>	48
2.9.5 Sistema ancoragem de peptídeos ou proteínas com afinidade a metal tóxico na superfície celular da levedura <i>S. cerevisiae</i>	53
3 OBJETIVO	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Linhagens de micro-organismos	56
4.2 Plasmídeos	57

4.3 Meios de cultura para o cultivo de bactérias	57
4.4 Meios de cultura para o cultivo de levedura	58
4.5 Soluções e tampões	59
4.6 Extração de DNA total de <i>C. metallidurans</i> CH34	59
4.7 Extração de DNA plasmidial de bactéria	60
4.7.1 Extração e purificação de DNA plasmidial em escala pequena (“Mini Prep”)	60
4.7.2 Extração e purificação de DNA plasmidial em grande escala (“Maxi Prep”)	60
4.8 Tratamento de DNA plasmidial com enzimas de restrição	61
4.9 Análises do DNA em gel de agarose	61
4.10 Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose	62
4.11 Desfosforilação do DNA	62
4.12 Ligação de fragmentos de DNA	62
4.13 Reação de polimerização em Cadeia do DNA – PCR	63
4.13.1 Amplificação do gene <i>merR</i>	63
4.14 Sequenciamento	64
4.15 Transformação gênica	64
4.15.1 Transformação de células de <i>E. coli</i>	64
4.15.2 Transformação de células de <i>S. cerevisiae</i>	66
4.16 Teste de estabilidade do plasmídeo pMA91MF nas células transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	67
4.17 Análise da viabilidade celular de levedura após incubação em HgCl₂	67
4.18 Curva de crescimento	67
4.19 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Crescimento (MIC)	68
4.20 Microscopia Eletrônica de Transferência (MET)	68
4.21 Análise de adsorção de íons Hg²⁺ pelas células de levedura	69
5 RESULTADOS	71
5.1 Escolha da levedura hospedeira	73
5.2 Clonagem de <i>merR</i> no vetor pGEMT-Flo428	74
5.2.1 Obtenção do gene <i>merR</i> sem o códon de terminação	74
5.2.2 Clonagem de <i>merR</i> no vetor pGEM [®] -T	76
5.3 Subclonagem de <i>merR</i> no vetor pGEMT-Flo428	78
5.4 Clonagem da fusão gênica “<i>merR</i> - Flo428” no vetor pPIC9K	80
5.5 Clonagem do fragmento de DNA “SS - <i>merR</i> - Flo428”	82

5.6 Sequenciamento do fragmento de DNA “SS - <i>merR</i> - Flo428”	84
5.7 Obtenção de colônias transformantes da levedura <i>S. cerevisiae</i>	86
5.8 Análise da estabilidade da linhagem recombinante de <i>S.cerevisiae</i> YPH252/pMA91MF	86
5.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Crescimento (MIC)	87
5.10 Caracterização da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> YPH252/pMA91MF por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	88
5.11 Análise da capacidade de adsorção de íons Hg^{2+} da linhagem recombinante de <i>S. cerevisiae</i>	89
5.12 Análise da viabilidade celular das linhagens recombinantes de levedura após incubação em diferentes concentrações de $HgCl_2$	92
5.13 Curva de crescimento	94
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXO A	126

1 INTRODUÇÃO

Metais potencialmente tóxicos, chamados de metais pesados, são a causa de uns dos principais problemas de poluição ambiental da última década. Atividades industriais, de agricultura e esgotos domésticos são os responsáveis pela poluição do meio ambiente por metais tóxicos; os resíduos de metais produzidos por esses segmentos têm sido indiscriminadamente descartados em corpos d'água ou dispostos no solo sem prévio aviso. Portanto, há uma necessidade para desenvolver tecnologias eficientes para o tratamento e monitoramento de ambientes contaminados por metais que afetam adversamente a saúde humana.

Dentre os metais pesados presentes no ambiente destaca-se o mercúrio, que é altamente tóxico para o desenvolvimento do sistema nervoso do feto e crianças. O emprego de mercúrio metálico (Hg^0) na extração de ouro em garimpo acarreta a liberação de toneladas deste metal no meio ambiente. Em ambientes aquosos, o íon Hg^{2+} é sujeito a metilação, formando metilmercúrio que causa efeitos tóxicos e até letais (Harada, 1995). Um dos casos mais severos de envenenamento por mercúrio ocorreu na Baía Minamata, Japão, em que centenas de pessoas que consumiram peixe contaminado morreram e outras milhares foram afetadas.

No Brasil, as altas concentrações de mercúrio encontradas no ecossistema amazônico foram, via de regra, atribuídas à mineração de ouro, à presença de solos com concentrações relativamente elevadas de mercúrio de origem natural, ao transporte atmosférico e à deposição de mercúrio de origem antrópica (Hacon et al., 1995, 1997; Lacerda, 1995).

Tratamentos convencionais para retirar Hg^{2+} de fontes contaminadas são muitas vezes inadequados para reduzir concentrações Hg^{2+} a níveis aceitáveis. Para a remoção eficiente de íons Hg^{2+} , a tecnologia está se voltando para o desenvolvimento de bioissorventes microbianos. Neste sentido, tanto peptídeos naturais como metalotioneínas e peptídeos sintéticos, como fitoquelatinas sintéticas (por exemplo, EC20), ligadores de metais (Bae et al., 2000, 2001, 2002; Sousa et al., 1998) foram expressos na superfície de células bacterianas para melhorar a remoção por bioissorção de íons mercúrio. Contudo, o problema principal associado com esses peptídeos ricos em cisteínas é a falta de especificidade, que pode causar dificuldade na recuperação específica e reciclagem de íons Hg^{2+} (Bontidean et al., 1998).

Muitas bactérias desenvolvem a resistência a metais potencialmente tóxicos pela indução da expressão de proteínas de resistência (Nies, 1999). No caso específico das bactérias que apresentam alta resistência aos íons mercúrio, vários autores verificaram que estas contem o operon *mer* e que a expressão de enzimas responsáveis pela detoxificação de mercúrio é controlada pela proteína metaloreguladora MerR. A afinidade de ligação da proteína MerR aos íons Hg^{2+} é várias ordens de magnitude maior do que para outros metais potencialmente tóxicos (Bontidean et al., 1998); esta proteína foi relatada por ser altamente específica a íons Hg^{2+} (Frantz, O'Halloran, 1990; Ralston, O'Halloran, 1990).

O presente trabalho visou a construção de uma linhagem de levedura geneticamente modificada que apresenta a proteína metaloreguladora MerR ancorada à sua superfície celular externa. Foi desejado que esta nova linhagem de levedura recombinante fosse capaz de ligar íons Hg^{2+} com alta afinidade e seletividade, melhorando a sua capacidade para realizar biorremediação de águas contaminadas com este íon metálico tóxico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Poluição do meio ambiente por metais altamente tóxicos

A poluição do meio ambiente por contaminantes tóxicos é um dos problemas ambientais mais preocupantes neste século. Dentre esses contaminantes podemos citar os metais potencialmente tóxicos.

As atividades antropogênicas, principalmente atividades industriais, agrícolas e do descarte de resíduos, assim como da queima de combustíveis fósseis são as principais fontes de poluição do meio ambiente por metais potencialmente tóxicos. Esses íons metálicos descarregados na atmosfera, nos ambientes aquáticos e terrestres alteram o equilíbrio dos ecossistemas, mesmo em pequenas concentrações esses metais são uma ameaça. A diferença com os poluentes orgânicos é que eles não podem ser degradados quimica ou biologicamente (Peavy et al., 1988), dificultando sua remoção do meio ambiente.

Além disso, atualmente, cresce assustadoramente o chamado “lixo tecnológico”, tais como televisores celulares, pilhas e componentes de informática que acabam sendo descartados e substituídos por modelos mais novos e sofisticados. O problema é que tais equipamentos contêm muitas substâncias perigosas e tóxicas, principalmente metais potencialmente tóxicos, que, via de regra, atingem lençóis freáticos e solos, contaminando o ambiente e suscitando sérias preocupações sobre o manejo desta nova forma de lixo (Babu et al., 2007).

Os metais potencialmente tóxicos, algumas vezes chamados de metais pesados, são elementos químicos com massa atômica maior que 20 e densidade igual ou superior a 5 g/cm^3 . A presença destes metais na crosta terrestre é menor que 0,1%. Dentre destes, alguns íons metálicos, como o cobalto (Co^{2+}), cobre (Cu^{2+}), manganês (Mn^{2+}), selênio (Se^{2+}) e zinco (Zn^{2+}), são essenciais para o crescimento de organismos eucariotos e procariotos, sendo necessários em concentrações muito pequenas. Contudo, alguns destes íons metálicos, como o chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}), arsênio (As^{3+} e As^{5+}) e urânio (U^{2+}), não são essenciais para o crescimento celular, sendo extremamente tóxicos, mesmo em baixas concentrações (Caziñares, 2000; Da Silva, Do Prado-Filho, 1998).

Os metais pesados, geralmente, tem mais de um estado de oxidação. Esses diferentes estados de oxidação determinam sua mobilidade, biodisponibilidade e

toxicidade. Diante disto, estes metais são tóxicos ou passam a ser tóxicos em determinada concentração ou situação e assim, podem ser considerados, então, metais potencialmente tóxicos.

A ação direta dos metais tóxicos sobre os seres vivos acontece como resultante de bloqueio de atividades biológicas, especificamente pela inativação enzimática, devido à formação de ligações entre o metal e alguns grupos funcionais das proteínas, causando danos irreversíveis em diversos organismos (Vullo, 2003).

As características tóxicas dos metais tóxicos são as seguintes: (1) podem permanecer por um longo período de tempo na natureza; (2) em um determinado ambiente, alguns metais pesados podem ser transformados em espécies mais tóxicas, a partir de espécies menos tóxicas, por exemplo, mercúrio; (3) a bioacumulação e biomagnificação dos metais potencialmente tóxico pela cadeia alimentar pode prejudicar a atividade fisiológica e conseqüentemente por em risco à vida humana; (4) metais podem ser transformados e mudar de um estado de oxidação para outro; porém, não podem ser degradados por nenhum método, incluindo biotratamentos; (5) alguns metais são muito tóxicos, mesmo em baixíssimas concentrações como mercúrio (0,001 mg/L), cádmio (0,005 mg/L) e chumbo ou arsênio (0,01 mg/L), (Alkorta et al., 2004; Volesky, 1990a; Wang, 2002a; Wang, Cheng, 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade; enquanto os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos dos sistemas aquáticos ambientais são legislados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de Março de 2005.

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) controla a emissão de metais tóxicos para o ambiente pelo ar, água e deposição em aterros.

No Tabela 1 são apresentados os limites máximos aceitáveis para alguns metais potencialmente tóxicos em água destinada ao consumo humano, segundo o Ministério da Saúde do Brasil e a EPA dos Estados Unidos.

Tabela 1 - Limites máximos aceitáveis de alguns metais em água destinada ao consumo humano.

Parâmetro	Brasil	Estados Unidos
	(MS Portaria n.º 518, Março 2004)	(EPA 816-F-09-004, Maio 2009)
Arsênio (As)	0,01 mg/L	0,01 mg/L
Cádmio (Cd)	0,005 mg/L	0,005 mg/L
Chumbo (Pb)	0,010 mg/L	0,015 mg/L
Cobre (Cu)	2,0 mg/L	1,3 mg/L
Crômio (Cr)	0,05 mg/L	0,1 mg/L
Mercúrio (Hg)	0,001 mg/L	0,002 mg/L
Zinco (Zn)	5,0 mg/L	5,0 mg/L

Recentemente, o “Conselho Nacional do Meio Ambiente” (CONAMA), estabeleceu novas condições para padrões de lançamento de efluentes (Tabela 2)

Tabela 2 - Concentrações máximas permitidas para o lançamento de efluentes, de acordo com o CONAMA, Resolução Nº 397, de 03 de abril de 2008.

Parâmetro	Valor máximo
Arsênio (As)	0,5 mg/L
Cádmio (Cd)	0,2 mg/L
Chumbo (Pb)	0,5 mg/L
Cobre (Cu)	1,0 mg/L
Crômio hexavalente (Cr)	0,1 mg/L
Estanho (Sn)	4,0 mg/L
Ferro (Fe)	15,0 mg/mL
Mercúrio (Hg)	0,01 mg/L
Níquel (Ni)	2,0 mg/mL
Prata (Ag)	0,1 mg/mL
Selênio (Se)	0,3 mg/mL
Zinco (Zn)	5,0 mg/L

2.2 Mercúrio como contaminante ambiental

O mercúrio é o único metal que se apresenta em estado líquido sob condições normais de temperatura e pressão no ambiente terrestre. Apresenta coloração prateada, e sua abreviatura “Hg” vem do latim *Hydrargyrum* (prata líquida).

O mercúrio é considerado um poluente de alto risco, devida à sua elevada toxicidade e grande mobilidade nos ecossistemas. Este metal pode ser liberado a partir de: fontes naturais como gaseificação da crosta terrestre, emissões vulcânicas e evaporação natural de corpos d' água; e fontes antrópicas, como por exemplo, queima de combustíveis fósseis, fabricação de cimentos, mineração de ouro e prata, etc.

As principais espécies de mercúrio são o mercúrio elementar ou metálico (Hg^0), e as espécies orgânicas e inorgânicas.

O mercúrio elementar (Hg^0) é volátil e é uma espécie química estável na atmosfera, desta forma o vapor de mercúrio pode ser transportado em escala global, afetando áreas remotas naturais longe das fontes pontuais de contaminação.

Os compostos inorgânicos de mercúrio, também chamados de sais de mercúrio são formados a partir da combinação dos íons mercurioso (Hg^+) e mercúrico (Hg^{2+}) com elementos como cloro, enxofre e oxigênio (UNEP, 2002). Na crosta terrestre o mercúrio ocorre naturalmente como sulfeto de mercúrio (HgS), mais conhecido como o minério cinábrio. Por intermédio da desgaseificação da superfície terrestre, incluindo o solo e o oceano, o vapor de mercúrio (Hg^0) é liberado para a atmosfera, sendo importante a participação da atividade vulcânica. Supõe-se que a redução de Hg^{2+} a Hg^0 ocorra, resultante do aquecimento do cinábrio (HgS) na presença de oxigênio, gerando Hg^0 (Castoldi et al., 2003; Clarkson, 1997, 2002; World Health Organization, 1990).

Na forma orgânica, o íon mercúrico (Hg^{2+}) apresenta-se ligado covalentemente ao carbono, formando compostos orgânicos chamados organomercuriais. Entre os compostos orgânicos de mercúrio temos: metilmercúrio, dimetilmercúrio, fenilmercúrio e etilmercúrio, sendo o metilmercúrio (CH_3Hg) e o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) os mais comuns no meio ambiente (UNEP, 2002). A poluição de ambientes aquáticos por mercúrio está associada, especialmente, à possibilidade de metilação de sua forma inorgânica (Hg^{2+}) por bactérias, e à complexação com compostos orgânicos dissolvidos, que possibilitam a manutenção

de concentrações relativamente elevadas na coluna d'água e o acesso preferencial à biota. O metilmercúrio por ser lipossolúvel é muito bem absorvido pelas membranas biológicas em geral, assim como pelos tratos digestivos de praticamente todas as cadeias alimentares. Esses processos facilitam a permanência e o transporte de mercúrio no meio aquático, assim como transferem a contaminação para ecossistemas bastante afastados da fonte de contaminação. Assim, a conversão do mercúrio, da forma inorgânica em orgânica, promove a aceleração da bioacumulação na cadeia alimentar e maximiza os efeitos sobre os riscos em ecossistemas naturais e à saúde humana (Porcella, 1994).

O mercúrio, além de ser altamente tóxico, é o único metal capaz de sofrer biomagnificação em quase todas as cadeias alimentares, isto é, sua concentração aumenta conforme aumenta o nível trófico da espécie (UNEP, 2002). Isso resulta em exposição ambiental, via cadeia alimentar, bastante alta para consumidores de níveis tróficos elevados, incluindo o homem. Comparada a concentração de metilmercúrio (CH_3Hg) existente na água, em relação à encontrada no topo da cadeia trófica, o fator de biomagnificação do mercúrio é da ordem de 1 milhão de vezes (Castoldi et al., 2003; Clarkson, 1997; 2002).

O primeiro desastre ambiental de repercussão mundial que expôs o risco eminente do mercúrio ocorreu por volta de 1953, na Baía de Minamata, sudoeste do Japão. Uma planta química da “Chisso Corporation” utilizava sulfato de mercúrio como catalisador para a produção de ácido acético e seus derivados; e, cloreto de mercúrio como catalisador para produção de cloreto de vinila; sendo que, o metilmercúrio era um subproduto na síntese de acetaldeído (Lacerda, 1997). O metilmercúrio que era despejado no efluente contaminou a biota marinha e águas de sua vizinhança, chegando até a população através da ingestão de peixes e frutos do mar. A “Doença de Minamata” foi oficialmente descoberta em 1956, quando uma criança foi hospitalizada com mãos e pés paralisados, desde então vários casos similares foram encontrados, atingindo níveis epidêmicos, provocando a morte de 887 pessoas.

Com o passar dos anos, os problemas com mercúrio aumentaram devido à contaminação ambiental gerada pelas atividades humanas associadas aos garimpos de ouro, queima de combustíveis fósseis, produção de cloro-soda, emprego de fungicidas mercuriais, fabricação de lâmpadas fluorescentes; com consequente liberação de mercúrio para os sistemas atmosféricos, aquáticos e terrestres.

No Brasil, grandes quantidades de mercúrio são utilizadas para a formação de amálgama na extração de ouro, principalmente na região Amazônica. Uma média de 1,32 kg de mercúrio é usada para cada quilo de ouro produzido (Lacerda, Solomons, 1991). Após sua utilização no processo de extração de ouro, o mercúrio residual é descartado nas margens e nos leitos dos rios, no solo ou é lançado na atmosfera como vapor durante o processo de queima do amálgama. Estando disponível no meio ambiente, o mercúrio pode se transformar em metilmercúrio e entrar na cadeia alimentar de organismos aquáticos, maiores bioconcentradores deste metal (Souza, Barbosa, 2000). Os resultados de pesquisas na Amazônia apontam para níveis preocupantes de mercúrio nos peixes piscívoros, superando em média os limites máximos permitidos para consumo humano estabelecidos pela OMS. Como consequência disto, é também elevada a concentração de mercúrio em amostras de cabelo da população ribeirinha da Amazônia, em cuja dieta o consumo do peixe é predominante.

O desmatamento da Amazônia seguido pela conversão dos solos para diferentes usos que vem ocorrendo desde o início da década de 1970, e agravado a partir do século XXI, também é apontado como uma das causas da remobilização de mercúrio de origem natural ou antrópica. Assim, a erosão e lixiviação do mercúrio presente nos solos e a sua reemissão para a atmosfera mantêm elevadas concentrações no ecossistema amazônico, mesmo após a diminuição do garimpo de ouro (Almeida et al., 2005; Cordeiro et al., 2002; Lacerda, 1995).

2.3 Toxicidade do mercúrio

A toxicidade do mercúrio é devido a sua forte afinidade pelo grupo sulfidrílica (-SH) de enzimas e outras proteínas, causando danos irreversíveis aos sistemas biológicos. O mercúrio tem também afinidade, embora inferior, para se ligar aos grupos carboxila, amida, amina e fosforila das enzimas o que contribui para a sua toxicidade.

A forma orgânica é extremamente tóxica, não apenas para o ser humano, mas também para toda a biota. Devido ao radical orgânico, esta espécie pode entrar rapidamente na corrente sanguínea, causando danos irreparáveis ao sistema nervoso central, afetando principalmente áreas específicas do cérebro, como

cerebelo e lobos temporais. Uma vez no organismo, ele rapidamente se converte em um complexo protéico, mantendo grande mobilidade nos tecidos animais. A lipossolubilidade dos compostos organomercuriais também facilita a sua passagem através dos tecidos. Estes compostos também podem ser absorvidos pela pele, e aproximadamente 100% (comparado com menos de 10% para os compostos inorgânicos) pelo trato gastrointestinal (Micaroni, 2000). A intoxicação por metilmercúrio se caracteriza por ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários), disartria (problemas nas articulações das palavras), parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades das mãos e pés e em torno da boca), visão de túnel (constricção do campo visual) e perda da audição. Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte. O período médio de latência varia, frequentemente, de 16 a 38 dias (Bakir, et al., 1973).

O metilmercúrio pode atravessar também a barreira placentária no feto, causando danos sérios ao feto em desenvolvimento, principalmente a nível neurológico (Schuurs, 1999).

O mercúrio na forma de vapor (Hg^0) pode facilmente atravessar a membrana alveolar até atingir a circulação sanguínea. No sangue, fígado e rins, o mercúrio é oxidado à forma divalente (Hg^{2+}), pela enzima chamada hidrogênio peróxido catalase. Uma vez oxidado, o íon Hg^{2+} é rapidamente distribuído pelo corpo, pela circulação sanguínea, podendo se ligar à albumina e à hemoglobina (Canela, 1995).

Por outro lado, estudos citogenéticos realizados com amostras de DNA de pessoas contaminadas por mercúrio em níveis considerados toleráveis pela Organização Mundial de Saúde (OMS), revelaram aumento significativo de quebras cromatídicas, com a possível interferência nos mecanismos de reparo. Este efeito pode resultar em quebras cromossômicas e em morte celular, o que justificaria o quadro progressivo de deterioração mental nos indivíduos mais altamente contaminados (De Souza, Barbosa, 2000).

2.4 Mecanismos de resistência bacteriana a Hg^{2+} - Operon *mer*

Como resposta aos compostos tóxicos de mercúrio distribuídos globalmente por atividades antropogênicas e geológicas, os micro-organismos desenvolveram sistemas de resistência para sobreviver em ambientes contaminados. Entre eles podem-se destacar bombas de efluxo, quelação por polímeros enzimáticos,

precipitação, biometilação e redução enzimática (Boening, 2000); o último relacionado ao operon *mer*.

Em bactérias, os mecanismos que conferem resistência específica ao mercúrio são, geralmente, organizados em *operons*, denominados operons *mer*. Os operons *mer* foram encontrados em bactérias Gram negativas e Gram positivas isoladas de ambientes diferentes; e, estão localizados em plasmídeos e transposons (Sliver, Phung, 2005; Yurieva et al., 1997). Este mecanismo de resistência envolve a redução enzimática de Hg^{2+} para Hg^0 , forma volátil e menos tóxica (Barkay, 2003; Barkay, Wagner-Döbler, 2005; Silver, Phung, 2005). Essa resposta dos micro-organismos ao íon mercúrio representa uma ferramenta para a remediação de áreas contaminadas por este metal.

Foram descritos principalmente dois tipos principais de operon *mer* : *operon* de baixo espectro *merRTPADE*, que confere resistência ao mercúrio inorgânico, e o *operon* de amplo espectro *merRTPAGBDE* que confere resistência a compostos orgânicos e inorgânicos de mercúrio (Rojas et al., 2011)

O mecanismo de resistência inclui a captação e transporte de Hg^{2+} , pela proteína periplasmática MerP e proteína de membrana interna MerT, respectivamente. MerE é uma proteína de membrana que provavelmente age mediando o transporte de metilmercúrio e Hg^{2+} (Kiyono, Pan-Hou, 1999) para o citoplasma. A redutase citosólica MerA reduz íons Hg^{2+} a mercúrio elementar (Hg^0) (Barkay, 2003; Holtze et al., 2006) O gene *merB* codifica a liase organomercurial que cataliza a clivagem da ligação e C-Hg (Misra, 1992; Moore et al., 1990). Os genes *merG* e *merB* estão envolvidos na detoxificação de compostos organomercuriais (Kiyono, Pan-Hou, 1999). MerR é a proteína de maior afinidade seletiva aos íons Hg^{2+} já descrita e age como ativador ou repressor da transcrição dos genes *mer*, na presença ou ausência de mercúrio, respectivamente (Brown et al., 2003; Permina et al., 2006; Ralston, O'Halloran, 1990). MerD é uma proteína reguladora secundária; em ausência de Hg^{2+} , Mer D forma um complexo ternário com MerR e a região do promotor-operador, reprimindo a expressão dos genes do operon *mer* (Champier et al., 2004).

Resumidamente, em condições de estresse ao mercúrio, MerR induz à expressão dos genes estruturais *mer*; intracelularmente ocorre a redução dos íons Hg^{2+} a Hg^0 , e como Hg^0 é volátil, este sai para fora da célula, e entra novamente nos ciclos biogeoquímicos (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismo bacteriano para a detoxificação de mercúrio e a regulação dos genes *mer*.

MerA, redutase mercúrica; **MerB**, liase organomercúrica; **MerP**, proteína periplasmática ligadora de mercúrio; **MerT**, proteína de membrana interna; **MerG**, proteína periplasmática envolvida na permeabilidade celular de compostos organomercúricos; **MerE**, proteína de membrana, provavelmente transportadora de mercúrio; **MerR**, ativador ou repressor transcricional dos genes *mer* (pentágono preto); **MerD**, co-repressor da ativação transcricional; **Pt**, promotor dos genes *merT* e *merB2*.

Fonte: Modificado de Rojas et al., 2011.

2.4.1 Proteína MerR

A resistência bacteriana a mercúrio é regulada tanto positiva quanto negativamente pela proteína MerR. Esta proteína, assim como outras proteínas metalorreguladoras, responde a mudanças na concentração intracelular de íons Hg^{2+} por uma interação rápida e reversível ao operador.

Dentre as proteínas codificadas pelo operon *mer*, a Mer R apresenta maior afinidade por íons Hg^{2+} , *in vivo* (Condee, Summers, 1992) e *in vitro* (Ralston, O'Halloran, 1990).

A MerR é uma proteína dímérica composta por duas subunidades de 144 aminoácidos, e apresenta três domínios: domínio de ligação ao DNA, na região N-terminal; domínio de ligação ao íon Hg^{2+} , na região C-terminal; e um domínio

intermediário de função desconhecida. Os três resíduos conservados de cisteínas, presentes no domínio de ligação ao íon Hg^{2+} , formam um coordenação trigonal para ligação ao íon Hg^{2+} , promovendo forte interação dos grupos sulfidrilas (-SH) das cisteínas com o íon Hg^{2+} (S-Hg). Uma cisteína (Cys82) está localizada no C82 de um monômero e as outras duas (Cys117 e Cys126) estão localizadas no C117 e C126 do outro (Figura 2) (Qin et al., 2006; Song et al., 2004; Wright et al., 1990a).

Figura 2 - Proteína MerR.

A) Sitio de ligação ao íon Hg^{2+} da proteína Mer R. B) Predição da estrutura tridimensional da proteína MerR ligada ao íon Hg^{2+} . Um monômero está indicado em verde e o outro está indicado em azul claro.

Fonte: Modificado de Registry of standard biological parts, 2010.

Os genes *merR* dos transposons Tn501 de *Pseudomonas aeruginosa* e Tn21 de *Shigella flexneri* foram os componentes mais estudados do operon *mer* (Barkay et al. 2003; Barrineau, 1984; Brown et al. 2003; Hobman, Brown, 1997; Outten et al. 2000; Stanisich et al., 1977; Summers, 1992, 1986). O alinhamento das sequências codificadoras das proteínas MerR de várias bactérias Gram negativas mostra que esta proteína é conservada em cerca de 90% dos 144 aminoácidos; porém estas sequência apresentam variações na região C-terminal e, também, consideráveis diferenças com as sequências codificadoras das proteínas MerR de bactérias Gram positivas (Figura 3) (Brown et al., 2003). No entanto, os três resíduos de cisteína (Cys82, 126 e 117) envolvidos na ligação aos íons Hg^{2+} são conservados em todas as proteínas MerR. Esses resíduos de cisteínas foram originalmente sugeridos como sítios de ligação a Hg^{2+} , e isto foi confirmado por uma variedade de métodos, incluindo mutagênese que promove a troca das cisteínas por alanina ou serina, nas

quais a ativação de MerR dependente de Hg^{2+} foi perdida (Helmann et al., 1990; Shewchuk et al., 1989); e, a espectroscopia demonstrou a ligação S-Hg^{2+} (Watton et al., 1990; Wright et al., 1990b).

Figura 3 - Alinhamento da proteína MerR de bactérias Gram negativas e Gram positivas mostrando a sequência consenso.

Tn501 (<i>P. aeruginosa</i>)	1	MENNLENLTIGVFAKAAGVNVETIRFYORKGLLEDDKPYGSIRRYGEADVIRVRFVKS
Tn21 (<i>Shigella flexneri</i>)	1	MENNLENLTIGVFAKAAGVNVETIRFYORKGLLEDDKPYGSIRRYGEADVIRVRFVKS
pDU1358 (<i>Serratia marcescens</i>)	1	MEKNLENLTIGVFAKAAGVNVETIRFYORKGLLEDDKPYGSIRRYGEADVIRVRFVKS
<i>Thiobacillus</i> sp.	1	MKNVLENLTIGVFAKAAGVNVETIRFYORKGLLEDDKPYGSIRRYGEADVIRVRFVKS
<i>Bacillus</i> sp.	1	~~~~~MKPRIGELADKGVNKETIRFYERIGLIFEPERTEKGYRNYSCQTVRLHFTKRM
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	~~~~~MGKISELAKACIVNKETIRFYERKGLIAGFERNESGYRINSEETADVRFKRM
		↑
Tn501 (<i>P. aeruginosa</i>)	61	QRLGFSLDEIAELLRL...DDGTHCEEASSLAETHKLDVREKMDLARMETVLSELVCA
Tn21 (<i>Shigella flexneri</i>)	61	QRLGFSLDEIAELLRL...DDGTHCEEASSLAETHKLDVREKMDLARMETVLSELVCA
pDU1358 (<i>Serratia marcescens</i>)	61	QRLGFSLDEIAELLRL...DDGTHCEEASSLAETHKLDVREKMDLARMETVLSELVCA
<i>Thiobacillus</i> sp.	61	QRLGFSLDEIAELLRL...DDGTHCEEASSLAETHKLDVREKMDLARMETVLSELVCA
<i>Bacillus</i> sp.	56	QELGFTLLEIDKLLGVDRDEARCRMYDFTILKEDTQKKEEDLKRTERMLMDKERC
<i>Staphylococcus</i> sp.	56	KELEFSLKEIHLLFGVDDQDGECKMYFTVQKTEIERKVQSLRIORLLBELKEKCP
		↑
Tn501 (<i>P. aeruginosa</i>)	119	ARRGNVSCPLIASLCCGASLAGSAMP
Tn21 (<i>Shigella flexneri</i>)	119	ARRGNVSCPLIASLCCGAGLARSAMP
pDU1358 (<i>Serratia marcescens</i>)	119	ARCGNVSCPLIASLCCGEKEPRGADAV
<i>Thiobacillus</i> sp.	119	ARKNNVSCPLIASLKNCAECPGD---
<i>Bacillus</i> sp.	116	ENKDIYECPIIETITLMKK-----
<i>Staphylococcus</i> sp.	116	DEKMYTCPIIETITLMGGPDK-----
		↑

Os resíduos de cisteínas que se ligam ao íon Hg^{2+} estão sinalizados com uma seta.

Fonte: Brown et al., 2003.

2.5 Mecanismo de resistência a mercúrio presente em *C. metallidurans* CH34

Cupriavidus metallidurans CH34 é uma β -proteobactéria quimiolitotrófica, facultativa, Gram-negativa, que foi isolada em sedimentos de tanques de decantação de zinco contaminados com altas concentrações de metais tóxicos (Mergeay, et al., 2003)

Esta linhagem bacteriana possui um cromossomo (3,9 Mb), um megaplasmídeo (2,6 Mb), e dois grandes plasmídeos: pMOL30 (234 kb) e pMOL28 (171 kb) (Monchy et al., 2006). Dentre todas as bactérias conhecidas, esta é a que apresenta os maiores índices de resistência a metais potencialmente tóxicos: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , CrO_4^{-2} , Hg^{2+} , Pb^{2+} . Os genes codificadores das proteínas que conferem resistência a estes metais estão contidos nos plasmídeos e também no cromossomo (Diels et al., 2002; Grass et al., 2005; Mergeay et al., 2003; Taghavi et

al.,1997).

Como já foi citado, o mecanismo básico de resistência a mercúrio, comum em varias bactérias, esta baseado no operon *mer*. Em *C. metallidurans* CH34, o operon *mer* está presente no cromossomo e nos plasmídeos pMOL28 e pMOL30. No plasmídeo pMOL30 o operon *mer* esta em um transposon (Tn4380) e apresenta os genes *merR*, *merT*, *merP*, *merA*, *merD* e *merE* (Mergeay et al., 2003). No plasmídeo pMOL28, o operon *mer* está localizado no transposon (Tn4378) e apresenta grande homologia e a mesma disposição dos genes do operon *mer* do plasmídeo pMOL30 (Champier et al., 2004, Mergeay et al., 2003). No cromossomo, o operon *mer* é composto pelos genes *merR*, *merT*, *merP*, *merA*.

2.6 Métodos convencionais para remoção de mercúrio

A remoção dos metais potencialmente tóxicos presente em efluentes industriais pode ser realizada utilizando técnicas físico químicas como: precipitação, troca iônica, adsorção, oxido-redução, osmose reversa e tratamento eletroquímico (Volesky, 2001).

No caso do mercúrio, os métodos convencionais utilizados para remoção deste metal presente em águas contaminadas são: precipitação, adsorção e filtração por membrana (EPA, 2007).

- Precipitação e/ou co-precipitação: É a técnica utilizada com mais frequência para águas contaminadas com mercúrio. Consiste na utilização de aditivos químicos para ajustar o pH, convertendo o mercúrio dissolvido (solúvel) numa forma insolúvel, resultando em sua precipitação. Os sólidos insolúveis são removidos por clarificação ou filtração. Esta técnica resulta na produção de lama residual que pode requerer um tratamento adicional e subsequente deposição. Esta técnica é economicamente viável em processos de larga escala (EPA, 2007).
- Adsorção: Utiliza colunas contendo sorventes imobilizados. A água contaminada passa através da coluna e o soluto (mercúrio) é adsorvido na superfície do sorvente. Pré-tratamentos são utilizados em sistemas de adsorção para alterar as características de águas não tratadas e melhorar a

efetividade desta técnica. Por exemplo: adsorção pode ser precedida pela filtração para remover os sólidos que podem obstruir a superfície de adsorção, tratamento com UV pode ser utilizado para controlar o crescimento bacteriano e evitar a obstrução e redução da capacidade de adsorção. A adsorção tende ser utilizada com mais frequência quando o mercúrio é o único contaminante, em sistemas relativamente pequenos e como técnica complementar para o tratamento de efluentes em sistemas grandes (EPA, 2007).

- Filtração por membrana: A água contaminada passa através de uma barreira semipermeável ou membrana, separando o mercúrio da água. A membrana permite a passagem de alguns constituintes enquanto bloqueia a passagem de outros. Esta técnica é eficaz para o tratamento de mercúrio. Porém, é utilizada com menos frequência porque seus custos são elevados e produz maior volume de resíduos do que outras metodologias de tratamento de mercúrio. Além disso, é sensível a uma variedade de contaminantes e características da água não tratada, por exemplo: sólidos em suspensão, os compostos orgânicos, colóides, e outros contaminantes podem causar obstruções na membrana (EPA, 2007).

A maioria desses processos apresenta elevados custos, são ineficientes para remoção de baixas concentrações do metal, requerem utilização de aditivos químicos e podem gerar fluxos de resíduos concentrados que devem ser eliminados (Kiyono, Pan-Hou, 2006).

2.7 Biorremediação de ambientes contaminados por metais potencialmente tóxicos

A biorremediação é o processo pelo qual organismos vivos, normalmente plantas e micro-organismos, são utilizados para remover ou reduzir poluentes do meio ambiente (Gaylarde et al., 2005). A biorremediação tem várias aplicações, incluindo a descontaminação de águas subterrâneas, solos, lacunas, lodo e efluentes (Boopathy, 2000).

As tecnologias de biorremediação podem ser classificadas como *ex-situ* e *in-situ*. Tecnologias *ex-situ* envolve a remoção física de material contaminado para o processo de tratamento. Em contraste, a técnica *in-situ* envolve tratamento do material contaminado no local, sendo economicamente mais conveniente e ocasionando menos distúrbios no local (Boopathy, 2000; Vidali, 2001).

A biorremediação oferece várias vantagens: pode ser realizada no local, geralmente sem causar maiores alterações às atividades normais; é uma técnica economicamente viável; os poluentes são eliminados de forma permanente; tem grande aceitação da população e pode ser acoplada a outros tratamentos físicos ou químicos (Boopathy, 2000; Vidali, 2001).

Este processo biotecnológico foi inicialmente empregado para a remoção de poluentes orgânicos. Nos últimos quinze anos houve um aumento nos tipos de contaminantes, sendo a biorremediação uma ferramenta biológica utilizada na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), trinitrobenzeno (TNT) e bifenilas policloradas (PCBs) (Tabak et al., 2005).

Atualmente, as técnicas de biorremediação vêm sendo utilizadas na descontaminação de ambientes poluídos por metais tóxicos, apresentando baixos custos, alta eficiência e especificidade, quando comparadas às técnicas físico-químicas (Chaney et al., 1997; Gadd, 2000; McIntyre, 2003). Ao contrario dos poluentes orgânicos, os metais não podem ser biodegradados, permanecendo por tempo indeterminado no ambiente. Porém, os micro-organismos podem interagir com esses metais e transformá-los de uma forma química para outra que podem ser precipitadas ou volatilizadas em solução (Tabak et al., 2005; Lovely, Coates, 1997).

A interação entre micro-organismos e metais potencialmente tóxicos tem ocorrido desde o início da vida no planeta, há 4 bilhões de anos, o que permitiu a evolução de mecanismos de resistência e adaptação a ambientes contendo elevadas concentrações de metais tóxicos (Silver, Plung, 2005; Valls, Lorenzo, 2002). Alguns destes mecanismos têm sido identificados e estudados para compreensão da homeostase frente à toxicidade do metal e também para a utilização desses mecanismos na biorremediação de ambientes poluídos por metais potencialmente tóxicos.

Os micro-organismos apresentam uma área superficial grande por unidade de volume, fornecendo uma superfície de contato ampla para a interação com íons metálicos no ambiente circundante. Assim, a busca de novas técnicas de

biorremediação para a remoção de metais tóxicos de ambientes contaminados tem sido direcionada para processos de bioissorção. Algas, bactérias, fungos e leveduras são considerados bioissorventes potenciais devido às suas capacidades inatas para adsorver íons metálicos presentes em ambientes poluídos, diminuindo sua concentração em solução (Gadd, White, 1993; Ledin, 2000; Wang, Cheng, 2006). Desta forma, os micro-organismos podem sequestrar os íons de metais dissolvidos em soluções com alta eficiência e rapidez. Portanto, a bioissorção é uma estratégia ideal para o tratamento de grandes volumes de efluentes contendo baixas concentrações de íons metálicos tóxicos (Veglio, Beolchini, 1997; Volesky 1990a; Wang, Cheng, 2006).

Nas últimas décadas, com os avanços em biotecnologia, a biorremediação emprega micro-organismos para remoção de metais potencialmente tóxicos de ambientes contaminados, crescendo rapidamente e ajudando na recuperação ambiental.

Técnicas de engenharia genética podem ser empregadas para aumentar a capacidade inata de micro-organismos para adsorver íons de metais potencialmente tóxicos. A expressão citoplasmática de proteínas e peptídeos ligadores de metais tóxicos em micro-organismos hospedeiros, visa a obtenção de organismos geneticamente modificados com capacidade aumentada de adsorção de metais, para seu uso potencial em biorremediação (Kuroda, Ueda, 2010) (Tabela 3).

Tabela 3 - Alguns micro-organismos geneticamente modificados que expressam citoplasmaticamente peptídeos ligadores de metal.

Micro-organismo	Peptídeo/ Proteína	Íon metálico	Referências
<i>E. coli</i>	MT codificada pelo gene <i>CUP1</i> de levedura	Cd^{2+}	Berka et al. ,1988
<i>E. coli</i>	MT (camundongo)	Hg^{2+} , Ag^{+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}	Hou et al., 1988
<i>E. coli</i>	MT de levedura	Cu^{2+}	Sayers et al., 1993
<i>S. cerevisiae</i>	MerA de <i>E.coli</i>	Hg^{2+}	Rensing et al., 1992
<i>E. coli</i>	MT de <i>Neurospora crassa</i>	Cd^{2+}	Pazirandeh et al., 1995
<i>E. coli</i>	Fusão MT-GST MerT e MerP	Hg^{2+}	Chen, Wilson, 1997b
<i>E. coli</i>	9 repetições consecutivas de MT de <i>Neurospora crassa</i>	Cd^{2+}	Mauro, Pazirandeh, 2000
<i>Caulobacter crescentus</i>	6-His	Cd^{2+}	Xu et al., 2010
<i>E. coli</i> JM109	MT-1 (camundongo)	Hg^{2+}	Ruiz et al., 2011

MT- Metalotioneína; **6-His-** Hexahistidina; **GST-** Glutathione transferase

2.8 Adsorção de íons tóxicos por micro-organismos

A adsorção de íons metálicos de soluções pode ser realizada por micro-organismos, principalmente, por dois mecanismos: um processo ativo dependente do metabolismo, conhecido como bioacumulação; e, um processo passivo, não dependente do metabolismo, chamado de biossorção. Enquanto a biossorção é um fenômeno de superfície, a bioacumulação envolve a passagem de espécies metálicas através da superfície celular e sua acumulação intracelular (Kuroda, Ueda, 2011; Soares, Soares, 2012) (Figura 4A).

Figura 4 - Adsorção de íons metálicos em micro-organismos.

Dois tipos de adsorção microbiana de íons metálicos; bioacumulação (esquerda) e biossorção (direita).

Fonte: Modificado de Kuroda e Ueda, 2011.

2.8.1 Acumulação intracelular de íons metálicos: Bioacumulação

A bioacumulação é um processo lento que acontece somente em células metabolicamente ativas e consiste na captação “uptake” de íons metálicos pelos micro-organismos vivos, esses íons são transportados através da membrana plasmática para o citoplasma, seguido do seu sequestro num compartimento celular. Organismos vivos apresentam intrinsecamente mecanismos de homeostase que mantêm a concentração intracelular de íons metálicos em resposta à concentração destes íons do meio ambiente (Hall, 2002; Perego, Howell, 1997). Neste processo de acumulação intracelular dependente do metabolismo, proteínas queladoras de metal como metalotioneínas (MTs), fitoquelatinas (FTs) e glutationas (GSH) são produzidas pelos micro-organismos como resposta à presença de íons metálicos no meio. Observa-se uma superprodução de proteínas intracelulares ligadoras de metal para acumulação de íons metálicos (Kostal, 2004; Pazirandeh et al., 1998).

Os íons metálicos acumulados por este processo pelas células não podem ser facilmente recuperados sem a ruptura celular e, conseqüentemente, a reutilização do biossorvente celular é impossível. Portanto, a acumulação intracelular é limitada para a recuperação de íons metálicos adsorvidos (Kuroda, Ueda, 2011).

2.8.2 Biossorção

De maneira geral, o processo de biossorção pode ser definido como a interação do material a ser adsorvido (sorvato: átomos, moléculas ou íons) com o

biosorvente (superfície sólida de uma matriz biológica), resultando na acumulação do sorvato na interface do biosorvente e, conseqüentemente, na redução da concentração do sorvato na solução (Gadd, 2009).

A biossorção de íons metálicos à superfície celular de micro-organismos é um processo passivo que acontece por interações físico-químicas entre os íons metálicos e os grupos funcionais presentes na superfície celular. Este mecanismo é independente de metabolismo.

Uma estratégia que vem sendo empregada, visando a construção de micro-organismos melhorados para emprego em recuperação de íons metálicos, é a manipulação da superfície celular microbiana, para se obter aumento da capacidade de sorção, pelas seguintes razões: a sorção de íons metálicos à superfície celular ocorre em um tempo curto e os íons metálicos adsorvidos podem ser facilmente recuperados. A capacidade de sorção da superfície celular é mantida enquanto as moléculas ligadoras de metal estão funcionalmente ativas em células vivas ou mortas. Portanto, as técnicas de engenharia genética que resultam na expressão e ancoragem de proteínas recombinantes, ligadoras de metal, à superfície celular ("cell surface display") apresentam-se como uma estratégia emergente para aumentar a biossorção de íons metálicos (Kuroda, Ueda, 2011).

A superfície celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas foi modificada geneticamente, dotando a superfície das células com funções adicionais para serem utilizadas em diferentes aplicações (Georgiou et al., 1993; Kondo, Ueda, 2004; Lee et al., 2003). Em *E. coli*, *C. metallidurans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, e *S. cerevisiae* vários peptídeos ou proteínas queladoras de metal como metalotioneínas (Kuroda, Ueda, 2003, 2006; Sousa et al., 1998; Valls et al., 2000a), fitoquelatinas (Bae, 2000), proteína metaloreguladora MerR (Bae, 2003), hexa-histidina (Kuroda et al., 2001; Samuelson et al., 2000; Sousa et al., 1996;), peptídeo rico em histidina (Kotrba et al., 1999), peptídeo rico em cisteína (Kotrba et al., 1999) foram expressos de forma a ficarem ancorados com sucesso na superfície celular externa, visando a obtenção de micro-organismos recombinantes para emprego em biorremediação de águas poluídas por metais potencialmente tóxicos (Tabela 4).

Tabela 4 - Biossorção de íons metálicos pelas proteínas/peptídeos ancorados à superfície celular de micro-organismos.

Proteína/peptídeo ligadora de metal ancorada na superfície	Íon metálico	Proteína Ancora	Micro-organismo	Referência
Metalotioneína humana, Metalotioneína de levedura	Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}	LamB	<i>E. coli</i>	Sousa et al., 1998
Peptídeos curtos ligadores de metal	Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}	LamB	<i>E. coli</i>	Kotrba et al., 1999
Hexa-histidina	Cd^{2+}	LamB	<i>E. coli</i>	Sousa et al., 1996
Fitoquelatina	Cd^{2+}	Lpp-OmpA	<i>E. coli</i>	Bae et al., 2000
Seleção do peptídeo	Au^{3+}	LamB	<i>E. coli</i>	Brown S., 1997
Seleção do peptídeo	Cd^{2+}	OmpA	<i>E. coli</i>	Mejare et al., 1998
Seleção do peptídeo	Zn^{2+}	FimH	<i>E. coli</i>	Kjaergaard et al., 2001
Seleção do peptídeo	Co^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Pb^{2+}	FimH	<i>E. coli</i>	Schembri et al., 1999
MerR	Hg^{2+}	Ice nucleation protein	<i>E. coli</i>	Bae et al., 2003
Proteína ligadora de fosfato	H_2PO_4^-	Ice nucleation protein	<i>E. coli</i> <i>P. putida</i>	Li et al., 2009
Variantes de CBD selecionados	Ni^{2+}	SPA	<i>S. carnosus</i>	Wernerus et al., 2001
Peptídeos Poli-histidil	Cd^{2+} , Ni^{2+}	SPA	<i>S. xylosus</i> , <i>S. carnosus</i>	Samuelson et al., 2000
Metalotioneína de camundongo	Cd^{2+}	IgA β -domain	<i>E. coli</i> <i>R. eutropha</i>	Valls et al., 2000
Hexa-histidina	Cu^{2+} , Ni^{2+}	α -Aglutinina	<i>S. cerevisiae</i>	Kuroda et al., 2001
Metalotioneína de camundongo	Cd^{2+}	α -Aglutinina	<i>S. cerevisiae</i>	Kuroda, Ueda, 2003
ModE	Mo^{2+}	α -Aglutinina	<i>S. cerevisiae</i>	Nishitani et al., 2010
Peptídeo NP com CXXEE	Pb^{2+}	α -Aglutinina	<i>S. cerevisiae</i>	Kotrba, Ruml, 2010

Fonte: Kuroda e Ueda, 2011

Os íons metálicos adsorvidos na superfície celular podem ser recuperados sem ruptura celular. Portanto, é possível fazer a dessorção dos íons e, em seguida, re-utilizar as células novamente no processo de adsorção e recuperação de íons metálicos.

2.9 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos micro-organismos mais estudados e empregados em processos industriais, como, produção de: alimentos, pães, extrato de levedura, suplemento alimentar para ração animal, aroma e sabor

de alimentos, bebidas (cerveja, vinho, cachaça, bebidas destiladas em geral), glicerol, e álcool combustível. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, tanto a levedura *S. cerevisiae* como outras leveduras relacionadas ganharam ainda mais importância biotecnológica, devido aos seus potenciais de produção de várias proteínas heterólogas (Walker, 1998).

Ainda, *S. cerevisiae* é reconhecida pelo FDA americano ("Food and Drug Administration" Department USA) como um organismo seguro, "GRAS" ("Generally Recognized As Safe"), para ser empregado como suplemento alimentar para humanos e animais, não oferecendo riscos de contaminação por substâncias tóxicas ou alergênicas normalmente presentes em outros micro-organismos (Romanos et al., 1992).

A levedura *S. cerevisiae* pertence ao Reino Fungi; filo: Ascomycota; classe: Saccharomycetes; ordem: Saccharomycetales; família: Saccharomycetaceae; gênero: *Saccharomyces* spp; espécie: *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (Gouffeau et al., 1996).

Por ser um organismo unicelular, *S. cerevisiae* apresenta as mesmas facilidades de manipulação e condições de crescimento que as bactérias. Porém, apresentam também uma série de vantagens adicionais, no que se refere à produção de proteínas heterólogas, entre elas: ambiente intracelular favorável à correta formação das proteínas; e, a capacidade de processar modificações pós-traducionais para produção de proteínas heterólogas, como: glicosilação, acilação e fosforilação (Kukuruzinska et al., 1987; Miyamoto et al., 1985; Towler et al., 1988). Estas características contribuem para a manutenção da integridade estrutural, solubilidade, atividade biológica e localização celular de proteínas recombinantes.

A partir da primeira publicação mostrando a expressão de um gene heterólogo em *S. cerevisiae* (Hitzeman et al., 1981), esse micro-organismo vem sendo empregado frequentemente como sistema hospedeiro (Romanos et al., 1992). A extensão e diversidade de produtos expressos nesse micro-organismo são significativas, variando desde simples enzimas a hormônios, fatores de crescimento, proteínas sanguíneas ou estruturas complexas como anticorpos (Hadfield et al., 1993). Desta forma, os produtos obtidos não estão limitados a processos fermentativos tradicionais, mas abrangem diversos setores como alimentar, químico, enzimático, farmacêutico, agricultura e ambiente (Walker, 1998).

2.9.1 *S. cerevisiae* como bioissorvente

A biomassa de leveduras foi utilizada como bioissorvente para remoção de metais íons metálicos como Ag^+ , Au^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , U^{2+} e Zn^{2+} de soluções aquosas (Tabela 5). Leveduras do gênero *Saccharomyces* e *Candida* são eficientes bioissorventes para remoção de metais potencialmente tóxicos. A maioria das leveduras pode sorver uma vasta gama de íons metálicos ou ser estritamente específica em relação a um íon (Wang, Cheng, 2009).

Tabela 5 - Bioissorção de alguns íons metálicos em *S. cerevisiae*.

Tipo de metal	Metal	Referências
Metal Tóxico	Pb^{2+}	Goksungur et al., 2005, Özer, Özer, 2003; Suh et al., 1999a,b;
	Cu^{2+}	Bakkaloglu et al. ; , 1998Wang, 2002b
	Zn^{2+}	Bakkaloglu et al., 1998
	Cd^{2+}	Gomes et al., 2002; Park et al., 2003 ;Vasudevan et al., 2003; Goksungur et al., 2005;
	Hg^{2+}	Al-Saraj et al., 1999; Zhu et al., 2004
	Co^{2+}	Al-Saraj et al. 1999
	Ni^{2+}	Bakkaloglu et al., 1998; Özer, Özer, 2003
	Cr^{3+}	Ferraz et al., 2004; Özer, Özer, 2003; Rapoport, Muter, 1995;
	As^{3+}	Nguyen-nhu, Knoop, 2002
Metais Preciosos	Pd^{2+}	Liu et al., 2003a; Xie et al., 2003a
	Pt^{4+}	Xie et al., 2003b
	Au^{3+}	Karamushka, Gadd, 1999; Lin et al., 2005
	Ag^+	Bustard, McHale, 1998; Simmons, Singleton, 1996
Radionuclídeos	U^{2+}	Kedari et al., 2001
	^{241}Am	Liu et al., 2003b
	Sr	Avery, Tobin, 1992
	U^{2+}	Nakajima, 2001; Popa et al., 2003; Riordan et al., 1997
	Se, Sb^{3+}	Pérez-Corona et al., 1997
	U, Sr, Cs	Kapoor, Viraraghavan, 1997

Fonte: Wang e Cheng, 2006

Quando a levedura *S. cerevisiae* é incubada em presença de metal, a parede celular é a primeira estrutura celular que entra em contacto com os íons metálicos. Inicialmente a captação de metal pela célula acontece através da interação com os grupos funcionais presentes na parede celular, incluindo fosfato, carboxila, amina e

espécies fosfodiéster. Essas interações ocorrem por troca iônica, complexação e adsorção (através de forças de van der Waals ou eletrostática) (Liu et al., 2002; Volesky, 1990a, b; Wang, Cheng, 2006).

Dentre as leveduras *S. cerevisiae* é mais empregada em estudos de bioissorção porque apresenta características únicas em comparação com outros micro-organismos para remoção de metal. Segundo Wang e Cheng (2006), as vantagens que tornam esta levedura interessante para processos de bioissorção são:

- 1) Podem ser cultivadas em grande escala, podendo crescer facilmente utilizando técnicas de fermentação não sofisticadas, em meio de cultura de baixo custo;
- 2) A biomassa de *S. cerevisiae*, como um subproduto, pode ser obtida facilmente, em grandes quantidades a partir de várias indústrias de fermentação (cervejeira, de alimentos, produção de etanol combustível), quando comparadas com outros tipos de biomassa microbiana residual. Ao contrário de outras biomassas, as células de levedura obtidas de indústrias de fermentação são estáveis e não são necessários tratamentos drásticos associados a processos de recuperação de produtos primários. Por exemplo, a biomassa de fungos utilizada na indústria farmacêutica necessita de tratamentos com solventes, que podem afetar o desempenho de sua capacidade de remoção de metal;
- 3) Como é um organismo GRAS, este fato aumenta a viabilidade do uso desta biomassa em processos de biorremediação.
- 4) A levedura *S. cerevisiae* foi utilizada como modelo eucarioto para pesquisas de bioissorção de íons metálicos tóxicos, incluindo os estudos de interação micro-organismos-íons;
- 5) A utilização desta levedura como sistema modelo é particularmente atrativa devido à fácil manipulação genética e a disponibilidade da sequência genômica completa (Perego, Howell, 1997). Os conhecimentos acumulados sobre a biologia molecular desta levedura são úteis para identificar os mecanismos moleculares de bioissorção na remoção de íons metálicos;
- 6) A característica de floculação apresentada por *S. cerevisiae* facilita a separação das células do efluente tratado, pela indução de formação de agregados (flocos), Esta propriedade intrínseca torna desnecessário o uso de

técnicas de imobilização celular ou processos de separação sólido-líquido (Soares, Soares, 2012).

Todas essas vantagens fazem da biomassa de levedura uma ferramenta promissória em processos de biorremediação que visam a despoluição de águas com metais potencialmente tóxicos.

2.9.2 Mecanismos de toxicidade induzidos por íons metálicos

O impacto de metais e metalóides em sistemas biológicos varia desde serem essenciais a altamente tóxicos. Os parâmetros que influenciam na toxicidade de um metal são: mecanismo de sua captação, estado de oxidação e especiação, distribuição intracelular e interação com várias moléculas. Uma propriedade comum de quase todos os metais tóxicos, incluindo Hg^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} , é sua reatividade com o grupo sulfidril (-SH). Ainda, muitos metais potencialmente tóxicos desencadeiam estresse oxidativo nas células, inibição de funções enzimáticas e alterações da função protéica promovendo alterações na regulação da proliferação, progressão do ciclo celular, diferenciação celular ou apoptose (Beyersmann, Hartwig, 2008; Chen, Shi, 2002; Ercal et al., 2001; Harris, Shi, 2003; Stohs, Bagchi, 1995).

2.9.2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é consequência de níveis tóxicos de espécies reativas derivadas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são principalmente: oxigênio singlete (O_2), íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íon hidroxila (HO^-). As ERO podem atacar e danificar todas as macromoléculas celulares levando principalmente à oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos e danos ao DNA (Halliwell, Gutteridge, 1984). Os íons metálicos como Cd^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} podem induzir estresse oxidativo, pela inibição de enzimas específicas, diminuição de níveis de antioxidantes ou através de outros mecanismos indiretos (Beyersmann, Hartwig, 2008¹ apud Wysocki, Tamas, 2010; Ercal et al., 2001; Stohs, Bagchi, 1995).

¹ Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. Arch Toxicol. 2008;82:493-512.

Em *S. cerevisiae*, os íons Cd^{2+} , As^{3+} , Hg^{2+} e Sb^{3+} são detoxificados, pelo menos em parte, pela ligação do íon metálico ao grupo sulfidríla da glutatona (GSH) e subsequente transporte do complexo metal-GSH para o interior de vacúolos (Ghosh et al., 1999; Gueldry et al., 2003; Li et al., 1997). Esta via de detoxificação pode levar à redução dos níveis de GSH no citosol. A depleção de GSH reduziria a atividade de enzimas dependentes de GSH, tais como glutatona peroxidase, glutatona S-transferase e glutaredoxina, que estão envolvidas em mecanismos de defesa contra estresse oxidativo e funções celulares essenciais. No entanto, as concentrações de metal suficientemente altas para serem tóxicas, podem ainda serem muito baixas para promover a diminuição significativa dos níveis de GSH citosólico. Por exemplo, em levedura a concentração citosólica de GSH está na faixa milimolar, enquanto que Cd^{2+} já é tóxico na faixa micromolar (Lafaye et al., 2005² apud Wysocki, Tamas, 2010).

2.9.2.2 Impacto sobre proteína e enzimas

Metais tóxicos se ligam à proteínas através do grupo sulfidríla de resíduos de cisteína, inibindo a função enzimática. Por exemplo, em leveduras, metilmercúrio (MeHg) inibe fortemente a glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT), que catalisa a síntese de glutamina-6-fosfato. A superexpressão desta enzima confere às células aumento de resistência a metilmercúrio (MeHg), sugerindo que a GFAT é uma molécula alvo de MeHg (Naganuma et al., 2000).

Análises *in vitro* mostraram que o Cd^{2+} inibe transferases humanas, como glutatona redutase, tioredoxina redutase, tioredoxina, provavelmente pela ligação ao grupo sulfidríla de cisteínas presentes nos sítios ativos destas enzimas (Chrestensen et al., 2000). Essas enzimas protegem às células do estresse oxidativo e sua inibição poderia levar ao incremento dos níveis de ERO.

Também foi observado que a ligação de As^{3+} às proteínas como actina, tubulina, tioredoxina redutase e outras leva a inibição enzimática destas (Hoffman, Lane, 1992; Kitchin, Wallace, 2008; Menzel et al., 1999; Zhang et al., 2007).

²Lafaye A, Junot C, Pereira Y, Lagniel G, Tabet JC, Ezan E, Labarre J. Combined proteome and metabolite profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. J Biol Chem. 2005;280:24723-30.

2.9.3 Sistemas de detoxificação de metal

Em leveduras, os mecanismos de detoxificação de metal estão baseados: 1) na via de exportação do metal localizado no citosol; 2) no sequestro do metal em organelas celulares; e 3) na ligação à proteínas ou peptídeos ligadores de metal. A exportação de metal e compartimentalização em organelas como vacúolo são os mecanismos de detoxificação mais eficientes encontrados. Metais tóxicos podem se ligar a glutathione (GSH), metalotioneínas (MT) e fitoquelatinas (PC), resultando na formação de complexos que podem ser reconhecidos como substratos pelos transportadores para exportação e/ou sequestro vacuolar. Desta forma, as células reduzem a concentração citosólica dos íons metálicos para níveis sub-tóxicos, melhorando a capacidade da célula para sobreviver e se proliferar em um ambiente poluído.

2.9.3.1 Efluxo de íons de metais tóxicos

Enquanto procariotos possuem várias rotas de efluxo de íons metálicos, em *S. cerevisiae* existem apenas duas rotas que foram caracterizadas em detalhe, baseados nas proteínas: Acr3p (também chamado Arr3p) e Pca1p que catalisam respectivamente, o efluxo de As^{3+} (Ghosh et al., 1999; Wysocki et al., 1997) e Cd^{2+} (Adle et al., 2007).

A Acr3p é uma proteína de membrana plasmática e é a principal via de efluxo de As^{3+} em *S. cerevisiae* (Wysocki et al., 1997; Ghosh et al., 1999). As células sem o gene *ACR3* são muito sensíveis a As^{3+} e hiperacumulam As^{3+} , enquanto a superexpressão de *ACR3* diminui, marcadamente, os níveis citosólicos de As^{3+} e melhora a tolerância a este íon (Ghosh et al., 1999; Thorsen et al., 2006; Wysocki et al., 1997). Esses resultados estabeleceram o papel da proteína Acr3p no efluxo de As^{3+} . Linhagens mutantes *acr3* apresentam deficiência na exportação de As^{3+} e maior sensibilidade a este íon (Fu et al., 2009; Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D, Sloma Wysocki R, dados não publicados, apud Wysocki, Tamas, 2010).

A Pca1p é uma proteína transportadora de membrana plasmática e constitui a principal rota de exportação de Cd^{2+} em *S. cerevisiae*, conferindo tolerância pela

redução intracelular da concentração de Cd^{2+} . Ainda, essa proteína, quando é superexpressa, pode sequestrar também Cu^{2+} (Adle et al., 2007).

2.9.3.2 Transporte de metais para o vacúolo

O transporte de metais para o vacúolo é um mecanismo de detoxificação comum em eucariotos. Em *S. cerevisiae*, a proteína de membrana vacuolar Ycf1p (Yeast Cadmium Factor 1), membro da família de transportadores ABC (**A**TP **B**inding **C**assete), catalisa o transporte do complexo metal-glutationa (metal-GSH) para o interior do vacúolo. As células que não apresentam o gene *YCF1* são muito sensíveis a Cd^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} , e moderadamente sensíveis a As^{3+} (Ghosh et al., 1999; Gueldry et al., 2003; Preveral et al., 2006; Song et al., 2003; Szczypka et al., 1994). Porém, estas células crescem normalmente em presença de outros metais (Preveral et al., 2006). *In vitro*, Ycf1p catalisa o transporte ativo do complexo metal-GSH: $\text{As}(\text{GSH})_3$, $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ e $\text{Hg}(\text{GSH})_2$ dentro do vacúolo (Ghosh et al., 1999; Gueldry et al., 2003; Li et al., 1997).

O gene *YCF1* é transcrito em ausência de metal e sua expressão é moderadamente aumentada em presença de Cd^{2+} , Hg^{2+} , As^{3+} , Sb^{3+} , Se^{4+} (Gueldry et al., 2003; Li et al., 1997; Pinson et al., 2000; Sharma et al., 2002; Wysocki et al., 2004). É possível que o nível basal de Ycf1p na membrana vacuolar seja suficiente para mediar a tolerância a metais tóxicos. Assim, a conjugação de íons metálicos à GSH pode representar um passo limitante na aquisição de tolerância. Nesse sentido, o aumento da síntese de GSH pode ser suficiente para promover o aumento do sequestro vacuolar do conjugado metal-GSH, pela ação da proteína Ycf1p (Wysocki et al., 2004).

Além de Ycf1p, existem dois parálogos desta proteína: a Bpt1p e a Vmr1p, localizadas na membrana vacuolar que participam da detoxificação de Cd^{2+} . A função de Bpt1p na resistência a Cd^{2+} é só detectável em células que não apresentam o gene *YCF1*. Portanto, a contribuição de Bpt1p no sequestro vacuolar de Cd^{2+} é menos importante, quando comparada com a proteína Ycf1p (Sharma et al., 2002).

2.9.3.3 Proteínas e peptídeos ligadores de metal

A principal propriedade química de vários metais tóxicos incluindo Cd^{2+} , As^{3+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} é sua capacidade para se ligar fortemente ao grupo sulfidril. Esta propriedade é utilizada pela maioria de organismos para ligar, transportar e detoxificar íons metálicos. Para detoxificação de metais potencialmente tóxicos, leveduras superexpressam peptídeos ricos em cisteína, como metalotioneínas (MT), fitoquelatinas (PC) e/o glutathione GSH; a presença do grupo sulfidril nos resíduos de cisteínas desses peptídeos possibilita a ligação aos íons metálicos tóxicos.

Metalotioneínas

As metalotioneínas são peptídeos citosólicos de baixo peso molecular, em torno de 6-7 kDa, ricas em cisteínas, encontradas em quase todos os organismos e apresentam a capacidade de ligar metais tóxicos. Em *S. cerevisiae* há dois tipos de MT: Cup1p e Crs5p. A Cup1p é um peptídeo composto por 53 aminoácidos que se liga aos íons Cu^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} . Na ausência de metais, a expressão *CUP1* é insignificante; porém, a expressão de *CUP1* é fortemente induzida em altas concentrações de Cu^{2+} (Thiele, Hamer, 1986). Provavelmente, a função principal de Cup1p é a detoxificação de Cu^{2+} . A forte expressão de *CUP1* aumenta a tolerância a Cd^{2+} , protegendo as células da toxicidade promovida por este íon metálico (Ecker et al., 1986).

A Crs5p é uma proteína composta por 69 resíduos de aminoácidos. Na presença de altos níveis de Cu^{2+} , a expressão de Crs5p é elevada, embora em menor grau do que Cup1p. A proteína Crs5p se liga a Cu^{2+} , Cd^{2+} e especialmente a Zn^{2+} (Wysocki, Tamás, 2010).

Fitoquelatinas

As fitoquelatinas (PC) são encontradas em eucariotos e em alguns procariotos. A estrutura geral das PC é $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$; $n = 2-11$). Esses peptídeos são sintetizados a partir de glutathione (GSH), pela ação da enzima PC sintase. As PC constituem a principal via de detoxificação de metal em leveduras e plantas, especialmente para a detoxificação de Cd^{2+} e As^{3+} . A biossíntese de PC é estimulada por vários metais, incluindo Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} e As^{3+} . Em *S. pombe*, a deleção do gene *PC* resulta em um aumento de sensibilidade a As^{3+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} .

(Clemens et al., 1999; 2001; Ha et al., 1999; Wysocki et al., 2003). Portanto, a PC protege às células dos efeitos tóxicos causados pelos metais, através da ligação ao metal tóxico, reduzindo sua reatividade e toxicidade.

Glutathione

A glutathione (GSH) é constituída por três aminoácidos (Glu-Cys-Gli), sendo o grupo sulfidril da cisteína o sítio ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas. GSH é um fator chave na defesa contra o estresse oxidativo e a toxicidade do metal (Grant, 2001; Thomas, Surdin-Kerjan, 1997), além contribui na detoxificação do metal de várias formas: 1) se liga aos íons metálicos formando o complexo (metal-GSH) que pode ser utilizado como substrato pelas proteínas de transporte vacuolar; 2) protege a célula contra oxidação induzida pelo metal; 3) se liga a grupos sulfidrilas de proteínas, protegendo as células da ligação irreversível aos íons metálicos e/ou dano oxidativo.

2.9.4 Sistema “cell surface display” em *S. cerevisiae*

O uso de proteínas naturais de superfície como uma ferramenta para ancoragem de proteínas heterólogas (“cell surface display”) vem apresentando ampla aplicação nas diferentes áreas da ciência. Por meio desta estratégia, diversos peptídeos foram ancorados na superfície dos micro-organismos com variadas finalidades como a produção de anticorpos, biocatalizadores, biossorventes celulares, entre outros (Wernéus; Ståhl, 2004).

O emprego desta estratégia permitiu a construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* que apresentaram uma proteína heteróloga, com atividade catalítica, ancorada à sua superfície celular externa. Estas linhagens foram chamadas de “células de leveduras armadas” (“arming yeast cells”) (Schreuder, 1996; Van der Vaart et al., 1997; Ueda, Tanaka, 2000a; Lee et al., 2003; Kondo, Ueda, 2004).

A parede celular de *S. cerevisiae* é uma estrutura rígida de aproximadamente 200 nm de espessura; e é formada por três componentes principais: 1) glucana é um polímero de β -1,3 e β -1,6 glicose; β -1,3 glucana forma uma rede fibrosa; e, a β -1,6 glucana é amplamente ramificada. Estes componentes estão localizados na camada interna, conferindo rigidez e flexibilidade à estrutura celular; 2) quitina é um

polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina, e está localizada na camada interna formando um complexo com a β -1,3 glucana; 3) manoproteínas altamente glicosiladas, que estão situadas na camada externa da parede celular, conferindo porosidade a esta. Existem dois tipos de manoproteínas: as fracamente associadas por ligações não covalentes à componentes da parede celular, que podem ser extraídas com dodecil sulfato de sódio (SDS); e, as firmemente associadas por ligações covalentes, que são somente passíveis de extração pela lise da parede celular com glucanases (Fleet, 1985; Klis, 1994). A parede celular de *Saccharomyces sp.* contém mais de 20 tipos de manoproteínas que desempenham papéis diferentes na construção, preservação, modificação da estrutura celular e interação das células, como por exemplo, as interações intercelulares durante a aglutinação ou floculação (Lipke, Ovalle, 1998; Mrsa et al., 1999; Mrsa, Tanner, 1999) (Figura 5).

Figura 5 - Parede celular de *S. cerevisiae*.

A. Componentes estruturais da parede celular; **B.** Associação dos componentes da parede celular de *S. cerevisiae*.

Fonte: Modificado de Lipke e Ovalle, 1998.

Várias manoproteínas de *S. cerevisiae*, como: Aga1 (Lipke et al., 1989); Aga1 (Roy et al., 1991); Flo1 (Watari et al., 1994); Sed1 (Hardwick et al., 1992); Cwp1, Cwp2, Tip1, Tir1/Srp1 (Van der Vaart et al., 1995) estão ligadas à uma estrutura denominada Glicosilfosfatidilinositol (GPI). A GPI foi encontrada em várias proteínas

de membrana plasmática de eucariotos (Cross, 1990; Dustin et al., 1987; Fredette et al., 1993; Homans et al., 1988). Sua estrutura é altamente conservada nos diferentes organismos (Ferguson, Williams, 1988). A estrutura central da GPI de leveduras é composta de: etanol-amino fosfato, manose (α -1,2), manose (α -1,6), manose (α -1,4), glicosamina (GlcN), e inositol-fosfolipídio (Ueda, Tanaka, 2000) (Figura 6). A parte glicofosfolipídica de GPI é ligada, covalentemente, à região C-terminal das manoproteínas e a sua função principal é permitir uma associação estável entre a manoproteína e a membrana plasmática. O peptídeo ou proteína heteróloga é fusionado à manoproteína, que funciona como âncora, para ser imobilizado na superfície celular da levedura. A maioria dos sistemas “cell surface display” em leveduras utilizam manoproteínas que apresentam domínio de ligação a GPI (Lee et.al., 2003).

Figura 6 - Componentes estruturais de Glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Man (manose); **GlcNH₂**, glicosamina
 Fonte: Modificada de Ueda e Tanaka, 2000.

Estudos realizados com a proteína de adesão celular α -aglutinina permitiram propor uma hipótese para o mecanismo de ancoragem das manoproteínas à parede celular: a manoproteína é expressa na forma de um precursor protéico, que permanece ligado à membrana do retículo endoplasmático (RE) pela sua extremidade hidrofóbica carboxi-terminal; enquanto que, a região amino-terminal permanece no lúmen do RE. Em menos de um minuto, a sequência carboxi-terminal

é clivada por uma transamidase no sítio ω (cerca de 12 aa do carboxi terminal) e, nesta posição, é formada uma ligação covalente com a estrutura GPI (Ueda, Tanaka, 2000). Uma vez que a proteína se liga covalentemente a GPI, esta é direcionada pelo peptídeo sinal através da via secretora, até a membrana plasmática, onde uma porção é clivada pela fosfatidilinositol-fosfolipase (PI-PLC). O restante da proteína é transferido para a superfície externa da parede celular, formando uma ligação com a glicana da parede celular (Figura 7) (Kapteyn et al., 1996; Kuroda, Ueda, 2011; Lu et al., 1994,1995).

Figura 7 - Mecanismo de transporte de proteína ligadora de metal fusionada com o domínio de ancoragem da proteína de parede celular α -aglutinina.

Fonte: Modificada de Kuroda e Ueda, 2011.

Nos sistemas descritos, a proteína heteróloga ancorada à superfície celular foi fusionada a um peptídeo sinal, que direciona o transporte da proteína para a superfície celular; e, a uma manoproteína de parede celular, como: α -aglutinina (Aga1), proteína Flo1p, proteína Cwp2 (Murai et al., 1997; Nakamura et al., 2001; Ueda, Tanaka, 2000; Van der Vaart et al., 1997). Desta forma, a proteína heteróloga foi transportada e ancorada à superfície celular externa da levedura *S. cerevisiae* (Figura 8).

Figura 8 - Esquema de construção molecular de uma proteína heteróloga expressa e ancorada à superfície celular de levedura *S. cerevisiae* ("yeast cell surface display").

Fonte: Modificada de Ueda e Tanaka, 2000.

Dentre os sistemas de ancoragem de proteínas heterólogas à superfície celular em *S. cerevisiae*, destaca-se a Flo1p que é uma manoproteína responsável pela floculação (Murai et al., 1997; Sato et al., 2002 (Miki et al., 1982; Teunissen et al., 1993)). Este fenômeno consiste na agregação das células em flocos e sua subsequente remoção do meio de fermentação, por sedimentação.

A proteína Flo1p é codificada pelo gene *FLO1*, rica em serina e treonina, e é composta por 1536 aminoácidos. Devido ao número elevado de possíveis sítios de O e N-glicosilações, a Flo1p apresenta uma conformação estendida, rígida, tipo bastão, atravessando a parede celular e expondo a região N-terminal ao exterior da superfície celular (Watari et al., 1994). A proteína Flo1p é composta por vários domínios: sequência sinal de excreção (presente na região amino terminal); domínio

funcional da floculação, que se repete por 18 vezes; e, domínio de ligação a GPI (presente na região carboxi terminal), responsável pela ligação desta proteína à superfície celular (Miki et al., 1982; Sato et al., 2002; Teunissen et al., 1993; Watari et al., 1994) (Figura 9).

Figura 9 - Esquema da proteína Flo1p de *S. cerevisiae*.

SS, sequência sinal; **DF**, domínio funcional de floculação; **GPI**, sequência de ligação a GPI.
Fonte: Modificada de Sato et al., 2002.

Em 2002, Sato et al., desenharam âncoras de diferentes tamanhos, na região C-terminal de Flo1p e demonstrou que as âncoras de 428 aminoácidos, chamadas de FS, e de 1326 aminoácidos, de FL, são consideradas as mais eficazes para ancoragem de proteínas heterólogas à superfície celular externa de levedura.

2.9.5 Sistema ancoragem de peptídeos ou proteínas com afinidade a metal tóxico na superfície celular da levedura *S. cerevisiae*

O interesse no desenvolvimento de biossorventes, utilizando micro-organismos como adsorventes de íons metálicos, foi crescendo nos últimos anos devido a seu potencial na descontaminação de águas poluídas com íons metálicos tóxicos (Gadd, White, 1993; Ledin, 2000).

A superfície celular de *S. cerevisiae* é uma interface funcional entre o interior e o exterior da célula, e está em contato com moléculas do meio ambiente. Portanto, essa estrutura passou a ser interessante para bioadsorção de íons metálicos em ambientes poluídos por metais potencialmente tóxicos (Sousa et al., 1996, 1998).

O sistema ancoragem de peptídeos/proteínas ligadoras de metal na superfície externa de *S. cerevisiae* ("cell surface display") possibilitou a construção de bio sorventes para a remoção de íons metálicos tóxicos (Kuroda, Ueda, 2011) (Tabela 6). O aumento da adsorção na superfície celular, utilizando técnicas de engenharia genética, tem vantagens quando comparada à acumulação intracelular convencional, por exemplo, os íons adsorvidos na superfície celular podem ser facilmente recuperados sem ruptura da célula. Assim, é possível a reutilização dos bio sorventes celulares para a adsorção de íons metálicos.

Tabela 6 - Sistema de ancoragem de peptídeos ou proteínas ligadores de metal tóxico na superfície celular da levedura *S. cerevisiae*.

Peptídeo ou Proteína ligadora de metal	Proteína âncora	Eficiência de remoção do metal	Referência
Hexa histidina -Takamilase	Cwp 1p	Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} = Aumento de 1,6-1,8 vezes	Kambe-Honjoh et al., 2000
Hexa histidina	α -aglutinina	Cu^{2+} = Aumento de 3 - 8 vezes	Kuroda et al., 2001
Peptídeo rico em histidina (HP ₃)	α -aglutinina	Zn^{2+} = Aumento de 20%	Vinopal, Kotrba, 2007
Peptídeo rico em cisteína (CP ₃)	α -aglutinina	Cd^{2+} = Aumento de 30%	Vinopal, Kotrba, 2007
YTM - Hexa histidina YTM = Metalotioneína de levedura	α -aglutinina	Cd^{2+} = Aumento considerável	Kuroda, Ueda, 2003
YTM ₄	α -aglutinina	Cd^{2+} = Aumento de 5,9 vezes	Kuroda, Ueda, 2006
YTM ₈	α -aglutinina	Cd^{2+} = Aumento de 8,7 vezes	Kuroda, Ueda, 2006

Com base no que se conhece sobre a proteína MerR, proteína com a maior afinidade para ligação aos íons Hg^{2+} ; e, a utilização da proteína Flo1p como âncora para imobilização de proteínas heterólogas na parede celular de *S. cerevisiae*, a proposta deste trabalho foi a construção de linhagem recombinante de *S. cerevisiae*, que expressa MerR ancorada à superfície celular, especialmente desenhada para a biorremediação de mercúrio.

3 OBJETIVO

Construir uma linhagem recombinante de levedura que apresentasse capacidade aumentada de adsorção de íons mercúrio (Hg^{2+}) empregando a estratégia de expressão da proteína metaloreguladora MerR ancorada à sua superfície celular externa. Para que este objetivo fosse atingido, seria construída uma fusão gênica do gene *merR* de *Cupriavidus metallidurans*, que apresentasse elevada afinidade e seletividade para íons mercúrio, com um fragmento do gene *FLO1* (que codifica a região C- terminal da proteína Flo1p), utilizado como âncora.

Objetivos específicos:

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Escolha da levedura hospedeira.
- Amplificação por PCR do gene *merR*, empregando como molde DNA total de *C. metallidurans*;
- Clonagem do *amplicon merR* no vetor pGEMT-Easy;
- Subclonagem de *merR* no vetor pGEMT-Flo428; resultando na construção da fusão gênica *merR*-Flo428, mantendo-se a correta fase de leitura;
- Clonagem da fusão ***merR*-Flo428** no plasmídeo pPIC9K; resultando na construção da fusão do gene codificador da sequência sinal do fator alfa (SS) de *S. cerevisiae* com a sequência codificadora *merR*-Flo428;
- Clonagem da sequência **“SS-*merR*-Flo428”** no plasmídeo pMA91, entre as sequências codificadoras do promotor e terminador de transcrição do gene da *fosfoglicerato quinase* (*PGK*); resultando na construção do cassete de expressão e ancoragem: “pPGK-SS-*merR*-Flo428- tPGK”;
- Transformação genética de *S. cerevisiae* com o cassete de expressão e ancoragem **“pPGK-SS-*merR*-Flo428-tPGK ”**;
- Avaliação da capacidade da linhagem *S. cerevisiae* recombinante para adsorção de íon mercúrio (Hg^{2+}).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens de micro-organismos

As linhagens de micro-organismos utilizadas no trabalho são de origem laboratorial e encontram-se estocadas no Banco de Linhagens do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, congeladas, a -70 °C e meio semi-sólido, a 4 °C (Tabela 7 e 8).

Tabela 7 - Linhagens de bactéria.

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44</i> ; Δ <i>lacU</i> 169 (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15); <i>hsdR17</i> ; <i>recA1</i> ; <i>endA</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>relA1</i>	Meselson, Yan 1968
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	Selvagem, pMOL28, pMOL30, cromossomo 1, cromossomo2	Mergeay et al., 1978

Tabela 8 - Linhagens de levedura.

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>S. cerevisiae</i> YPH252	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801^{amber}</i> , <i>ade2-101^{ochre}</i> , <i>trp1-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>CAN1</i>	Sikorski, Hieter, 1989
<i>S. cerevisiae</i> YPH274	<i>MATa/MATα</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i> , <i>lys2-801^{amber}/lys2-801^{amber}</i> , <i>trp1-Δ1/trp1-Δ1</i> , <i>leu2-Δ1/leu2-Δ1</i> , <i>ade2-101^{ochre}/ade2-101^{ochre}</i> , <i>his3-Δ200/his3-Δ200</i> .	Sikorski, Hieter, 1989
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	<i>MATa/MATα</i> , wt- produção de etanol - can ^s .	Basso et al.,
<i>S. cerevisiae</i> YPH252/MF	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801^{amber}</i> , <i>ade2-101^{ochre}</i> , <i>trp1-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>CAN1</i> , pPGK-SS- <i>merR</i> -Flo428-tPGK.	Este trabalho
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>Pichia pastoris his4-</i> , <i>Mut⁺</i>	De Schutter et al., 2009
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Wild type	Comunicação Pessoal (*)

* Prof. Carlos Taborda (ICBII/USP)

4.2 Plasmídeos

Alguns dos plasmídeos utilizados neste trabalho já se encontravam estocados na coleção do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, outros foram construídos durante o trabalho, e outros são comerciais (Tabela 9).

Tabela 9 - Plasmídeos empregados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Referência / Procedência
pGEM [®] -T	Plasmídeo de clonagem comercial, <i>lacZ</i> , Amp ^R .	Promega [®]
pGEMT- <i>merR</i>	Plasmídeo pGEMT contendo o gene <i>merR</i> codificador da proteína MerR.	Este trabalho
pGEMT-Flo428	Plasmídeo pGEMT-Easy contendo o fragmento do gene <i>FLO1</i> codificador da região C- terminal da proteína Flo1p .	Fuentes Rivera, 2008
pGEMT-MF	Plasmídeo pGEMT-Flo428 contendo o gene <i>merR</i> , sem códon de terminação.	Este trabalho
pPIC9K	Plasmídeo bifuncional em <i>E. coli</i> e <i>Pichia pastoris</i> , contem os genes <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i> , para seleção em <i>E. coli</i> e o promotor (P) e o terminador de transcrição (TT) do gene <i>AOX1</i> de <i>P. pastoris</i> , <i>HIS4</i> , o fator α sinal de secreção, pBR322.	Invitrogen [®]
pPIC9KMF	Plasmídeo pPIC9K com fragmento codificador da fusão <i>merR</i> -Flo428.	Este trabalho
pMA91	Plasmídeo bifuncional em <i>E. coli</i> e <i>S. cerevisiae</i> , contem os genes <i>Amp^R</i> para seleção em <i>E. coli</i> ; e, <i>LEU2</i> para seleção em <i>S. cerevisiae</i> e o promotor (P) e o terminador de transcrição (TT) do gene <i>PGK</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	Mellor et al., 1983
pMA91MF	Plasmídeo pMA91 com o cassete de expressão e ancoragem de MerR: "pPGK-SS- <i>merR</i> -Flo428-tPGK"	Este trabalho

4.3 Meios de cultura para o cultivo de bactérias

Para o cultivo da bactéria *E. coli* DH5 α empregou-se o meio Luria-Bertani (LB). A linhagem *C. metallidurans* CH34 foi cultivada em meio Caldo Nutriente (CN).

A preparação do meio sólido foi idêntica ao do meio líquido, acrescido de bacto-agar 2%. Todos os nutrientes empregados no preparo dos meios de cultura foram de procedência Difco. Após o preparo dos meios líquidos e sólidos, estes foram esterilizados em autoclave, a 121 °C, 1 atm, por 20 min (Sambrook, Russel, 2001). Quando necessário, para a seleção e/o cultivo de linhagens recombinantes, adicionou-se, ao meio, solução de ampicilina (Sigma-Aldrich) na concentração final de 100 µg/mL. As linhagens de *E. coli* DH5α cultivadas em meio sólido foram incubadas em estufa, a 37 °C. O crescimento bacteriano em meio líquido foi realizado com aeração em “shaker”, a 180 rpm, na mesma temperatura.

- Meio completo (Luria Bertani) - **LB**:
Tryptona 1%, cloreto de sódio 1%, extrato de levedura 0,5% (Difco).
- Caldo Nutriente - **CN** (Difco)

4.4 Meios de cultura para o cultivo de levedura

Para o cultivo de levedura, utilizou-se meio completo ou meio mínimo suplementado. A preparação dos meios sólidos foi idêntica aos dos meios líquidos, acrescidos de de bacto-agar 2% (Difco). Após o preparo, os meios foram esterilizados em autoclave, a 121 °C, 1 atm, por 20 min (Sambrook, Russel, 2001). As leveduras semeadas em meio sólido, foram incubadas em estufa a 28 °C. O cultivo de leveduras em meio líquido foi realizado com aeração em “shaker” a 180 rpm, na mesma temperatura.

- Meio completo - **YPD**
Extrato de levedura 1%, Peptona 2%, Glicose 2%.
- Meio mínimo - **SD**
“Bacto yeast nitrogen base without aminoacids” 0,67%, Glicose 5%
- Meio mínimo - **SD-THUAL**,
SD acrescido com os aminoácidos: L- Triptofano, L- Histidina, L-Adenina e L-Lisina e a base nitrogenada Uracila, cada qual na concentração de 40 µg/mL.

4.5 Soluções e tampões

Para o preparo de soluções e tampões foram utilizados reagentes de pureza analítica e de procedência dos fabricantes Sigma-Aldrich, Merck ou Gibco-BRL. Todas as soluções e tampões foram preparados conforme descrito por Sambrook e Russel, 2001, exceto quando indicado. Foram esterilizadas em autoclave, a 121 °C, 1 atm, por 20 min e, quando necessário, foram filtradas em membrana do tipo millipore de poro 0,22 µm (Sartorius).

4.6 Extração de DNA total de *C. metallidurans* CH34

O DNA total de *C. metallidurans* CH34 foi isolado conforme descrito por Taghavi et al. (1994). Um inóculo da bactéria *C. metallidurans* CH34 foi cultivado em 15 mL de CN, a 28 °C, por 18 horas, com agitação em “shaker” a 180 rpm. Essa cultura foi centrifugada a 12.000 g, a 4 °C, por 5 min e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de tampão E (Tris-acetato 40 mM; EDTA 2 mM pH 7,9) e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores. O sedimento foi novamente ressuspenso em 1 mL de tampão E e foram adicionados 2 mL de solução de lise recém elaborada (Tris 40 mM; SDS 1 %, pH 12,6). A mistura foi incubada a temperatura ambiente, por 20 min, em seguida, incubada a 68 °C, em banho-maria, por 75 min. Após incubação, foram adicionados 0,5 mL de NaCl 4 M e 8 mL de fenol-clorofórmio (1:1), saturado, pH 4,8. A mistura foi incubada a temperatura ambiente, por 30 min. Em seguida, o material foi centrifugado por 20 min, a 20.000 g, a 4 °C, em ultracentrífuga MX 150/MX 120 (Sorvall, Newport Pagnell, Buckinghamshire, Inglaterra, e armazenado por 2h, a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo estéril, onde foram adicionados 2 mL de éter dietílico. Novamente a preparação foi centrifugada a 12.000 g, a 4 °C, por 5 min. A fase superior foi descartada e, para eliminar o residual de éter dietílico, foi realizada incubação a 37 °C, em banho-maria, por 20 min, até a completa evaporação do solvente orgânico. Alíquotas de 1,8 mL da solução de DNA foram transferidas para microtubos do tipo “Eppendorf”. Estes microtubos foram submetidos a ultracentrifugação a 50.000 g, a 4 °C, por 3 horas. O sedimento de DNA foi lavado três vezes com 1,8 mL de etanol 70% gelado, seco e ressuspenso em 100 µL de água ultrapura Milli-Q estéril.

4.7 Extração de DNA plasmidial de bactéria

O DNA plasmidial de bactéria foi isolado conforme descrito em Sambrook e Russel, 2001, com modificações.

4.7.1 Extração e purificação de DNA plasmidial em escala pequena ("Mini Prep")

A extração de plasmídeos de clones recombinantes de *E. coli* foram realizadas a partir de um inóculo de 3 mL de meio LB contendo ampicilina (na concentração final de 100µg/mL), crescidos a 37 °C, durante 16 horas, com agitação em "shaker", a 180 rpm. A cultura foi centrifugada a 8.000 g, a 4 °C, por 2 min, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento foi suspenso em 300 µL de Solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; glicose 50 mM). Em seguida, foram adicionados 300 µL de Solução II (NaOH 0,2 N; SDS 1 %), e incubou-se por 5 min, a temperatura de ambiente. Adicionou-se 300 µL de Solução III (CH₃COOK 3 M pH 4,8), e incubou-se o tubo por 10 min, no gelo. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado por 15 min, a 10.000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 750 µL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 2 min, a 10.000 g, a temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada e a esta, foi adicionada 700 µL de álcool isopropílico (isopropanol). A suspensão foi misturada por inversão e incubada por 30 min, a temperatura ambiente. Após esse tempo, a solução foi centrifugada a 10.000 g, por 20 min, a 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70%, a 4 °C, seco e resuspenso em 30 µL de água ultrapura Milli-Q estéril; e tratado com RNase 10mg/mL (Ribonuclease A), por 30 min, a 37 °C. Para análise, amostras do material foram submetidas à corridas eletroforéticas em gel de agarose 0,8%.

4.7.2 Extração e purificação de DNA plasmidial em grande escala ("Maxi Prep")

A extração de plasmídeo de clones recombinantes de *E. coli* foram realizadas a partir de um inóculo de 100 mL de meio LB contendo ampicilina (na concentração final de 100µg/mL), crescidos a 37 °C, durante 16 horas, com agitação em "shaker", a 180 rpm. A cultura foi centrifugada a 5.000 g, por 20 min, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento foi resuspenso em 10 mL de Solução I (Tris-HCl 25 mM

pH 8,0; EDTA 10 mM; glicose 50mM), e incubou-se por 5 min, a temperatura de ambiente. Em seguida, foram adicionados 15 mL de Solução II (NaOH 0,2N; SDS 1 %), e incubou-se por 5 min, a temperatura de ambiente. Adicionou-se 12 mL de Solução III (CH₃COOK 3M pH 4,8), e incubou-se o tubo por 10 min, no gelo. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado por 20 minutos, a 8.000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo. Em seguida, adicionou-se 15 mL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v). A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 2 min, a 8.000 g, a temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada e a esta, foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol, para cada 1ml de sobrenadante recuperado. A suspensão foi misturada por inversão e incubada por 30 min, a temperatura ambiente. Após esse tempo, a suspensão foi centrifugada a 8.000 g, por 20 min, a 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70%, a 4 °C, seco e resuspenso em 500 µL de água ultrapura Milli-Q estéril; e tratado com RNase (10mg/mL), por 30 min, a 37 °C. Para análise, amostras do material foram submetidas à corridas eletroforéticas em gel de agarose 0,8%.

4.8 Tratamento de DNA plasmidial com enzimas de restrição

As digestões de DNA com enzimas de restrição foram realizadas com volumes finais entre 10 e 50 µl, utilizando, em cada caso, o tampão de reação indicado pelo fabricante da enzima e as condições de incubação recomendadas. Foram utilizadas entre 1 a 2 U de enzima, para cada µg de DNA. Os tempos de incubação variaram entre 2 a 5 horas e, ocasionalmente, por 16 h. As enzimas de restrição utilizadas foram dos fabricantes Fermentas[®] e Invitrogen[®].

4.9 Análises do DNA em gel de agarose

As análises dos perfis de migração dos fragmentos de DNA foram realizadas em gel de agarose 0,8% (0,8 g de agarose em 100 mL de tampão TBE 0.5X) contendo brometo de etídio (10 mg/mL) e submetidas à corrida eletroforética. As amostras de DNA, misturadas com a solução de tampão de amostra (Azul de Bromofenol 0,5%; glicerol 50%; EDTA 100 mM pH 8,0), foram aplicadas no gel e, em seguida, a corrida eletroforética foi realizada em tampão

de corrida TBE 0,5 X (Tampão TBE 10X, diluído 20X para uma concentração final de 0,5 X. Tampão TBE 10X: Tris 0,89 mM; ácido bórico 0,89 mM; EDTA 0,2 mM pH 8.0), conforme descrito em Sambrook e Russell (2001). Para a visualização do DNA, foi utilizado um transiluminador com luz Ultra-Violeta. Para a fotodocumentação dos géis, foi utilizado o aparelho "Eagle-eye" da "Stratagene".

As quantificações de DNA presentes nas amostras foram realizadas por comparação da intensidade da banda de DNA da amostra com aquela exibida por Lambda DNA (Invitrogen®) de concentração conhecida (50, 100 e 200 ng). O padrão de tamanho molecular utilizado para verificar o tamanho da banda de DNA esperado foi o "O'GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Fermentas®) e "O'GeneRuler 100pb DNA Ladder" (Fermentas®).

4.10 Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose

Em vários casos, fragmentos de DNA foram submetidos a corrida eletroforética. A banda correspondente ao fragmento de DNA de interesse foi cortada do gel de agarose e transferida para um tubo de microcentrífuga de 2 mL. Para purificação do fragmento de DNA de interesse, utilizou-se o "Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega®). Seguiu-se as recomendações do fornecedor.

4.11 Desfosforilação do DNA

A retirada dos resíduos de fosfato das extremidades 5' dos fragmentos de DNA foi realizada com a finalidade de evitar a re-ligação da molécula, e, foi realizada empregando-se o tratamento com a enzima fosfatase alcalina ("Calf Intestinal Alkaline Phosphatase" - CIAP). Foram seguidas as recomendações de incubação indicadas pelo fabricante da enzima em uso (Fermentas®).

4.12 Ligação de fragmentos de DNA

De acordo com os tamanhos dos fragmentos de DNA que foram ligados, montaram-se os sistemas de ligação inserto/vetor, empregando-se a proporção de três a cinco vezes o número de moléculas de inserto para um de vetor.

O protocolo empregado foi enviado pelo fabricante da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen[®]).

4.13 Reação de Polimerização em Cadeia do DNA – PCR

4.13.1 Amplificação do gene *merR*

Para amplificação do gene *merR* sem o códon de terminação de transcrição foi empregado, como molde, o DNA total de *C. metallidurans* CH34; e, os oligonucleotídeos iniciadores apresentados na Tabela 10.

Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”), desenhados empregando-se o programa DNA Star (Lasergene, Madison, W.I, EUA), apresentam sítios de restrição (caudas) necessários para as clonagens que seriam realizadas.

Os reagentes, os oligonucleotídeos e a enzima *Taq* DNA polimerase utilizados, foram provenientes do fabricante Invitrogen[®]. O PCR foi realizado com 100 ng de DNA total, 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 pM), 5 µL de dNTPs (2 mM cada), 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 5 µL tampão *Taq* 10X e 2 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 50 µL. A reação foi transferida para um termociclador PTC-200 MJ-Research (Bio-Rad). As condições de amplificação do gene *merR* sem o códon de terminação foram: 1) um passo inicial de desnaturação a 94 °C, por 3 min; 2) 30 ciclos compostos por: desnaturação a 94 °C, 45 segundos; anelamento a 62 °C, por 30 segundos; extensão a 72 °C, por 1 min; e, 3) um passo final de 10 min, a 72 °C, para finalizar todas as extensões incompletas.

Tabela 10 - Iniciadores utilizados para amplificações de fragmentos de DNA

Primers	Sequência 5' - 3'	DNA molde	Finalidade	Referência
P1 _{FW}	5'- CCGCTCGAGCGGAATTCATGGAA AACAAT TTGGAGAACCTGACC - 3'	<i>C. metallidurans</i> CH34	Amplificação do gene <i>merR</i> sem o códon de terminação. Tamanho esperado 460 pb	Este trabalho
P1 _{RV}	5'-CGCTCGAGGGAGGCATAGCCGA ACCTGCCAAACTT - 3'			
T7 _{FW}	5'- GATTTAGGTGACACTATAG - 3'	pGEMT - <i>merR</i>	Sequenciamento para verificar a sequência correta de DNA de <i>merR</i> sem códon de terminação.	Este trabalho
SP6 _{RV}	5'- TAATACGACTCACTATAGGG - 3'			
P2 _{FW}	5'- GGTCAATGCAAGAAATACATATT TGGTCTTTTC - 3'	Sequência codificadora do cassete de expressão e ancoragem MerR: "pPGK-SS-MerR-Flo-PGK"	Sequenciamento para verificar a sequência correta do cassete de expressão e ancoragem de MerR.	Este trabalho
P3 _{FW}	5'- AATTCATGGAAAACAATTTGGAG AACCTGACC - 3'			
P4 _{RV}	5'- TTTCCACCACAGAATCGAGGCA ACAAACA - 3'			
P5 _{RV}	5'- CACCACCACAGTAGAGACATG GG- 3'			

4.14 Sequenciamento

O sequenciamento do inserto *merR* do plasmídeo pGEMT- *merR* foi realizada utilizando os iniciadores T7 e SP6 descritos na Tabela 10.

Para o sequenciamento de DNA codificador do cassete de expressão e ancoragem de MerR, a partir de produto de PCR, foram desenhados iniciadores internos (Tabela 10).

As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Para tanto, em cada caso, foram enviados as amostras de DNA molde e seus respectivos iniciadores.

4.15 Transformação gênica

4.15.1 Transformação de células de *E. coli*

- Preparo de células eletrocompetentes

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α foram preparadas conforme Sambrook e Russell, 2001. 5 mL de uma cultura de *E. coli* DH5α crescida durante um

período de 16 horas, a 37 °C, com agitação a 180 rpm em “shaker”, foi inoculada em 500 mL de meio LB, e a nova cultura foi incubada nas mesmas condições, até atingir uma Absorbância (600 nm) em torno de 0,5 - 0,6, medida em espectrofotômetro (Micronal B582). A suspensão foi coletada em tubos de centrifuga, incubada no gelo, por 30 minutos, e centrifugada a 6.000 g, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado duas vezes com 250 mL de água Milli-Q estéril gelada. Em seguida, as células foram ressuspensas em 50 mL de água Milli-Q estéril, a 4°C, contendo 10% de glicerol (v/v) e centrifugadas pela última vez. As células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% (v/v), a 4 °C. Alíquotas de 40 µl da suspensão de células foram distribuídas em microtubos do tipo "Eppendorf" de 1,5 mL, e estocadas a -70 °C.

- Transformação de bactérias por eletroporação

Empregou-se o protocolo de transformação de *E. coli* por eletroporação descrito em Sambrook e Russel, 2001. As células eletrocompetentes, preparadas conforme descrito anteriormente, foram retiradas do freezer -70 °C, colocadas imediatamente no gelo, e utilizadas somente depois de descongeladas. Foram utilizados 1-2 µL de DNA (mistura de ligação) para cada 40 µL de células eletrocompetentes. A mistura de célula/DNA foi transferida para a cubeta gelada do eletroporador “Gene Pulser” (Bio-Rad), e foi submetida a um pulso elétrico de 2.5 V, resistência de 200 Ω e capacitância de 25 µF. Após a eletroporação, a cubeta foi imediatamente removida do eletroporador. Foi adicionado 1mL de meio SOC (triptona 2 %; extrato de levedura 0,5 %; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM, glicose 20mM) às células. A suspensão foi transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37 °C, com agitação a 100 rpm, por 1 hora. Após esse tempo, a suspensão bacteriana foi semeada em placas contendo meio sólido LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, por 16 horas. Quando se estava trabalhando com plasmídeo pGEM-T ou pGEMT-Easy, as células foram semeadas em meio sólido LB suplementado com ampicilina e acrescidos de X-Gal (0,2 mg/mL) e IPTG (0,08 mg/mL) e incubadas nas mesmas condições.

4.15.2 Transformação de células de *S. cerevisiae*

Empregou-se o método de transformação de células intactas com Acetato de lítio (Gietz et al., 1992). Inicialmente, foi feita uma pré-cultura da linhagem de levedura a ser transformada em 5 mL de YPD que foi cultivada durante 16 horas, a 28 °C, com aeração em “shaker”, a 180 rpm. Foram inoculados 0,2 mL desta pré-cultura em 20 mL de YPD, obtendo-se uma cultura inicial com 5×10^6 células/mL. Esta cultura foi incubada com aeração em “shaker”, a 180 rpm, a 28 °C, até atingir uma Absorbância (600 nm) em torno de 0,5 (aproximadamente 4 horas). Após este período, a cultura foi centrifugada, por 5 min, a 3.000g, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com 10 mL de água Milli-Q estéril, a temperatura de ambiente. As células foram resuspensas em 1 mL de Acetato de lítio 0,1 M e transferidas para tubo de microcentrífuga do tipo “Eppendorf” de 1.5 mL. O material foi centrifugado por 15 segundos, a 3.000 g, todo o sobrenadante foi retirado, e o sedimento foi ressuspense em 150 µL de Acetato de lítio 0,1 M. 50 µL desta suspensão foi transferido para outro tubo de microcentrífuga do tipo “Eppendorf”. Foi realizada a centrifugação a 3.000 g, durante 15 segundos, para remoção do sobrenadante.

Foram adicionados, nesta ordem, sobre o sedimento de células:

- 240 µL de PEG (Polietilenoglicol 50% w/v) - PM: 3350 – Sigma-Aldrich;
- 36 µL de Acetato de lítio 1 M;
- 25 µL DNA de salmão (desnaturado previamente por incubação em água fervente, por 15 minutos, e posterior incubação no gelo);
- 50 µL de suspensão de DNA.

O tubo foi agitado em “vortex”, até a completa ressuspensão do sedimento, e incubado em estufa a 28 °C, por 30 min. Após esta primeira incubação, o tubo foi incubado em banho-maria a 42 °C, por 20 min. A suspensão foi centrifugada a 3000 g, por 15 segundos, a temperatura ambiente e o sobrenadante foi removido. As células de levedura foram lavadas com 0,5 mL de água Milli-Q estéril e resuspensas em 0,3 mL de água estéril. As células foram semeadas em meio seletivo sólido SD acrescido com os aminoácidos necessários (SD-THUAL) acondicionado em placas de petri.

4.16 Teste de estabilidade do plasmídeo pMA91MF nas células transformantes de *S. cerevisiae*

Para testar a estabilidade da informação genética inserida nas células de levedura, foram realizados cultivos em meio líquido YPD, sem pressão seletiva e em meio SD-THUAL, durante 5 dias. O inóculo inicial, assim como cada inóculo feito a cada repique, um a cada 24 horas, conteve aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/mL. A cada repique a cultura foi semeada em meio sólido YPD e SD-THUAL em diluições adequadas, de maneira a obter-se aproximadamente 100 colônias/placa. As placas foram incubadas a 28 °C, por 2 dias (Guerra, 2006).

O número de gerações foi calculado de acordo com a relação, $X = X_0 \cdot 2^n$, onde:

X= número final de células

X_0 = número inicial de células

n = número de gerações

4.17 Análise da viabilidade celular de levedura após incubação em HgCl_2

A viabilidade celular da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e da linhagem controle YPH252/pMA91 incubadas em HgCl_2 foi analisada.

Células advindas do experimento de adsorção de íons Hg^{2+} foram semeadas em meio sólido depois do tratamento com 5,0 e 10,0 μM HgCl_2 por diferentes intervalos de tempo (15 min, 30 min, 120 min e 240 min). Para isso, alíquotas 100 μL foram retiradas de cada uma das amostras e diluídas 10^6 vezes, para facilitar a determinação das unidades formadoras de colônias (UFCs), e semeadas em meio sólido SD-THUAL. A contagem das UFC foi determinada após 48 horas de crescimento, a 28 °C. O experimento foi realizado em triplicata

4.18 Curva de crescimento

Foram realizadas curvas de crescimento da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF de *S. cerevisiae* e da linhagem selvagem YPH252 (controle negativo) em meio SD-THUAL. Para isso, partiu-se de culturas de 25 mL em meio SD-THUAL, contendo $1,0 \times 10^6$ células/mL, e realizada a incubação a 28 °C, com

agitação a 150 rpm em "shaker". Foram retirados pontos a cada 4 horas durante as primeiras 12 horas, e depois cada 24 horas. As curvas de crescimento foram realizadas durante um período de 120 horas. Determinou-se a concentração de células na cultura, por leitura de Absorbância (600 nm). A leitura foi feita sem diluição ou com diluição de 10 vezes, de acordo com a fase de crescimento das culturas, de forma que a leitura da Absorbância fosse sempre inferior a 1.

4.19 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Crescimento (MIC)

As células de levedura foram cultivadas em 5 mL de meio líquido SD-THUAL e incubadas durante 48 horas, a 28 °C, com agitação a 180 rpm em "shaker". A cultura foi diluída 10^3 vezes e 20 µl de dessa diluição foram inoculados no mesmo meio contendo diferentes concentrações de HgCl_2 (Merck), variando de 60 a 210 nM. Para isso, previamente foi calculado o volume de HgCl_2 acrescentado a cada tubo de ensaio contendo o meio SD-THUAL para as diferentes concentrações de HgCl_2 testadas, a partir duma solução stock de HgCl_2 5 µM e volume final de 2 mL, após foi adicionado 20 µl da diluição de células de levedura. As células foram incubadas durante 72 horas, a 28 °C, em agitação. Após esse período, o crescimento celular foi analisado e quantificado por leitura de Absorbância a 600 nm, em espectrofotômetro. O experimento foi realizado em triplicata. A solução stock de HgCl_2 foi esterilizada por filtração em membrana com poros de 0,22 µm (Sartorius).

4.20 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As células de levedura foram cultivadas em 15 mL de meio líquido SD-THUAL (clones transformantes), com agitação a 180 rpm, a 28 °C, durante 48 horas, até atingir a fase estacionária. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 3.000 g, por 10 min, a temperatura de ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso em 15 mL de água ultrapura Milli-Q estéril contendo HgCl_2 , na concentração final de 1 µM. As células foram incubadas por 2 horas, a 28°C, com agitação a 180 rpm. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 3.000 g, por 10 min, a temperatura de ambiente. O sedimento obtido contendo as células de levedura foi submetido a procedimentos para preparo de cortes histológicos. O preparo dos blocos de resina contendo as células de leveduras e a observação em

Microscópio Eletrônico de Transmissão (Hitachi High Technologies America) foi realizado no setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo (ICB/USP), com auxílio do técnico responsável.

4.21 Análise de adsorção de íons Hg^{2+} pelas células de levedura utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica

A determinação de adsorção de íons Hg^{2+} pelas linhagens de *S. cerevisiae* transformada com o plasmídeo pMA91MF (YPH252/ pMA91MF) e da mesma linhagem transformada como o plasmídeo sem inserto (YPH252/ pMA91), utilizada como controle negativo, foi realizada de acordo com Hernández et al.,1998, com modificações.

As linhagens *S. cerevisiae* recombinantes foram cultivadas em 100 mL de meio mínimo SD-THUAL. As culturas foram incubadas com agitação em “shaker”, a 180 rpm, a 28 °C, durante 48 horas. As células foram centrifugadas a 3.000 g, por 30 min, a temperatura de ambiente e lavadas três vezes com 50 mL de solução salina 0.9%. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de água ultrapura Milli-Q estéril e transferida para tubo tipo Falcon de 50 mL. Foram adicionados 5 mL de água Milli-Q contendo diferentes concentrações, 5,0 μM e 10,0 μM de HgCl_2 . As misturas foram incubadas por 15 min, 30 min, 120 min e 240 min, todas sob agitação de 180 rpm, a 28 °C. Após os tempos de incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 g, por 30 min, a temperatura ambiente. As células coletadas foram lavadas três vezes com solução salina 0,9%, ressuspensas em 1 mL de água ultrapura Milli-Q estéril e submetidas a liofilização por 18 horas. A massa seca obtida foi determinada por gravimetria em balança analítica digital.

O processo de digestão das células foi conduzido da seguinte forma: foram adicionados 4 mL de ácido nítrico P.A saturado bidestilado a 30 mg de massa seca, seguido de incubação a temperatura ambiente, por 16 horas. As amostras digeridas foram diluídas com ácido nítrico bidestilado 20% e analisadas empregando-se Espectrometria de Absorção Atômica com sistema de injeção em fluxo e geração de vapor a frio (FIA-CV-AAS), modelo Spectra AA 2201FS (Varian, Santa Clara, CA, EUA). Este experimento foi realizado sob a supervisão e colaboração do Prof. Dr. Jorge Sarkis na Central de Laser e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

Para determinar a capacidade de adsorção da linhagem YPH252/pMA91MF, novos ensaios foram realizados nas condições acima descritas, porém com incubações na presença de diferentes concentrações de HgCl_2 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μM , durante 120 min de incubação.

Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicatas.

5 RESULTADOS

A estratégia escolhida para atingir o objetivo proposto consistiu em realizar a fusão gênica do gene codificador da proteína ligadora de Hg^{2+} MerR de *C. metallidurans* CH34 com o fragmento de DNA codificador da região C-terminal da proteína Flo1p (Flo428), utilizada como âncora, sob a regulação do promotor e do terminador de transcrição do gene codificador da fosfoglicerato quinase (*PGK*) de *S. cerevisiae*. O cassete de expressão e ancoragem de *merR* foi empregado na transformação genética de células da linhagem *S. cerevisiae* YPH252.

Para que fosse possível obter a fusão gênica desejada, inicialmente foi necessária a remoção do terminador de tradução (códon de terminação) do gene *merR*. Para tanto, o DNA codificador da proteína MerR sem o códon de terminação foi amplificado por PCR e clonado no vetor intermediário pGEM[®]-T. Em seguida, foi realizada a subclonagem do gene *merR* no plasmídeo pGEMT-Flo428, obtendo-se o plasmídeo recombinante pGEMT-MF, que contem a fusão gênica “*merR*-Flo428”. A seguir, o fragmento de DNA “*merR*-Flo428” foi retirado do plasmídeo pGEMT-MF e clonado no vetor de expressão e excreção de *P. pastoris* pPIC9K, gerando o plasmídeo recombinante pPIC9KMF. O fragmento de DNA “SS-*merR*-Flo428” foi retirado de pPIC9KMF e inserido, com sucesso, no vetor de expressão de *S. cerevisiae* pMA91, entre as sequências codificadoras do promotor e terminador de transcrição do gene da fosfoglicerato quinase (*PGK*) de *S. cerevisiae*, obtendo-se o plasmídeo recombinante pMA91MF.

O conjunto das etapas realizadas neste trabalho é apresentado de forma resumida no fluxograma da Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma das etapas realizadas.

5.1 Escolha da levedura hospedeira

Para seleção das linhagens de leveduras que apresentarão maior resistência a íons Hg^{2+} , foi determinada a concentração inibitória mínima de crescimento (MIC) frente a estes íons. Foram testadas três linhagens da levedura *S. cerevisiae* e as leveduras *P. pastoris* e *Yarrowia lipolytica*, que foram cultivadas em diferentes concentrações de solução de HgCl_2 (Tabela 11) (Figura 11).

Tabela 11 - Comparação das resistências a HgCl_2 das diferentes linhagens de levedura.

	60 ηM	90 ηM	120 ηM	150 ηM	180 ηM	210 ηM
<i>S. cerevisiae</i> YPH252 (n)	+	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> YPH274 (2n)	+	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	+	+	-	-	-	-
<i>P. pastoris</i> GS15	+	-	-	-	-	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	-	-	-	-	-

Figura 11 - Análise do crescimento final de diferentes linhagens de leveduras.

Células crescidas em tubos agitados em shaker contendo meio mínimo SD-THUAL, e diferentes concentrações de solução de HgCl_2 , após cultivo a 28 °C, por 72 horas.

Os resultados obtidos no perfil de resistência nas mesmas condições de cultivo mostraram que as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram maior resistência aos íons Hg^{2+} do que as leveduras *P. pastoris* e *Y. lipolytica*. A MIC das linhagens de *S. cerevisiae* YPH252, YPH274 e PE-2 foi de 120 ηM de HgCl_2 , no entanto, a MIC das leveduras *P. pastoris* e *Y. lipolytica* foi de 90 ηM de HgCl_2 (Tabela 11).

Apesar da levedura *P. pastoris* ser considerada uma hospedeira interessante para a produção em larga escala de proteínas heterólogas (Cereghino, Cregg, 2000), pouco se conhece sobre os mecanismos de resistência aos metais tóxicos e a utilização desta levedura para biorremediar ambientes contaminados por metais potencialmente tóxicos. Nossos resultados indicaram que esta levedura apresenta altos níveis de sensibilidade aos íons Hg^{2+} , conseguindo crescer somente em concentrações inferiores a 90 ηM de HgCl_2 . Por sua vez, a levedura *Y. lipolytica*, utilizada em biorremediação de ambientes contaminados por compostos aromáticos e alifáticos, poluentes orgânicos, TNT e metais potencialmente tóxicos como Cd^{2+} , Ni^{2+} , Se^{6+} e Cu^{2+} (Bankar et al., 2009), apresentou, também, altos níveis sensibilidade a Hg^{2+} , não conseguindo crescer até 90 ηM de HgCl_2 .

Devido à maior resistência aos íons Hg^{2+} mostrada pelas linhagens *S. cerevisiae*, os experimentos subsequentes desse trabalho foram realizados apenas com a linhagem de laboratório YPH252, que entre as três linhagens testadas apresentou maior resistência aos íons Hg^{2+} .

5.2 Clonagem de *merR* no vetor pGEMT-Flo428

5.2.1 Obtenção do gene *merR* sem o códon de terminação

Para se construir a fusão gênica desejada, foi necessário amplificar por PCR o gene *merR* sem o códon de terminação (460 pb) utilizando como molde o DNA total de *C. metallidurans* (Material e Métodos, seção 4.6) e os iniciadores P1_{FW} e P1_{RV} (Material e Métodos, seção 4.13, Tabela 10) (Figura 12).

Figura 12 - Esquema da amplificação por PCR do gene *merR* sem códon de terminação (460 pb).

A análise do produto de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 13).

Figura 13 - Amplificação por PCR do gene *merR* sem códon de terminação.

Gel de agarose 0,8 % submetido a corrida eletroforética. 1) 1Kb DNA Ladder Fermentas (150 ng) e 2) Produto de PCR do gene *merR* sem códon de terminação (460 pb).

5.2.2 Clonagem de *merR* no vetor pGEM®-T

O protocolo utilizado para clonagem do *amplicon merR* no vetor de clonagem pGEM-T (Material e Métodos, seção 4.2, Tabela 9) seguiu as recomendações do fabricante do vetor de clonagem.

A mistura de ligação de *merR* com o vetor pGEM®-T (Material e Métodos, seção 4.12) foi empregada na transformação genética de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α (Material e Métodos, seção 4.15.1). Os transformantes obtidos foram selecionadas em meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 0,2 mg/mL de X-Gal e 0,08 mg/mL de IPTG, pela resistência ao antibiótico e coloração branca das colônias.

A análise de restrição dos DNAs plasmidiais isolado das colônias transformantes digeridos com a enzima *XhoI* (Material e Método, seção 4.7.1) apresentou o padrão de restrição compatível com o esperado, liberando duas bandas, sendo uma de aproximadamente 3000 pb, referente ao vetor pGEM®-T e outra, de 460 pb, referente ao inserto *merR* (Figura 14B). O novo plasmídeo recombinante construído foi denominado pGEMT-*merR* (Figura 14A).

Figura 14 - Clonagem do amplicon *merR*.

(A) Esquema de clonagem do amplicon *merR* no plasmídeo pGEM[®]-T, resultando na obtenção do plasmídeo recombinante pGEMT-*merR*; **(B)** Perfis de migração em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio, submetido a eletroforese: 1, 2, 5 e 6) Plasmídeos recombinantes (pGEMT-*merR*) digeridos com *XhoI*; 4) 1Kb DNA Ladder Fermentas (150 ng).

Para confirmar a presença do inserto *merR* no plasmídeo pGEMT-*merR*, foi realizada uma reação de PCR, utilizando como molde o DNA dos plasmídeos recombinantes obtidos, e os iniciadores P1_{FW} e P1_{RV} (Material e Métodos, seção 4.13, Tabela 10). A obtenção do amplicon de tamanho esperado (460 pb) confirmou o sucesso da clonagem (Figura 15).

Figura 15 - Perfis de migração dos produtos de PCR.

Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e submetido a corrida eletroforética: 1) 100 bp DNA Ladder Fermentas (150 ng); 2,3,4 e 5) Produtos de PCR utilizando como molde DNA plasmidial de clones recombinantes DH5 α /pGEMT-*merR*.

Para verificar se a sequência de *merR* clonada no vetor pGEM[®]-T não continha mutações, alterações na sequência ou anelamento incorreto, o inserto do vetor construído, pGEMET-*merR*, foi sequenciado utilizando o iniciador T7_{FW} e SP6_{RV}. O resultado do sequenciamento confirmou que este plasmídeo recombinante construído continha a sequência correta de DNA de *merR* sem códon de terminação.

5.3 Subclonagem de *merR* no vetor pGEMT-Flo428

Para a clonagem da fusão gênica “*merR* - fragmento gênico codificador de Flo428”, o fragmento de DNA *merR* foi purificado a partir da digestão do plasmídeo pGEMT-*merR* com a enzima de restrição *Xho*I e subsequente eluição desse fragmento de DNA do gel de agarose após eletroforese (Material e Métodos, seção 4.10). O plasmídeo pGEMT-Flo428 foi digerido com a mesma enzima, *Xho*I, e posteriormente tratado com a enzima fosfatase alcalina (“Calf Intestinal Alkaline Phosphatase” - CIAP), com a finalidade de evitar a re-ligação da molécula de DNA (Material e Métodos, seção 4.11). Após isto, foi realizada a mistura de ligação do fragmento purificado *merR* com o plasmídeo linearizado pGEMT-Flo428 (Material e Métodos, seção 4.2), que foi empregada na transformação por eletroporação de células de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, seção 4.15.1)(Figura 16).

Figura 16 - Subclonagem de *merR*.

Esquema da subclonagem de *merR* no plasmídeo pGEMT-Flo428, resultando na obtenção do plasmídeo recombinante pGEMT-MF.

Os DNAs plasmidiais de colônias transformantes, selecionadas ao acaso, foram isolados (Material e Métodos, seção 4.7.1) e digeridos com a enzima *XhoI*, liberando o inserto *merR* do tamanho esperado (460 pb), confirmando o sucesso da clonagem (Figura 17)

Para verificar a orientação do inserto *merR* clonado no plasmídeo pGEMT-Flo428, os plasmídeos recombinantes obtidos foram tratados com a enzima de restrição *EcoRI*. Quatro dos clones mostraram que o gene *merR* havia sido clonado na orientação desejada. Na Figura 17, estão apresentados os perfis de restrição de apenas um destes plasmídeos.

Figura 17 - Análise de restrição do plasmídeo pGEMT-MF com diferentes enzimas de restrição.

Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e submetido a eletroforese: 1) 1Kb DNA Ladder Fermentas (150 ng); 2) Plasmídeo recombinante pGEMT-MF digerido com *EcoRI*, orientação desejada; 3) Plasmídeo recombinante pGEMT-MF intacto; 4) Plasmídeo recombinante pGEMT-MF digerido com *XhoI*.

Assim foi obtido o plasmídeo recombinante pGEMT-MF, que contém a fusão gênica desejada “*merR-Flo428*” em fase de leitura (Figura 16 e 17).

5.4 Clonagem da fusão gênica “*merR-Flo428*” no vetor pPIC9K

O vetor de clonagem e expressão pPIC9K (Invitrogen®) é um plasmídeo bifuncional de *E. coli* e *Pichia pastoris*, com marcadores de seleção apropriados para cada um dos hospedeiros. Este plasmídeo carrega a sequência sinal do fator alfa (SS) de *S. cerevisiae*, para a secreção de proteínas heterólogas. Essas características tornaram esse vetor ideal para a clonagem da fusão gênica “*merR-Flo428*”.

O fragmento de DNA contendo a fusão gênica “*merR-Flo428*” (1760 pb) foi liberado do plasmídeo pGEMT-MF por digestão com a enzima *EcoRI*, após corrida eletroforética, o fragmento desejado foi eluído e purificado do gel de agarose (Material e Métodos, seção 4.10). A seguir, o inserto “*merR-Flo428*” foi clonado no vetor pPIC9K, previamente linearizado por digestão com a mesma enzima e tratado com a enzima fosfatase alcalina (“Calf Intestinal Alkaline Phosphatase” - CIAP)

(Material e Métodos, seção 4.11), para se obter o plasmídeo recombinante pPIC9KMF (Figura 18). Desta forma, o fragmento "*merR*-Flo428" seria inserido a jusante da sequência sinal do fator alfa (SS) de *S. cerevisiae*, visando a obtenção da fusão gênica "SS-*merR*-Flo428", que quando expressa em levedura promoveria o "cell surface display" da proteína MerR, ou seja a ancoragem de MerR à superfície celular de levedura.

Figura 18 - Esquema da clonagem da fusão gênica "*merR*-Flo428" no vetor pPIC9K e obtenção do plasmídeo recombinante pPIC9KMF.

A mistura de ligação do inserto e vetor foi empregada na transformação genética de células de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, seção 4.15.1). As colônias transformantes foram selecionadas em meio LB suplementado com antibiótico ampicilina e algumas destas colônias foram selecionadas ao acaso para análise. O DNA plasmidial dos transformantes bacterianos escolhidos (Material e Método, seção 4.7.1) foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, liberando dois

fragmentos de DNA, um correspondente ao vetor pPIC9K (9300 pb) e outra correspondente ao inserto "*merR*-Flo428" (1760 pb) (Figura 19A).

Para verificar a orientação do inserto "*merR*-Flo428" clonado em pPIC9K, os plasmídeos recombinantes obtidos foram tratados com a enzima de restrição *Bam*HI. Quatro dos clones mostraram que "*merR*-Flo428" havia sido inserido na orientação desejada (Figura 19B).

Figura 19 - Análises de restrição do plasmídeo pPIC9KMF.

A) Análises de restrição com enzima *Eco*RI. Perfis de migração em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio, submetido a eletroforese: 1) 1Kb DNA Ladder Fermentas (150 ng); 2,3, 4 e 5) Plasmídeo recombinante pPIC9KMF digeridos com *Eco*RI isolados de vários clones. **B) Análises de restrição com enzima *Bam*HI.** Perfis de migração em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio, submetido a eletroforese: 1) 1Kb DNA Ladder Fermentas (150 ng); 2,3,4 e 5) Plasmídeo recombinante pPIC9KMF digerido com *Bam*HI, o plasmídeo contendo a orientação desejada libera um fragmento de 2030 pb.

5.5 Clonagem do fragmento de DNA "SS - *merR* - Flo428"

Para a expressão da fusão "SS-*merR*-Flo428" em *S. cerevisiae* era necessário inserir este fragmento de DNA entre um promotor e um terminador de transcrição adequado. Para tanto, o plasmídeo pMA91 foi empregado para a clonagem deste fragmento de DNA, por ser um vetor de clonagem e expressão em *S. cerevisiae* que contém a região promotora e terminadora de transcrição do gene da fosfoglicerato quinase (*PGK*) de *S. cerevisiae*.

Buscou-se clonar o fragmento de DNA "SS-*merR*-Flo428" no sítio *Bgl*II do plasmídeo pMA91, entre o promotor e o terminador do gene *PGK*. Para tanto, o fragmento de DNA "SS-*merR*-Flo428", foi liberado a partir da digestão do

plasmídeo recombinante pPIC9KMF com a enzima de restrição *Bam*HI. O fragmento “SS-*merR*-Flo428” (2030 pb), foi eluído e purificado do gel de agarose (Material e Métodos, seção 4.10). Paralelamente, o plasmídeo pMA91 foi linearizado com a enzima de restrição *Bgl*II e tratado com a enzima fosfatase alcalina (Material e Métodos, seção 4.11). A mistura de ligação entre o plasmídeo linearizado e o fragmento “SS-*merR*-Flo428” (Material e Métodos, seção 4.12) foi empregada na transformação de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, seção 4.15.1) (Figura 20).

Foram obtidas colônias bacterianas transformantes Amp^R. Os DNAs plasmidiais de colônias transformantes, selecionadas ao acaso, foram isolados (Material e Métodos, seção 4.7.1) e digeridos com a enzima *Xho*I. Alguns apresentaram o padrão de restrição compatível com o esperado (Figura 20B).

Figura 20 - Esquema da clonagem do fragmento de DNA “SS - *merR* - Flo428”.

(A) Esquema da clonagem de “SS-*merR*-Flo428” no vetor pMA91, obtenção do plasmídeo recombinante pMA91MF. **(B)** Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e submetido a corrida eletrofoerética: 1, 2, 3, e 4) Plasmídeos recombinantes pMA91MF digeridos com *Xho*I, 5) Plasmídeo pMA91 digerido com *Xho*I; e, 6) 1Kb DNA Ladder Fermentas (150 ng).

Empregando-se análise de restrição com a enzima *Hind*III, verificou-se a orientação do inserto “SS-*merR*-Flo428” nos plasmídeos recombinantes obtidos. Quatro dos clones continham o plasmídeo recombinante com o inserto na orientação desejada (Figura 21).

Figura 21 - Análise de restrição do plasmídeo pPIC9KMF com a enzima *Hind*III

Perfil de migração em gel de agarose 0,8%. 1,2,6 e 7) Plasmídeos recombinantes (pMA91MF) digeridos com *Hind*III (“SS-*merR*-Flo428” clonado na orientação desejada); 3 e 5) Plasmídeos recombinantes (pMA91MF) digeridos com *Hind*III (“SS-*merR*-Flo428” clonado na orientação invertida, não desejada); 4) 1Kb DNA Ladder Fermentas (150 ng).

Desta forma, foi selecionado o clone transformante contendo a construção do plasmídeo recombinante pMA91MF desejado, que contém a fusão gênica “SS-*merR*-Flo428” sob a regulação do promotor e do terminador de transcrição do gene da fosfogliceratoquinase (*PGK*) de *S. cerevisiae* (Figuras 20 e 21).

5.6 Sequenciamento do fragmento de DNA “SS - *merR* - Flo428”

Para se ter certeza de que o fragmento de DNA contendo a fusão gênica “SS - *merR* - Flo428” contém todos os nucleotídeos em correta fase de leitura e que não contém qualquer mutação indesejada, este fragmento de DNA foi submetido a sequenciamento (Material e Métodos, seção 4.14, utilizando os iniciadores apresentados na Tabela 10 do Material e Métodos, seção 4.13).

O resultado do sequenciamento foi analisado e permitiu a confirmação de que as sequências de DNA estão em fases de leitura corretas e que não há nenhuma mutação, desde o códon de iniciação ATG, presente na sequência sinal (SS) até o códon de terminação TAA, presente no final da sequência do gene *FLO1*. Os pontos das junções *SS-merR* e *merR-Flo428* estão destacados na Figura 22.

Figura 22 - Sequência da fusão gênica “*SS-merR-Flo428*”, confirmando a correta fase de leitura e ausência de qualquer mutação no fragmento de DNA construído

5.7 Obtenção de colônias transformantes da levedura *S. cerevisiae*

A linhagem YPH252 da levedura *S. cerevisiae* foi transformada com o plasmídeo recombinante pMA91MF que contém o cassete de expressão e ancoragem de MerR (Material e Métodos, seção 4.15.2). Foram obtidas 705 colônias transformantes de levedura em meio SD-THUAL. A seleção dos clones transformantes foi realizada por complementação do fenótipo Leu⁺. Essa linhagem também foi transformada com o plasmídeo pMA91 sem inserto, para a obtenção do clone controle negativo empregado nas análises subsequentes.

5.8 Análise da estabilidade da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* YPH252/pMA91MF

A estabilidade da linhagem transformante YPH252/pMA91MF foi analisada após sucessivos cultivos em meio completo YPD, sem pressão seletiva, por 5 dias, a 28 °C com agitação em “shaker” (Material e Métodos, seção 4.16).

Os dados obtidos indicam que a partir de uma cultura de células recombinantes com o plasmídeo pMA91MF, depois de 5 dias de cultivos sucessivos, que equivalem a aproximadamente 50 gerações, o plasmídeo pMA91MF se encontra presente em apenas 64,1% das células (Figura 23).

Figura 23 - Estabilidade do clone recombinante YPH252/pMA91MF ao longo de 50 gerações cultivadas em meio completo YPD.

Para evitar a perda do plasmídeo pMA91MF os experimentos seguintes foram realizados em meio mínimo sobre pressão seletiva SD-THUAL.

5.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Crescimento (MIC)

Foi avaliada a concentração inibitória mínima de crescimento (MIC) da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF frente a HgCl_2 (Material e Métodos, seção 4.17). Os resultados obtidos mostraram que a MIC da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF foi 150 ηM de HgCl_2 ; enquanto que, a MIC da linhagem YPH252/pMA91 (controle negativo) foi 120 ηM de HgCl_2 (Figura 24A, B), esses resultados indicam um aumento da capacidade de sobrevivência da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF na presença de íon Hg^{2+} , quando comparada com o controle negativo. Foi observado, também, que a linhagem recombinante YPH252/pMA91MF apresenta maior capacidade de resistência a Hg^{2+} quando comparado ao crescimento celular da linhagem controle. Ambas as linhagens foram cultivadas em diferentes concentrações deste metal (Figura 25A, B).

Figura 24 - Determinação de MIC de linhagens transformantes de levedura.

(A) YPH252/pMA91MF e, **(B)** YPH252/pMA91 (controle negativo) crescidas em meio mínimo SD-THUAL contendo concentrações crescentes de HgCl_2 , com aeração, durante 72 horas, a 28 °C.

Figura 25 - Crescimento celular das linhagens transformantes de *S. cerevisiae*

(A) Crescimento celular do clone recombinante YPH252/pMA91MF em meio SD-THUAL, contendo diferentes concentrações de HgCl₂, a 28 °C com aeração; **(B)** Porcentagem de crescimento celular.

5.10 Caracterização da linhagem de *S. cerevisiae* YPH252/pMA91MF por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para determinar a presença e a localização do íon metálico Hg²⁺ ligado à célula de levedura utilizou-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Para tanto, as culturas da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e da linhagem controle YPH252/pMA91, crescidas previamente em meio SD-THUAL, foram incubadas em água Milli-Q contendo HgCl₂ 1μM, durante 2 horas, a 28 °C, com agitação (Material e Métodos, seção 4.18).

As imagens obtidas por MET demonstraram que as células da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF apresentam agregados ligados à superfície celular externa, fato que não foi observado nas células da linhagem controle YPH252/pMA91. Esses resultados indicam, com clareza, que íons Hg²⁺ são ligados à proteína MerR ancorada à parede celular externa da linhagem recombinante. Cabe ressaltar, que as células da linhagem recombinante apresentam agregados escuros no interior celular, porem em menor proporção do que as células da linhagem controle YPH252/pMA91 que apresentam agregados escuros, exclusivamente, em suas estruturas celulares internas (Figura 26).

Figura 26 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de cortes histológicos de células das linhagens *S. cerevisiae*.

A1. e A2. - *S. cerevisiae* YPH252/pMA91MF incubadas com água Milli-Q contendo 1 μM HgCl_2 ; **B.** - *S. cerevisiae* YPH252/pMA91MF incubada com água Milli-Q; **C1. e C2.** - *S. cerevisiae* YPH252/pMA91 (controle negativo) incubadas com água Milli-Q contendo 1 μM HgCl_2 ; **D.** - *S. cerevisiae* YPH252/pMA91MF incubadas com água Milli-Q. A visualização das células foi realizada com aumento de 15.000 vezes.

5.11 Análise da capacidade de adsorção de íons Hg^{2+} da linhagem recombinante *S. cerevisiae*

Foram realizados experimentos da capacidade de adsorção de íons Hg^{2+} da biomassa das células da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e da biomassa da respectiva linhagem controle YPH252/pMA91 (Material e Métodos, seção 4.19). Nestas análises de quantificação, foi empregada a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com geração de vapor frio (Figura 27).

Figura 27 - Adsorção de íons Hg^{2+} da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e da linhagem controle YPH252/pMA91.

As células de levedura foram previamente cultivadas em SD-THUAL, lavadas com solução salina 0.9% e incubadas em solução de HgCl_2 5,0 µM e 10,0 µM, por diferentes intervalos de tempo de incubação.

Os resultados obtidos indicam que a adsorção de Hg^{2+} da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF aumenta ao longo do tempo de incubação, chegando a adsorver 144,25 µg de Hg^{2+} /g peso seco de célula, após 240 min de incubação em 5,0 µM de HgCl_2 ; e, 229,43 µg de Hg^{2+} /g peso seco de célula em 10,0 µM de HgCl_2 , após esse mesmo intervalo de incubação. Ainda, foi observado, também que, nos primeiros 10 min de incubação em ambas as concentrações de

HgCl_2 estudadas, aconteceu uma rápida adsorção de Hg^{2+} pela linhagem recombinante e a linhagem controle e, nos intervalos de tempo de incubação seguintes, a velocidade de adsorção foi menor. Porém, a taxa de adsorção de Hg^{2+} da linhagem recombinante foi maior em relação à linhagem controle, após 10 min de incubação.

A linhagem de *S. cerevisiae* YPH252/pMA91MF apresentou maior taxa de adsorção de Hg^{2+} , após 10 min de incubação, quando comparada à linhagem controle YPH252/pMA91: 1) na presença de 5,0 μM de HgCl_2 , a linhagem recombinante YPH252/pMA91MF adsorveu 109,60 μg de Hg^{2+}/g peso seco em 10 min, 55% superior em relação à linhagem controle, que adsorveu 70,90 μg de Hg^{2+}/g peso seco; 2) na presença de 10,0 μM de HgCl_2 , a linhagem YPH252/pMA91MF adsorveu 173,77 μg de Hg^{2+}/g peso seco de célula, 84% superior em relação à linhagem controle, que adsorveu 94,54 μg de Hg^{2+}/g peso seco (Figura 28).

Figura 28 - Adsorção de íons Hg^{2+} da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e de sua respectiva linhagem controle, após 10 min de incubação.

	YPH252/pMA91MF $\mu\text{g Hg}^{2+}/\text{g}$ peso seco	YPH252/pMA91 $\mu\text{g Hg}^{2+}/\text{g}$ peso seco
5,0 μM	109,60	70,9
10,0 μM	173,77	94,54

A capacidade de adsorção de íons Hg^{2+} da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF incubada em diferentes concentrações de solução de HgCl_2 , após 120 min de incubação, a 28 °C, foi saturada em 15,0 μM de HgCl_2 , sendo que o máximo valor de acúmulo alcançado foi 374,86 μg de Hg^{2+} /g peso seco (Figura 29).

Figura 29 - Capacidade de adsorção de íons Hg^{2+} da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e de sua respectiva linhagem controle.

Adsorção de Hg^{2+} pelas células de levedura foi determinado em várias concentrações de HgCl_2 após 120 min de incubação, sob agitação, a 28 °C.

5.12 Análise da viabilidade celular das linhagens recombinantes de levedura após incubação em diferentes concentrações de HgCl_2

A análise da viabilidade das células da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e da linhagem controle YPH252/pMA91 foi realizada incubando-se ambas em presença de 5,0 μM e 10,0 μM de HgCl_2 por diferentes intervalos de tempo (Material e Métodos, seção 4.20). Verificou-se que após 240 min de incubação em 5,0 μM de HgCl_2 , a sobrevivência das linhagens recombinante e controle foi de aproximadamente 84% e 74%, respectivamente; quando incubada em 10,0 μM de HgCl_2 , após 24 min de incubação, a sobrevivência foi de aproximadamente 81% e 66%, respectivamente (Figura 29). A linhagem

recombinante apresentou maior sobrevivência do que a linhagem controle, sugerindo que o fato dos íons Hg^{2+} estarem ligados à proteína MerR na superfície celular impedia que eles chegassem à membrana celular e adentrassem para o interior da célula, causando maior estresse celular. Ao mesmo tempo, provavelmente, os mecanismos de detoxificação estavam ainda ativos nas células.

Figura 30 - Viabilidade celular da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e da linhagem controle YPH252/pMA91.

Células de levedura incubadas em 5,0 μM HgCl_2 (A) e 10,0 μM de HgCl_2 (B), em diferentes intervalos de tempo.

5.13 Curva de Crescimento

Com a finalidade de verificar se aconteceu alguma alteração na velocidade de crescimento da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF, produzida pela inserção do plasmídeo pMA91MF nas células de levedura, foi realizada uma curva de crescimento desta linhagem recombinante e da linhagem YPH252 (não transformada, controle) em meio SD-THUAL, durante 120 horas, a 28 °C, sob agitação em “shaker” (Material e Métodos, seção 4.20) (Figura 30).

Figura 31 - Curvas de crescimento da linhagem transformada YPH252/pMA91MF e da linhagem hospedeira não transformada YPH252 (controle).

As culturas foram crescidas em meio SD-THUAL, cultivadas a 28 °C, com agitação em “shaker”. Cada ponto representa a média de uma duplicata.

De acordo com o resultado obtido, a linhagem recombinante YPH252/pMA91MF e a linhagem YPH252 (hospedeira não transformada) apresentaram curvas de crescimento semelhantes.

6 DISCUSSÃO

Em organismos eucariotos, as proteínas ricas em cisteínas como metalotioneínas e fitoquelatinas tem uma alta afinidade por vários íons potencialmente tóxicos e são utilizadas na captação intracelular do metal. Porém, estas proteínas não apresentam a especificidade necessária para a remoção de um metal específico (Bontidean et al., 1998). No presente trabalho, a proteína metaloreguladora MerR foi utilizada para a construção de uma levedura bioissorvente de íons Hg^{2+} , visando a remoção deste metal tóxico. Esta proteína foi escolhida devido a seu domínio de ligação formado pelo arranjo trigonal de três cisteínas que formam um sítio de ligação altamente específico para Hg^{2+} .

Em trabalhos anteriores foi ancorada a fitolaquelatina sintética EC20 (Bae et al., 2001) e a proteína MerR (Bae et al., 2003) na superfície celular de *E. coli* para aumentar a captação e bioacumulação de mercúrio. No caso das células de *E. coli*, que expressaram a proteína EC20 na superfície celular, foi observado uma diminuição da capacidade de ligação a Hg^{2+} , superior a 20% na presença de 20 vezes de excesso de íons Cd^{2+} . A proteína MerR, expressa na superfície de células de *E. coli*, foi bastante específica e não foi observada diminuição da capacidade de ligação a Hg^{2+} , mesmo na presença de 100 vezes de excesso dos íons Cd^{2+} e Zn^{2+} . Ou seja, quando este trabalho foi iniciado, já se sabia que a fitoquelatina EC20 não apresenta especificidade de ligação para um determinado íon metálico, embora tenha diferentes graus de afinidade de ligação aos diferentes íons metálicos (Satofuka et al., 2001). Por esta razão, neste trabalho foi escolhida a proteína MerR, que apresenta uma elevada afinidade e especificidade aos íons Hg^{2+} .

Neste trabalho foi construído um sistema de ancoragem que permitiu ancorar a proteína MerR à parede celular de *S. cerevisiae*, visando melhorar sua capacidade de bioadsorção de íons Hg^{2+} na superfície celular. Os dados apresentados mostraram que, empregando o peptídeo sinal do fator alfa de *S. cerevisiae*, que tem como função sinalizar o transporte da proteína através da membrana plasmática; e, o sistema de ancoragem de Flo428 (Fuentes Rivera, 2008), que tem como função imobilizar a proteína MerR na parede celular de levedura, foi possível expressar e ancorar a proteína MerR à superfície celular externa de *S. cerevisiae*. Na construção deste sistema era necessário que o gene *merR* fusionado entre a sequência

codificadora do peptídeo sinal (SS) e a sequência codificadora do domínio de ancoragem (Flo428), não contivesse códons de terminação, afim de que a fusão gênica (SS - *merR* - Flo428) fosse traduzida com todos os componentes em uma única fusão protéica. A fusão gênica foi inserida no vetor pMA91, sendo expressa sob a regulação da sequência promotora e terminadora do gene *PGK*, obtendo-se o plasmídeo pMA91MF. O sistema construído foi sequenciado e verificamos que o cassete de expressão e ancoragem de MerR apresentou a sequência em correta fase de leitura, conforme desejado.

O plasmídeo pMA91MF foi mantido na linhagem *S. cerevisiae* YPH252 sobre pressão seletiva em meio SD-THUAL. A porcentagem de células crescidas sem pressão seletiva que mantiveram o plasmídeo foi de 64,1%. Assim, a porcentagem de perda foi de 35,9% (Figura 23). O número de gerações a cada 24 horas foi de aproximadamente 10; e, a cada geração, 3,5% do plasmídeo foi perdido. Portanto, os experimentos futuros sempre foram desenvolvido em meio SD-THUAL para garantir que todas as células da cultura da linhagem transformante de levedura YPH252/pMA91MF contenham o plasmídeo pMA91/MF.

S. cerevisiae não apresenta um sistema de resistência a mercúrio, baseado na redução de Hg^{2+} a Hg^0 e subsequente volatilização de Hg^0 para fora da célula, que é presente em várias bactérias, conferido pelo operon *mer*. Nos resultados de concentração inibitória mínima de crescimento (MIC) (Figura 24 e 25) foi observado que o crescimento da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* (YPH252/pMA91MF) foi maior do que da linhagem controle (YPH252/pMA91), ambas cultivadas em meio mínimo SD-THUAL contendo HgCl_2 . Esse resultado indicou que a resistência da linhagem recombinante a íons Hg^{2+} é produto da biossorção do Hg^{2+} na sua parede celular externa, através da ligação de Hg^{2+} à proteína MerR.

Os resultados de MET mostraram com clareza que a linhagem recombinante YPH252/pMA91MF se apresentou recoberta por uma camada de nanopartículas na superfície celular, confirmando a ligação dos íons Hg^{2+} à proteína MerR ancorada na superfície celular externa; este resultado não foi observado na linhagem controle. De fato, a linhagem controle só apresentou acúmulo de íons Hg^{2+} em suas estruturas celulares internas. As células da linhagem YPH252/pMA91MF apresentam, também, acúmulo de íons Hg^{2+} no interior celular, porém em menor quantidade do que as células da linhagem controle. Provavelmente, os íons Hg^{2+} se ligam aos grupos sulfidrilas (-SH) de alguns dos componentes da parede celular, como

manoproteínas e, em menor grau a outros grupos funcionais presentes na parede como carboxila, fosforila, hidroxila, etc. Desta forma os íons Hg^{2+} poderiam se difundir através da parede e atravessar a membrana plasmática, entrando no citosol da célula. Foi realizado um estudo preliminar utilizando a técnica Espectroscopia no Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR), vide Anexo A, sendo observados picos de absorção que indicam possíveis ligações do íon Hg^{2+} com o grupo carbonila. Porém será necessário realizar futuramente novas análises que confirmem as ligações do Hg^{2+} com os grupos funcionais presentes na parede celular de levedura.

Há vários trabalhos que reportaram a ligação de íons Hg^{2+} associada à parede celular e a ausência destes íons no citoplasma das células de levedura tratadas com HgCl_2 (Kaplan, Tacreiter, 1966; Rothstein, 1959). Em 1977, utilizando técnicas citoquímicas, Brown e Smith, demonstraram que em células da levedura *Cryptococcus albidus* incubadas com 100 μM de HgCl_2 , os íons Hg^{2+} estavam associados principalmente à parede celular, membrana plasmática, e também à membrana interna e externa de mitocôndrias, retículo endoplasmático e vesículas. Esses resultados estão em concordâncias com os de Murray e Kidby (1975) que demonstraram por técnicas bioquímicas que cerca de 80% dos íons Hg^{2+} permanecem fortemente associados à parede celular, quando as células de *S. cerevisiae* são incubada com 25,0 μM de HgCl_2 , durante 12 horas; nesse estudo, também, foi verificado que aproximadamente 20% dos íons adentram o citoplasma. Em 1960, Passow e Rothstein sugeriram a afinidade dos íons Hg^{2+} pela membrana plasmática de leveduras, causando danos irreversíveis na membrana e resultando na liberação de íons K^+ e outros ânions para o meio de cultura, quando as células da levedura *S. cerevisiae* são incubadas em 1,0 μM de HgCl_2 . Na membrana plasmática são realizadas varias funções e a presença de Hg^{2+} pode inibir algumas dessas funções, como por exemplo, a captação de tirosina pela levedura, função associada à membrana plasmática, é inibida pelo mercúrio (Ono et al., 1987, 1988). Em 1990, Whittaker empregando microscopia eletrônica, voltou a afirmar que depois do tratamento das células de *S. cerevisiae* com 1,0 μM de HgCl_2 , durante 2 horas, os íons Hg^{2+} permanecem associados à parede celular e membrana plasmática, não sendo praticamente encontrados no interior da célula.

Segundo Gueldry et al. (2003), a questão sobre a entrada e localização de íons Hg^{2+} no citosol permanece ainda com pontos a esclarecer.

Uma vez que a proteína MerR estava sendo expressa e ancorada à parede celular externa da linhagem *S. cerevisiae* recombinante YPH252/pMA91MF, foi possível analisar a capacidade de adsorção de Hg^{2+} desta linhagem. Para tanto, foi realizada a quantificação de íons Hg^{2+} ligados diretamente na massa microbiana, já que a quantificação do metal residual em solução representa uma medida indireta de que as células de levedura estão adsorvendo Hg^{2+} , e pode levar a erros e/ou interferências próprias do experimento de quantificação, considerando os baixos volumes analisados e a presença de resíduos do metal na parede dos tubos.

Os resultados obtidos (Figura 27 e 28) mostraram que a linhagem recombinante YPH252/pMA91MF apresentou uma melhora de 55% na capacidade de ligar Hg^{2+} em relação à linhagem controle, quando incubada com 5,0 μM de HgCl_2 , chegando a adsorver 109,6 μg de Hg^{2+} /g peso seco de células, após 10 min de incubação. Quando incubada em 10,0 μM de HgCl_2 , a linhagem YPH252/pMA91MF apresentou aumento de 84% na capacidade de ligar Hg^{2+} , em relação à linhagem controle, chegando a adsorver 173,77 μg de Hg^{2+} /g peso seco de células, após 10 min de incubação. Foi observado uma rápida adsorção inicial de Hg^{2+} pela linhagem recombinante sugerindo a ligação do metal à proteína MerR ancorada na superfície celular. Esses resultados mostraram que logo após 10 min iniciais de incubação foi adsorvido aproximadamente 76 e 75% do total de mercúrio adsorvido pela levedura após 240 min de incubação, em células incubadas com 5,0 μM e 10,0 μM de HgCl_2 , respectivamente.

Outro dado observado foi que a quantidade de Hg^{2+} adsorvido pelas células da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF aumenta com o incremento da concentração de HgCl_2 até atingir a saturação em 15,0 μM de HgCl_2 , após 120 min de incubação (Figura 29), sendo o máximo valor adsorvido 374,86 μg de Hg^{2+} /g peso seco de célula. Em estudos realizados por Madrid et al. (1995), referente à utilização de *S. cerevisiae* para separar seletivamente metilmercúrio e Hg^{2+} , foi observado que a adsorção de Hg^{2+} segue uma cinética de Michaelis-Menten baseado nos sítios de ligações saturáveis localizados na parede celular de levedura. No caso da proteína MerR foi reportado que a estequiometria de ligação de mercúrio à proteína foi de um íon de Hg^{2+} por dímero MerR (Shewchuk, 1989). O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho sugerem que os íons de Hg^{2+} se ligam à proteína MerR, ancorada na superfície celular da levedura, nos primeiros minutos de contato da célula com o metal; e que após a saturação da proteína

MerR, os íons Hg^{2+} , provavelmente, se difundem e penetram na membrana celular, entrando no citosol; este processo ocorreria de forma relativamente mais lenta. No trabalho de Bae et al. (2003) foi sugerido uma ligação instantânea de íon Hg^{2+} à proteína MerR ancorada na superfície celular da linhagem bacteriana *E. coli* JM109, seguido de ligações não específicas a outros componentes da membrana celular, que aconteceriam em períodos de tempo maiores. Portanto, a partir dos resultados obtidos inferimos que era necessário um tempo menor de incubação, para adsorção de íons Hg^{2+} acontecerem exclusivamente na superfície celular da levedura recombinante, evitando a entrada do metal no citosol da célula. Consequentemente, uma vez acumulado na superfície celular, os íons Hg^{2+} adsorvidos poderão ser recuperados. Desta forma, o bioissorvente pode ser re-utilizado, uma vez que não há necessidade de ruptura celular para a recuperação de íons de Hg^{2+} adsorvidos.

É importante ressaltar que há poucos trabalhos disponíveis na literatura relacionados a sistemas de bioacumulação de mercúrio em *S. cerevisiae* (Tabela 12). Assim, os mecanismos de resistência e/ou detoxificação de Hg^{2+} em *S. cerevisiae* estão bem menos esclarecidos que os mecanismos de resistência ao Cu^{2+} , e, em menor medida, também os mecanismos de resistência ao Cd^{2+} (Gross et al., 2000; Lee et al., 1999; Vido et al., 2001). Por exemplo, no trabalho de Zhu et al., 2004 verificou-se que *S. cerevisiae* foi utilizada como bioissorvente para a remoção de Hg^{2+} , conseguindo adsorver até 96% dos íons, após 15 min de incubação em 2,5 mM de Hg^{2+} em solução, e empregando uma biomassa celular de 40 g/L. Por outro lado, Mukherjee et al. (2009) isolaram uma mutante de *S. cerevisiae*, selecionada em meio mínimo contendo 0,15 mM Hg^{2+} , chamada de *S. cerevisiae* A100, para aumentar a bioissorção de mercúrio. Foi avaliado, também, o efeito dos elementos traços do meio mínimo sobre a bioissorção de Hg^{2+} pela linhagem *S. cerevisiae* A100; naqueles trabalhos os resultados indicaram que a adição de alguns íons metálicos como Fe^{2+} , Mn^{2+} e Mo^{6+} no meio mínimo contendo 1,5 mM de HgCl_2 aumentaram a eficiência de adsorção de Hg^{2+} de 90 a 96,6%, pelas células de levedura, após 48 horas de incubação (Mukherjee et al., 2010).

Ainda, se torna difícil comparar a capacidade de adsorção de Hg^{2+} da linhagem YPH252/pMA91MF, construída neste trabalho, com outras linhagens de *S. cerevisiae* descritas na literatura, já que os trabalhos não foram realizados nas mesmas condições. Foram empregadas diferentes condições de cultivo, tais como tempos de incubação, temperatura, concentrações de Hg^{2+} e utilização de

plasmídeos com diferentes números de cópias por célula, o que dificulta a comparação dos resultados.

Tabela 12 - Comparação da capacidade de bioacumulação de mercúrio das linhagens de *S. cerevisiae* descritas na literatura.

Levedura	Hg ²⁺ em Solução	Remoção	Bioacumulação	Tempo	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	0,5 g/L (2,5 mM/L)	96 %		15 min	Zhu et al., 2004
<i>S. cerevisiae</i>	0,6 g/L (2,5 mM/L)	99%	10 mg Hg ²⁺ /g cel		Su et al., 2006
<i>S. cerevisiae</i>			57 mg Hg ²⁺ /g cel	24 h	Al-Saraj et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i> KCTC (industrial)	0,2 g/L (1,0 mM/L)		40 mg Hg ²⁺ /g cel	24 h	Suh e Kim, 2000
<i>S. cerevisiae</i> A100 (mutante selecionada em meio mínimo contendo 0,15 mM Hg ²⁺)	0,3 g/L (1,5 mM/L)	90 %		48 h	Mukherjee e Banik, 2009
<i>S. cerevisiae</i> A100	0,3 g/L (1,5 mM/L)	96%		48 h	Mukherjee e Banik, 2010
<i>S. cerevisiae</i> YPH252/pMA91MF	0,001 g/L (0,005 mM/L)	76%	109,6 µg Hg ²⁺ /g cel	10 min	Neste trabalho
<i>S. cerevisiae</i> YPH252/pMA91MF	0,002 g/L (0,01 mM/L)	74%	173,0 µg Hg ²⁺ /g cel	10 min	Neste trabalho

Resing et al. (1992) expressou a proteína MerA na linhagem de *S. cerevisiae* AH22, a linhagem recombinante apresentou uma MIC de 50 µM, enquanto que a MIC da linhagem controle, transformada com o plasmídeo sem inserto MerA, foi de 10 µM, quando as células foram crescidas em meio mínimo contendo diferentes concentrações de HgCl₂, durante 72 horas. A atividade de MerA resultou em um aumento de cinco vezes da resistência ao Hg²⁺ pela linhagem recombinante em relação à linhagem controle.

Sistemas envolvendo a ancoragem da proteína MerR na superfície celular da levedura *S. cerevisiae* não foram descritos na literatura até agora. Devido às

características únicas da proteína MerR, já relatadas, esta proteína foi escolhida neste trabalho para ser expressa e ancorada na parede externa de *S. cerevisiae*, visando a utilização da linhagem de levedura recombinante para biorremediação de mercúrio.

No caso de bactérias, como já foi mencionado anteriormente, a proteína MerR foi expressada e ancorada na superfície celular da linhagem de *E. coli* JM109, a bactéria recombinante adsorveu 17,3 η mol de Hg^{2+} /mg de peso seco de célula, após 1 hora de incubação em meio LB contendo 5 μM de HgCl_2 , apresentando aumento da capacidade de acumular mercúrio nove vezes superior ao da linhagem original (Bae et al., 2003). Em recente trabalho desenvolvido por nosso grupo, a proteína MerR foi ancorada na superfície da bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34, os níveis de adsorção da linhagem recombinante *C. metallidurans* CH34/pCMHg foi de 1770 μg de Hg^{2+} /mg de peso seco de célula, após 1 hora de incubação em 15,0 μM de HgCl_2 , correspondendo a uma melhora de quatro vezes superior à da linhagem selvagem (434 μg de Hg^{2+} /mg de peso seco de célula) nas mesmas condições de cultivo (Parada, 2012).

Verificou-se também que a viabilidade celular da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF após 240 min de incubação, em 5,0 μM e 10,0 μM de HgCl_2 , foi aproximadamente 84% e 81%, respectivamente. Esses resultados indicam, que provavelmente, a entrada de Hg^{2+} no interior celular afetou as funções celulares; porém, os mecanismos de detoxificação de *S. cerevisiae* estavam ainda ativos, protegendo as células do efeito tóxico do Hg^{2+} .

A curva de crescimento da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF em condições normais de cultivo não apresentou qualquer diferença a da linhagem controle indicando que a expressão de MerR ancorada à superfície celular desta linhagem não causa perturbação ao seu crescimento e produção de biomassa, pelo menos nas condições analisadas.

A pesar de *S. cerevisiae* ter sido considerada um bioissorvente de metais de capacidade mediana em relação a outros micro-organismos (Volesky, 1994), a levedura apresenta várias vantagens que já foram mencionadas anteriormente (Introdução, seção 2.9.1) e que fazem dela um biomaterial interessante para estudos de bioissorção e aplicações práticas de emprego em biorremediação.

Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho confirmam a construção da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF com capacidade aumentada para biossorção de mercúrio, indicando que a estratégia de ancorar a proteína MerR na superfície celular de *S. cerevisiae* funciona e contribui para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas com a finalidade de descontaminar ambientes poluídos por mercúrio.

7 CONCLUSÕES

- Foi comprovada a construção do cassete de expressão e ancoragem da proteína MerR em vetor de transformação de *S. cerevisiae*. O novo vetor foi empregado, com sucesso, na transformação genética da linhagem de *S. cerevisiae* YPH252.
- Foi construída com sucesso a linhagem de levedura recombinante YPH252/pMA91MF que apresenta a proteína MerR ancorada na superfície celular.
- Foi comprovada a ligação do íon Hg^{2+} com a proteína MerR, bem como, a localização desta ligação na superfície celular externa da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF, pela técnica MET.
- A linhagem recombinante construída YPH252/pMA91MF mostrou ter capacidade aumentada de ligar Hg^{2+} em relação à linhagem de levedura controle YPH252/pMA91. Portanto, foi confirmada a funcionalidade do sistema de ancoragem da proteína MerR à superfície celular de levedura aumentando a biossorção de mercúrio pela linhagem recombinante, com potencial para ser utilizada como uma ferramenta biotecnológica para a biorremediação de águas contaminadas com mercúrio.
- .
- A levedura YPH252/pMA91MF, expressando a proteína MerR na superfície celular, não apresentou alterações quanto ao crescimento celular em relação à linhagem controle.

REFERÊNCIAS*

- Adle DJ, Sinani D, Kim H, Lee JA. Cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 2007;282:947-55.
- Alkorta I, Hernández-Allica Becerril JM, Amezaga I, Albizu I, Garbisu C. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. Rev Environ Sci Biotechnol. 2004;3:71-90.
- Almeida MD, Lacerda LD, Bastos WR, Herrmann JC. Mercury loss from soils following conversion from Forest topasture in Rondônia, Western Amazon, Brazil. Environ Pollut. 2005;137:179-86.
- Al-Saraj M, Abdel-Latif MS, El-Nahal I, Baraka R. Bioaccumulation of some hazardous metals by sol-gel entrapped microorganisms. J Non-Cryst solids. 1999;248:137-40.
- Avery SV, Tobin JM. Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol. 1992;58:3883-9.
- Babu BR, Parande AK, Basha CA. Electrical and electronic waste: a global environmental problem. Waste Manage Res. 2007;25:307-18.
- Bae W, Chen W, Mulchandani A, Mehra R. Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatins. Biotechnol Bioeng. 2000;70:518-23.
- Bae W, Mehra RK, Mulchandani A, Chen W. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. Appl Environ Microbiol. 2001;67:5335-8.
- Bae W, Mulchandani A, Chen W. Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. J Inorg Biochem. 2002;88:223-7.
- Bae W, Wu CH, Kostal J, Mulchandani A, Chen W. Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. Appl Environ Microbiol. 2003;69:6: 3176-80.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Bakkaloglu I, Butter TJ, Evison LM, Holland FS, Hancock IC. Screening of various types biomass for removal and recovery of heavy metals (Zn, Cu, Ni) by biosorption, sedimentation and desorption. *Water Sci Technol*. 1998;38(6):269-77.

Bakir F, Dambuji SF, Amin-Zaki L, Murthada M, Khalidi A, Al-Rawi NY, Tikrite S, Dhahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty, PA. Methylmercury Poisoning in Iraq. *Science*. 1973;181-230.

Bankar AV, Kumar AR, Zinjarde SS. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84:847-65.

Barkay, T. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27:355-84.

Barkay T, Wagner-Döbler I. Microbial transformations of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Adv Appl Microbiol*. 2005;57:1-52.

Barrineau P, Gilbert P, Jackson WJ, Jones CS, Summers AO, Wisdom S. The DNA sequence of the mercury resistance operon of the IncFII plasmid NR1. *J Mol Appl Genet*. 1984;2:601-19.

Berka T, Shatzman A, Zimmerman J, Strickler J, Rosenberg M. Efficient expression of the yeast metallothionein gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1988;170:21-6.

Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol*. 2008;82:493-512.

Boening DW. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*. 2000;40(12):1335-51.

Bontidean I, Berggren C, Johansson G, Csorgi E, Mattiasson B, Lloyd JR, Jakeman KJ, Brown N.L. Detection of heavy metal ions at femtomolar levels using protein-based biosensors. *Anal Chem*. 1998;70:4162-9.

Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour Technol*. 2000;74:63-7.

Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27(2-3):145-63.

Brown S. Metal-recognition by repeating polypeptides. *Nat Biotechnol*. 1997;15:269-72.

Bustard M, McHale AP. Biosorption of heavy metals by distillery derived biomass. *Bioprocess Eng.* 1998;19:351-3.

Byrnes-Brower JR, Ryan L, Pazirandeh M. Comparison of ion-exchange resins and biosorbents for the removal of heavy metals from plating factory wastewater. *Environ Sci Technol.* 1997;31:2910-4.

Canela MC. Determinação de mercúrio. São Paulo: UNICAMP; 1995.

Castoldi AI, Coccini T, Manzo L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Rev Environ Health.* 2003;18(1):19-31.

Caziñares, RO. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev Lat-Amer Microbiol.* 2000;42:131-43.

Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(1):45-66.

Champier L, Duarte V, Michaud-Soret I, Coves J. Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible rol in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the mer operon. *Mol Microbiol.* 2004;52(5):1475-85.

Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJ. Phytoremediation of soil metals. *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8:279-84.

Chen S, Wilson DB. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg²⁺ - contaminated environments. *Appl Environ Microbiol.* 1997b;63:2442-5.

Chen F, Shi X. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Crit Rev Oncol Hemat.* 2002;42:105-21.

Chrestensen CA, Starke DW, Mieyal JJ. Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J Biol Chem.* 2000;275:26556-65.

Clarkson TW. The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, Cleveland. 1997;34(3):369-403.

Clarkson TW. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect.* 2002;110(1):11-23.

Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J*. 1999;18:3325-33.

Clemens S, Schroeder JI, Degenkolb T. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem*. 2001;268:3640-3.

Condee CW, Summers AO. A mer-lux transcriptional fusion for real-time examination of in vivo gene-expression kinetics and promoter response to altered superhelicity. *J. Bacteriol*. 1992;174:8094-101.

Cordeiro RC, Turcq B, Ribeiro MG, Lacerda LD, Capitâneo J, da Silva AO, Sifeddine A, Turcq PM. Forest fire indicators and mercury deposition in an intense land use change region in the Brazilian Amazon (Alta Floresta, MT). *Sci Total Environ*. 2002;293:247-56.

Cross GAM. Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:83-110.

Da Silva SMG, Do Prado-Filho LG. Acúmulo de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* fermentando mosto de caldo de cana. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1998;18:414-20.

De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, Van de Peer Y, Callewaert N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*. 2009; 27: 561-66.

De Souza J, Barbosa A. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Quím Nov*. 2000;12:3-7.

Diels L, Lelie N, Bastiaens L. New developments in treatment of heavy metal contaminated soils. *Environ Sci Biotechnol*. 2002;1:75-82.

Dorea JG. Mercury in hair and in fish consumed by Riparian women of the Rio Negro, Amazon, Brazil. *Int J Environ Health Res*. 2003;13:239-48.

Dustin ML, Selvaraj P, Mattaliano RJ, Springer TA. Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature*. 1987;329:846-8.

Ecker DJ, Butt TR, Sternberg EJ, Neeper MP, Debouck C, Gorman JA, Crooke ST. Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J Biol Chem*. 1986;261:16895-900.

Environmental Protection Agency (EPA). Treatment technologies for mercury in soil, waste and water. 2007. Available from: <<http://www.epa.gov/tio/download/remed/542r07003.pdf>> [2012 Jul 27].

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metalinduced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 2001;1:529-39.

Ferguson MAJ, Williams AF. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:285-320.

Ferraz AI, Tavares T, Teixeira JA. Cr(III) removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Eng J.* 2004;105:11-20.

Fleet GH. Composition and structure of yeast cell walls. *Curr Top Med Mycol.* 1985;1:24-56.

Frantz B, O'Halloran TV. DNA distortion accompanies transcriptional activation by the metal-responsive gene-regulatory protein MerR. *Biochem.* 1990;29(20):4747-51.

Fredette B, Rutishauer U, Landmesser L. Regulation and activity-dependence of N-cadherin, NCAM isoforms, and polysialic acid on chick myotubes during development. *J Cell Biol.* 1993;123:1867-88.

Fu HL, Meng Y, Ordonez E. Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem.* 2009;284:19887-95.

Fuentes Rivera JPN. Construção de sistema que permite a ancoragem de proteína recombinante à superfície celular de *Saccharomyces cerevisiae*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Gadd GM, White C. Microbial treatment of metal pollution- a working biotechnology?. *Trends Biotechnol.* 1993;11:353-9.

Gadd GM, White C. Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology? *Trends Biotechnol.* 1993;11:353-9.

Gadd GM. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol.* 2000;11:271-9.

Gadd GM. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J Chem Technol Biotechnol*. 2009;84:13-28.

Gaylarde CC, Bellinaso ML, Manfio GP. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotechnol Cienc Desenvol*. 2005;34:36-43.

Georgiou G, Poetschke HL, Stathopoulos C, Francisco JA: Practical applications of engineering gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol*. 1993;11:6-10.

Ghosh M, Shen J, Rosen BP. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:5001-6.

Goksungur Y, Uren S, Guvenc U. Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass. *Bioresour Technol*. 2005;96:103-9.

Gomes NCM, Rosa CA, Pimentel PF, Mendonca-Hagler LCS. Uptake of free and complexed silver ions by different strains of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Braz J Microbiol* 2002;33:62-6.

Gouffreau A, Barrell BG, Bussey H, Da Vis RW, Dujon B, Feldmann H, Gaubert F, Hoheisel JD, Jacq C, Jonston M, Louis E, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Ouver SG. Life with 6000 genes. *Science*. 1996;274(546):563-7.

Grant CM. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol*. 2001;39:533-41.

Grass G, Fricke B, Nies DH. Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentration. *Biometals*. 2005;18(4):437-48.

Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO, Winge DR. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem*. 2000;275:32310-6.

Gueldry O, Lazard M, Delort F, Dauplais M, Grigoras I, Blanquet S, Plateau P. Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 2003;270:2486-96.

Guerra OG. Desenvolvimento de um novo sistema de transformação gênica que permite a inserção de múltiplas cópias de um gene desejado em elementos delta do retronsposon TY1 no genoma de *Saccharomyces* spp. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2006.

Ha SB, Smith AP, Howden R. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*. 1999;11:1153-64.

Hacon SS, Artaxo P, Gerab F, Yamasoe MA, Campos RC, Conti ALF, Lacerda LD. Atmospheric mercury and trace elements in the region of Alta Floresta in the Amazon basin. *Water Air Soil Pollut*. 1995;80:273-83.

Hacon SS, Rochedo ERR, Campos RC, Lacerda LD. Mercury exposure through fish consumption in the urban area of Alta Floresta in the Amazon Basin. *J Geochem Exploration*. 1997;58:209-16.

Hadfield C, Raina KK, Shashi-Menon K, Mount RC. The expression and performance of cloned genes in yeasts. *Micol Res*. 1993;97:897-944.

Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot*. 2002;53:1-11.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *J Biochem*. 1984;219:1-14.

Harada, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol*. 1995;25:1-24.

Hardwick KG, Boothroyd JC, Rudner AD, Pelham R.B. Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *J EMBO*. 1992;11:4187-95.

Harris GK, Shi X. Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat Res*. 2003;533:183-200.

Helmann JD, Ballard BT, Walsh CT. The MerR metalloregulatory protein binds mercuric ion as a tricoordinate, metal- bridged dimer. *Science*. 1990;247:946-8.

Hernández, A, Mellado, RP, Martínez, JL. Metal accumulation and Vanadium induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(11) :4317-20.

Hitzeman RA, Hagie FE, Levine HL, Goeddel DV, Ammerer G, Hall BD. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*. 1981;293:717-22.

Hobman JL, Brown NL. Bacterial mercury resistance genes. In: Sigel A, Sigel H, eds. *Metal Ions in Biological Systems*. New York: Marcel Dekker. 1997; 34, 527-68.

Hoffman RD, Lane MD. Iodophenylarsine oxide and arsenical affinity chromatography: new probes for dithiol proteins. Application to tubulins and to components of the insulin receptor-glucose transporter signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1992;267:14005-11.

Holtze MS, Nielsen P, Ekelund F, Rasmussen L D, Johnsen K. Mercury affects the distribution of culturable species of *Pseudomonas* in soils. *Appl Soil Ecol.*2006;(31):228-38.

Homans SW, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW, Anand R, Williams AF. Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature.* 1988;333:269-72.

Hou YM, Kim R, Kim SH. Expression of the mouse metallothionein-I gene in *Escherichia coli*: increased tolerance to heavy metals. *Biochim Biophys Acta.* 1988;951:230-4

Kambe-Honjoh H, Ohsumi K, Shimoi H, Nakajima H, Kitamoto K. Molecular breeding of yeast with higher metal-adsorption capacity by expression of histidine-repeat insertion in the protein anchored to the cell wall. *J Gen Appl. Microbiol.* 2000; 46:113-7.

Kaplan JG, Tacreiter W. The b-glucosidase of the yeast cell surface. *J. Gen. Physiol.* 50, 9-14. Lee J, Godon C, Lagniel G, et al. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem.* 1999;274:16040-6.

Kapoor A, Viraraghavan T. Fungi as biosorption. In: Wase DAJ, Forster CF, editors. *Biosorbents for Metal Ions.* London, UK: Taylor & Francis; 1997. p. 67-85.

Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, De La Crua J, Llobell A, Douwes JE, Shimoi H, Lipke PN, Klis FM. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked b-1,3-/b-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology.* 1996;6:337-45.

Karamushka VI, Gadd GM. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* with gold: toxicity and accumulation. *Biometals.* 1999;12:289-94.

Kedari CS, Das SK, Ghosh S. Biosorption of long lived radionuclides using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2001;17:789-93.

Kitchin KT, Wallace K. The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. *J Inorg Biochem.* 2008;102:532-9.

Kiyono M, Pan-Hou, H. Genetic Engineering of Bacteria for Environmental Remediation of Mercury. *J Health Science*. 2006;52(3):199-204.

Kiyono M, Pan-Hou H. The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. *J Bacteriol*. 1999;181:762-830.

Kjaergaard K, Schembri MA, Klemm P. Novel Zn²⁺ chelating peptides selected from a fimbria-displayed random peptide library. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:5467-73.

Klis FM. Cell wall assembly in yeast. *Yeast*. 1994;10:851-69.

Kondo AE, Ueda M. Yeast cell surface display – Application of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;64:28-40.

Kostal J, Yang R, Wu CH, Mulchandani A, Chen W. Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:4582-7.

Kotrba P, Dolcková L, Lorenzo V, Rulm T. Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:1092-98.

Kotrba P, Ruml T. Surface display of metal fixation motifs of bacterial P1-type ATPases specifically promotes biosorption of Pb²⁺ by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:2615-22.

Kukuruzinska MA, Bergh MLE, Jackson BJ. Protein glycosylation in yeast. *Ann Rev Biochem*. 1987;56:915-44.

Kuroda K, Shibasaki S, Ueda M, Tanaka A. Cell surface engineered yeast displaying a histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;57:697-701.

Kuroda K, Ueda M. Bioadsorption of cadmium ion by cell surface-engineered yeasts displaying metallothionein and hexa-His. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;63:182-6.

Kuroda K, Ueda M. Effective display of metallothionein tandem repeats on the bioadsorption of cadmium ion. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;70:458-63.

Kuroda K, Ueda M. Engineering of microorganisms towards recovery of rare metal ions *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 87:53-60.

Kuroda K, Ueda M. Molecular design of the microbial cell surface toward the recovery of metal ions. *Curr Opin Biotechnol*. 2011;22:427-33.

Lacerda LD, Solomons W. Mercury in the Amazon: a chemical time bomb?. CETEM/CNPq. Rio de Janeiro, RJ; 1991. 46 p.

Lacerda LD. Amazon Mercury emission, *Nature*. 1995;374:20-21.

Lacerda LD. Minamata livre de mercúrio. *Ciência Hoje*. 1997;133(23):25-31.

Lafaye A, Junot C, Pereira Y, Lagniel G, Tabet JC, Ezan E, Labarre J. Combined proteome and metabolite profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. *J Biol Chem*. 2005;280:24723-30.

Ledin M. Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil systems. *Earth-Sci Rev*. 2000;51:1-31.

Lee J, Godon C, Lagniel G. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem*. 1999;274:16040-46.

Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol*. 2003;21:45-51.

Li Q, Yu Z, Shao X, He J, Li L. Improved phosphate biosorption by bacterial surface display of phosphate-binding protein utilizing ice nucleation protein. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;299:44-52.

Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:42-7.

Lin ZY, Wu JM, Xue R, Yang Y. Spectroscopic characterization of Au³⁺ biosorption by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2005;61:761-5.

Lipke PN, Wojciechowicz D, Kurjan J. *AGa1* is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* a-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol Cell Biol*. 1989;9:3155-65.

Lipke PN, Ovalle R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J Bacteriol*. 1998;180:3735-40.

Liu RX, Tang HX, Lao WX. Advances in biosorption mechanism and equilibrium modeling for heavy metals on biomaterials. *Prog Chem*. 2002;14:87-92.

Liu YY, Du TS, Chen P, Tang DL, Ni ZJ, Gu PY, et al. Physico-chemical properties of adsorbing Pd^{2+} by *Saccharomyces cerevisiae* waste biomass. Chem J Chin Univ. 2003a;24(12):2248-5.

Liu N, Liao JL, Luo SZ, Yang YY, Jin JN, Zhang TM, et al. Biosorption of ^{241}Am by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. J Radioanal Nucl Chem. 2003b;258(1):59-63.

Lovely DR, Coates JD. Bioremediation of metal contamination. Curr Opin Biotech. 1997;8:285-9.

Lu C, Kurjan J, Lipke PN. A pathway for cell anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin. Mol Cell Biol. 1994;14:4825-33.

Lu CF, Montijn RC, Brown JL, Klis FM, Kurjan J, Bussey H, Lipke PN. Glycosylphosphatidylinositol-dependent cross-linking of α -agglutinin and β 1, 6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J Cell Biol. 1995;128:333-40.

Madrid Y, Cabrera C, Perez-Corona T, Cámara C. Speciation of methylmercury and Hg(II) using baker's yeast biomass (*Saccharomyces cerevisiae*). Determination by continuous flow mercury cold vapor generation atomic absorption spectrometry. Anal Chem. 1995;67:750-4.

Mauro JM, Pazirandeh M. Construction and expression of functional multi-domain polypeptides in *Escherichia coli*: expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene. Lett Appl Microbiol. 2000;30:161-6.

McIntyre T. Phytoremediation of heavy metals from soils. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2003;78:97-123.

Mejare M, Ljung S, Bulow L. Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as OmpA fusion proteins in *Escherichia coli*. Protein Eng. 1998;11:489-94.

Menzel DB, Hamadeh HK, Lee E. Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells. Toxicol Lett. 1999;105:89-101.

Mergeay M, Houba C, Gerits J. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in *Pseudomonas*. Arch Int Physiol Biochem. 1978;86:440-2.

Mergeay M, Monchy S, Vallaey T, Auquier V, Benotmane A, Bertin P, Taghavi S, Ounn J, Van Der Lelie O, Wattiez R. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. Microbiol Rev. 2003; 27(2-3):385-410.

Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, Tuite MF, Emtage JS, White S, Lowe PA, Patel T, Kingsman AJ, Kigsmans SM. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1983;24:1-14.

Meselson, M, Yan, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*. 1968; 217:1110-14.

Micaroni RC, Bueno, MM, Jardim W. Compostos de mercúrio. Revisão, métodos de determinação, tratamento e descarte. *Quím Nov*. 2000;23(4):487-95.

Miki BL, Poon NH, James AP, Seligy VL. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1982;150:878-89.

Misra TK. Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*. 1992;27:4-16.

Miyamoto C, Chizzonite R, Cowl R, Rupprecht K, Kramer R, Schaber M, Kumar G, Poonian M, Ju G. Molecular cloning and regulated expression of the human c-myc gene in *Escherichia* and *Saccharomyces*: comparison of the products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:7732-6.

Monchy S, Vallaeyes T, Bossus A, Mergeay M. Metal transport ATPase genes from *Cupriavidus metallidurans* CH34: a transcriptomic approach. *Int J Environ Anal Chem*. 2006;86(9):677-92.

Moore MJ, Distefano MD, Zydowsky LD, Cummings RT, Walsh CT. Organomercurial lyase and mercuric ion reductase: nature's mercury detoxification catalysts. *Acc Chem Res*. 1990;23:301-8.

Mrsa V, Ecker M, Cappellaro C, Teparic R, Tanner W. *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Proteins. *Food Technol.Biotech*. 1999;37:21-7.

Mrsa V, Tanner W. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*. 1999;15:813-20.

Mukherjee K, Banik AK. Studies on biosorption of Hg^{2+} by Hg^{2+} resistant living and non-living *Saccharomyces cerevisiae* 100: characterization of some physical parameters and spectroscopic studies. *J Ind Chem Soc*. 2009;86:849-56.

Mukherjee K, Banik AK. Effect of trace elements on biosorption of Hg^{2+} by Hg^{2+} tolerant *Saccharomyces cerevisiae* A100. *Int J Pharm Bio Sci*. 2010;192:1-10

Murai T, Ueda M, Yamamura M, Atomi H, Shibasaki Y, Kamasawa N, Osumi M, Amachi T, Tanaka A. Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:1362-6.

Murray AD, Kidby DK. Sub-cellular location of mercury in yeast grown in the presence of mercuric chloride. *J Gen Microbiol.* 1975;86:66-74.

Naganuma A, Miura N, Kaneko S, Mishina T, Hosoya S, Miyairi S, Furuchi T, Kuge S. GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FASEB J.* 2000;14:968-72.

Nakajima A. Effect of selenium or uranium bisorption. *J Radioanal Nucl Chem.* 2001;247:347-50.

Nakamura Y, Shibasaki S, Ueda M, Tanaka A, Fukuda H, Kondo A. Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;57:500-5.

Nguyễn-nhu NT, Knoop B. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicol Lett.* 2002;135:219-28.

Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999;51:730-50.

Nishitani T, Shimada M, Kuroda K, Ueda M: Molecular design of yeast cell surface for adsorption and recovery of molybdenum, one of rare metals. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;86:641-64.

Ono B, Sakamoto E, Yamaguchi K. *Saccharomyces cerevisiae* strains sensitive to inorganic mercury. III. Tyrosine uptake. *Curr. Genet.* 1987;11:399-406.

Ono B, Ohue H, Ishimara F. Role of cell wall in *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Hg²⁺. *J Bacteriol.* 1988;170:5877-82.

Outten FW, Outten CE, O'Halloran TV. Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. In: Storz G, Hengge-Aronis R, (eds.) *Bacterial stress responses*. American Society of Microbiology; Washington DC: 2000. p. 145-57.

Özer A, Özer D. Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. *J Hazard Mater.* 2003;100:219-29.

Parada CA. Construção e caracterização de linhagens bacterianas Gram-negativas recombinantes com capacidade aumentada para biorremediar efluentes contaminados com mercúrio ou arsênio [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Park JK, Lee JW, Jung JY. Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Enzyme Microb Technol*. 2003;33:371-8.

Passow H, Rothstein A. The binding of mercury by the yeast cell in relation to changes in permeability. *J Gen Physiol*. 1960;43:621-33.

Pazirandeh M, Chrisey LA, Mauro JM, Campbell JR, Gaber BP. Expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene in *Escherichia coli* and its effect on heavy-metal uptake. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995;43:1112-7.

Pazirandeh M, Wells BM, Ryan RL: Development of bacterium based heavy metal biosorbents: enhanced uptake of cadmium and mercury by *Escherichia coli* expressing a metal binding motif. *Appl Environ Microbiol*. 1998, 64:4068-72.

Peavy HS, Rowe DR, TchobanogloUS G. Environmental Engineering. Singapore: McGraw Hill Inc.1988.

Perego P, Howell SB. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;147:312-8.

Pérez-Corona T, Madrid Y, Cámara C. Evaluation of selective uptake of selenium (Se(IV) and Se(VI)) and antimony (Sb(III) and Sb(V) species by baker's yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). *Anal Chim Acta*. 1997;345:249-55.

Permina EA, Kazakov AE, Kalinina OV, Gelfand MS. Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in Eubacteria. *BMC Microbiol*. 2006;6:49-60.

Pinson B, Sagot I, Daignan-Fornier B. Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2000;36:679-87.

Popa K, Cecal A, Drochioiu G, Pui A, Humelnicu D. *Saccharomyces cerevisiae* as uranium bioaccumulating material: the influence of contact time, pH and anion nature. *Nukleonika*. 2003;48:121-5.

Porcella DB. Mercury in the Environment: Biogeochemistry. In: Watras CJ, Huckabee EJW. (editors) *Mercury pollution: integration and synthesis*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers; 1994. p..2-7.

Preveral S, Ansoborlo E, Mari S, Vavasseur A, Forestier C. Metal(loid)s and radionuclides cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of *YCF1*, glutathione and effect of buthionine sulfoximine. *Biochimie*. 2006;88:1651-63.

Qin J, Song L, Brim, Daly MJ, Summers A. Hg(II) sequestration and protection by the MerR metal-binding domain (MBD). *Microbiology*. 2006;152:709-19.

Ralston DM, O'halloran TV. Ultrasensitivity and heavy metal selectivity of the allosterically modulated MerR transcription complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:3846-50.

Rapoport AI, Muter OA. Biosorption of hexavalent chromium by yeasts. *Process Biochem*. 1995;30:145-9.

Rensing C, Kües U, Stahl U, Nies DH, Friedrich B. Expression of bacterial mercuric ion reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1992;174(4):1288-92.

Riordan C, Bustard M, Putt R, McHale AP. Removal of uranium from solution using residual brewery yeast: combined biosorption and precipitation. *Biotechnol Lett*. 1997;19:385-7.

Rojas LA, Yañez C, Gonzales M, Lobos S, Smalla K, Seeger M. Characterization of the Metabolically Modified Heavy Metal-Resistant *Cupriavidus metallidurans* Strain MSR33 Generated for Mercury Bioremediation. *PLoS One*. 2011;6(3):1-10.

Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: A Review. *Yeast*. 1992;8:423-88.

Rothstein A. Cell membranes as a site of action of heavy metals. *Fed Proc*. 1959 Dec;18:1026-38.

Roy A, Lu C-F, Marykwas DL, Lipke PN, Kurjan J. The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol Cell Biol*. 1991;11:4196-206.

Ruiz ON, Alvarez D, Gonzalez-Ruiz G, Torres C. Characterization of mercury bioremediation by transgenic bacteria expressing metallothionein and polyphosphate kinase. *BMC Biotechnol*. 2011;11:82.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor; 2001.

Samuelson P, Wernerus H, Svedberg M, Stahl S. Staphylococcal surface display of metal-binding polyhistidyl peptides. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:1243-8.

Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren PA, Stahl S: Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol.* 2002;96:129-54.

Sato N, Matsumoto T, Ueda M, Tanaka A, Fukuda H, Kondo A. Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;60:469-74.

Satofuka H, Fukui T, Takagi M, Atomi H, Imanaka T. Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *J Inorg Biochem.* 2001;86(2-3):595-602.

Sayers Z, Brouillon P, Vorgias CE, Nolting HF, Hermes C, Koch MH. Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* copper-metallothionein gene in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant protein. *Eur J Biochem.* 1993;212:521-8.

Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. Bioaccumulation of heavy metals by fimbrial designer adhesins. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;170:363-71.

Schreuder MP, Mooren AT, Toschka HY, Verrips CT, Klis FM. Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol.* 1996;14:115-20.

Schuurs AHB. Reproductive Toxicity of Occupational Mercury. A Review of the Literature. *J Dent.* 1999;27:249-56.

Sharma KG, Mason DL, Liu G, Rea PA, Bachhawat AK, Michaelis S. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell.* 2002;1:391-400.

Shewchuk LM, Verdine GL, Walsh CT. Transcriptional switching by the metalloregulatory MerR protein: initial characterization of DNA and mercury (II) binding activities. *Biochem.* 1989;28:2331-9.

Sikorski SR, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1989;121:19-27.

Silver S, Phung LT. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic:inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005;12:1-19.

Simmons P, Singleton I. A method to increase silver biosorption by na industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;45:278-85.

Soares EV, Soares HMVM. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environ Sci Pollut Res*. 2012;19:1066-83

Song WY, Sohn EJ, Martinoia E. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat Biotechnol*. 2003;21:914-9.

Song L, Caguiat J, Li Z, Shokes J, Scott RA, Olliff L, Summers AO. Engineered single-chain, antiparallel, coiled coil mimics the MerR metal binding site. *J Bacteriol*. 2004;186(6):1861-8.

Souza JR, Barbosa AC. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Rev Quím Nov Esc*. 2000;3.

Sousa C, Cebolla A, de Lorenzo V. Enhanced metalloadsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nat Biotechnol*. 1996;14:1017-20.

Sousa C, Kotrba P, Ruml T, Cebolla A, De Lorenzo V. Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J Bacteriol*. 1998;180:2280-4.

Stanisich VA, Bennett PM, Richmond MH. Characterisation of a translocation unit encoding resistance to mercuric ions that occurs on a nonconjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1977;129:1227-33.

Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Bio Med*. 1995;18:321-36.

Suh JH, Yun JW, Kim DS. Cation (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) exchange in Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng*. 1999a;21:383-7.

Suh JH, Yun JW, Kim DS. Effect of extracellular polymeric substances (EPS) on Pb^{2+} accumulation by *Aureobasidium pullulans*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 1999b;21:1-4.

Suh JH, Kim DS. Effects of Hg^{2+} and cell conditions on Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng*. 2000;23:327-9.

Summers AO. Organization, expression and evolution of genes for mercury resistance. *Annu Rev Microbiol*. 1986;40:607-34.

Summers AO. Untwist and shout – a heavy metal responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol*. 1992;174: 3097-101.

Su Xj, Zhu Ym, Shen Yb, Wei Dz, Han C. Mechanism of Hg(II) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. J Safety Environ. 2006;6

Szczyпка MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS & Thiele DJ. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance- associated protein. J Biol Chem. 1994;269:22853-7.

Tabak HH, Lens P, Van Hullebusch ED, Dejonghe W. Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides – 1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. Environ Science Biotechnol. 2005; 4(3):115-56

Taghavi S, Van der Lelie D, Mergeay M. Electroporation of *Alcaligenes eutrophus* with (mega) plasmids and genomic DNA fragments. Appl Environ Microbiol. 1994; 60(10):3585-91.

Taghavi S, Mergeay M, Nies D, Van-Der-Lelie D. *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment. Res Microbiol. 1997;148(6):536-51.

Teunissen AW, Holub E, Van Der Hucht J, Van Den Berg JÁ, Steensma HY. Sequence of the open reading frame of the *FLO1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 1993;9:423-7.

Thiele DJ, Hamer DH. Tandemly duplicated upstream control sequences mediate copper-induced transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* copper-metallothionein gene. Mol Cell Biol. 1986;6:1158-63.

Thomas D, Surdin-Kerjan Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol R. 1997;61:503-32.

Thorsen M, Di Y, Tängemo C, Morillas M, Ahmadpour D, Van der Does C, Wagner A, Johansson E, Boman J, Posas F, Wysocki R, Tamás MJ. The MAPK Hog1p modulates Fps1p dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. Mol Biol Cell. 2006;17:4400-10.

Towler DA, Gordon JI, Adams SP, Glaser L. The biology and enzymology of eukaryotic acylation. Ann Rev Biochem. 1988;57:69-99.

Ueda M, Tanaka A. Genetic immobilization of protein on the yeast cell surface. J Biotechnol. 2000;18:121-40.

United Nations Environment Program (UNEP). Chemicals: global mercury assessment. Geneva, 2002.

Valls M, Atrian S, Lorenzo V, Fernández LA. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol.* 2000;18:661-5.

Valls M, Lorenzo V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *J Inorg Biochem.* 2002;26:327-38.

Van Der Vaart JM, Chapman JW, Kliss FM, Verrips CT. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1995;177:3104-10.

Van Der Vaart JM, Biesebeke R, Chapman JW, Toschka HY, Klis FM, Verrips CT. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchor for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:615-20.

Vasudevan P, Padmavathy V, Dhingra SC. Kinetics of biosorption of cadmium on baker's yeast. *Bioresour Technol.* 2003;89:281-7.

Veglio F, Beolchini F. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy.* 1997;44:301-16.

Vidali M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl Chem.* 2001;73(7):1163-72.

Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2001;276:8469-74.

Vinopal S, Ruml T, Kotrba P. Biosorption of Cd^{2+} and Zn^{2+} by cell surface-engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2007; 60:96-102.

Vieira RH, Volesky B. Biosorption: a solution to pollution? *Int Microbiol.* 2000;3:17-24.

Volesky B. Biosorption and biosorbents. In: Volesky B, editor. *Biosorption of heavy metals*. Florida: CRC Press; 1990a. p. 3-5.

Volesky B. Biosorption by fungal biomass. In: Volesky B, editor. *Biosorption of heavy metals*. Florida: CRC Press; 1990b. p. 140-71.

Volesky B. Advances in biosorption of metals-selection of biomass types. *FEMS Microbiol Rev.* 1994;14:291-302.

Volesky B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*. 2001;59:203-16.

Vullo, DL. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*. 2003;2(3).

Walker GM. *Yeast Physiology and Biotechnology*. New York: John Wiley & Sons; 1998.

Wang JL. Immobilization techniques for biocatalysts and water pollution control. Beijing: Science Press; 2002a.

Wang JL. Biosorption of copper (II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem*. 2002b;37: 847-50.

Wang J, Cheng C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnol Adv*. 2006;24:427-51.

Wang J, Chen, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biothechnol. Adv*. 2009;27:195-226.

Watari J, Takata Y, Ogawa M, Sahara H, Koshino M, Onnela ML, Airaksinen U, Jaatinen R, Penttilä M, Keranen S. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast*, 1994;10:211-25.

Watton SP, Wright JG, Macdonnell FM, Bryson JW, Sabat M, O'Halloran TV. Trigonal mercuric complex of an aliphatic thiolate - a spectroscopic and structural model for the receptor- site in the Hg(II) biosensor MerR. *J Am Chem Soc*. 1990;112: 2824-6.

Wemmie JA, Szczypka MS, Thiele DJ, Moye-Rowley WS. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter encoding gene *YCF1*. *J Biol Chem*. 1994;269:32592-7.

Wernérus H, Lehtio J, Teeri T, Nygren PA, Ståhl S. Generation of metal-binding staphylococci through surface display of combinatorially engineered cellulose-binding domains. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:4678-84.

Wernérus H, Ståhl S. Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;40:209-28.

Whittaker SG, Smith DG, Foster JR, Rowland IR. Cytochemical localization of mercury in *Saccharomyces cerevisiae* treated with mercuric chloride. *J Histochem Cytochem*. 1990;38:823-7.

World Health Organization. Methylmercury. Geneva: WHO; 1990. 143 p. (Environmental Healthy Criteria, 101).

Wright JG, Tsang HT, Penner-Hahn J, O'Halloran TV. Coordination chemistry of the Hg-MerR metalloregulatory protein - evidence for a novel tridentate Hg-cysteine receptor-site. *J. Am. Chem. Soc.* 1990a;112:2434-5.

Wright JG, Natan MJ, Macdonnell FM, Ralston DM, O'Halloran TV. Mercury(II) thiolate chemistry and the mechanism of the heavy-metal biosensor MerR. *Prog Inorg Chem.* 1990b; 38:323-412.

Wysocki R, Bobrowicz P, Ułaszewski S. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem.* 1997;272:30061-6.

Wysocki R, Clemens S, Augustyniak D, Golik P, Maciaszczyk E, Tamás MJ, Dziadkowiec D. Metalloid tolerance based on phytochelatins is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem Bioph Res Commun.* 2003;304:293-300.

Wysocki R, Fortier PK, Maciaszczyk E, Thorsen M, Leduc A, Odhagen A, Owsianik G, Ułaszewski S, Ramotar D, Tamás MJ. Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol Biol Cell.* 2004;15:2049-60.

Wysocki R, Tamás M. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34:925-51.

Xie DD, Liu YY, Wu CL, Fu JK, Xue R. Studies on biosorption of Pd²⁺ by the immobilized *Saccharomyces cerevisiae* waste biomass. *Microbiology.* 2003a;30:29-34.

Xie DD, Liu YY, Wu CL, Chen P, Fu JK. Studies of Properties on the immobilized *Saccharomyces cerevisiae* waste biomass adsorbing Pt⁴⁺. *J Xiamen Univ.* 2003b;42:800-4.

Xu Z, Lei Y, Patel J. Bioremediation of soluble heavy metals with recombinant *Caulobacter crescentus*. *Bioeng Bugs.* 2010;1(3):207-12.

Yurieva O, Kholodii G, Minakhin L, Gorlenko Z, Kalyaeva E, *et al.* Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. *Mol Microbiol.* 1997; 24:321-9.

Zhang X, Yang F, Shim JY, Kirk KL, Anderson DE, Chen X. Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2007;255:95-106.

Zhu YM, Zhou DQ, Wei DZ. Biosorption of Hg^{2+} by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Northeastern University (Natural Science)*. 2004;25:89-91.

ANEXO A - Espectro de infravermelho (FTIR) de células de levedura da linhagem recombinante YPH252/pMA91MF **(A)** e da linhagem controle YPH252/pMA91 **(B)** incubadas em água (preto) e em 10 μM HgCl_2 por 2 horas (azul).