DIOGO PINETTI MARQUEZONI

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA BACTERIORODOPSINA EM *Cupriavidus necator*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2011

DIOGO PINETTI MARQUEZONI

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA BACTERIORODOPSINA EM *Cupriavidus necator*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg.

Versão Corrigida. A versão original encontra-se arquivada no setor de comunicação do ICB III.

São Paulo
2011

PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOTECNOLOGIA
USP I. BUTANTAN IPT
Avenida Prof. Lineu Prestes, 2415 (ICB-III)- Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" - Butantã
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - Tel. (011) 3091-7728 - Fax. (11) 3091.7728
email biotec@icb.usp.br

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOTECNOLOGIA USP

Certificamos que o projeto intitulado **Clonagem e Expressão da Bacteriorodopsina em *Cupriavidus necator***, desenvolvido pelo aluno **Diogo Pinetti Marquezoni,** sob a orientação da **Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg**, foi analisado na presente data pela Comissão de Pós Graduação do Programa Interunidades de Biotecnologia, tendo sido liberado, uma vez que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) e Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP_{SH}).

São Paulo, 5 de setembro de 2011.

Ana Clara Schenberg

Profa. Dra. ANA CLARA GUERRINI SCHENBERG
Presidente da Comissão Interunidades do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - USP

Dedico esta dissertação

Aos meus pais,
Nivaldo e Zenilda

À minha família.
por toda força e oração

As pessoas mais importantes
da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Este espaço é reservado para demonstrar minha gratidão a todos que, de maneira solícita, diretamente auxiliaram para a confecção desta dissertação. Tive o privilégio de ter contado e convivido com grandes pesquisadores, excelentes educadores e inestimáveis pessoas, sem as quais a conclusão deste trabalho não seria possível.

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, pela vida! Por me guiar aos caminhos que me tornaram um melhor filho, pesquisador e ser humano.

Agradeço aos meus pais Nivaldo e Zenilda, pelo exemplo de amor, dedicação, honestidade e educação que sempre foram e serão os pilares de minha vida e futuro de nossa família. Nunca me deixaram abater nos momentos mais difíceis, enviaram força e esperança, me guiaram e motivaram desde o início ao fim do presente trabalho.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg, uma educadora exemplar que proporcionou minha iniciação a carreira científica. Dedico grande parte de meu amadurecimento profissional à notável dedicação e compreensão desta pesquisadora.

Tenho imensa alegria e honra de ter participado do grupo Genética de Microrganismos, agradeço a todos que fizeram parte deste grupo: Profa. Elisabete Vicente, Ana Cristina, Belisa, Cleide, Oeber, Ronaldo, Fabio, Tais, Carol. Felipe e Jéssica.

A Andreia Gouveia e Ilana Racowski duas pesquisadoras com enorme capacidade intelectual que tive o privilégio de acompanhar durante minha carreira na USP. Agradeço pelos ensinamentos e enorme auxílio prestado ao presente trabalho, sem ambas, nada disso será possível.

Aos meus amigos irmãos Vinicius Canato Santana e Ana Raquel Monteiro, pelos momentos de alegria e descontração, compreensão e discussões profissionais.

A minha amiga e conselheira Mariana Rangel por toda força, ensinamentos e compreensão.

A toda equipe do Laboratório de Técnicas Especiais do Hospital Israelita Albert Einstein, principalmente ao setor de Biologia Molecular. O auxílio e força por parte de meus companheiros analistas e compreensão de meus gestores Dra. Roberta Sitnik e Dr. João Renato.

A minha companheira Emanuelle G. Recco pelo auxílio e apoio para o término deste trabalho.

Aos meus amigos de Arapongas e Maringá: Rubão, Joubert, André, Diogo Bueno, Brunão, Vitão, Tadeu, entre outros.

Meus sinceros agradecimentos!

“Le hasard ne favorise que les esprits préparés”

Louis Pasteur

RESUMO

MARQUEZONI, D.P. **Clonagem e expressão do gene da bacteriorodopsina em *Cupriavidus necator*.** 2011**.** 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros produzidos por diversas bactérias como material de reserva de carbono e energia, quando se encontram em condições de limitação de nutrientes. Os PHAs apresentam propriedades termoplásticas comparáveis às dos plásticos de origem petroquímica, além de apresentarem a vantagem de ser totalmente biodegradáveis, em contraste aos plásticos convencionais, que podem permanecer no meio ambiente por várias centenas de anos. Entretanto, o preço de tais biopolímeros não é competitivo com o dos plásticos convencionais, sendo, portanto necessário reduzir os custos com a matéria-prima. A bactéria *Cupriavidus necator* DSMZ 545 é uma beta-proteobactéria não-patogênica, quimiolitoautotrófica facultativa e é considerada como organismo modelo para a produção de PHA. Embora haja, na literatura, estudos mostrando que esta bactéria é capaz de produzir PHA utilizando CO_2 como fonte de carbono, existem sérias limitações para o seu cultivo autotrófico. Visando otimizar a capacidade autotrófica desta bactéria, foi realizada neste trabalho a clonagem e expressão do gene da bacteriorodopsina (*bop*) em *C. necator*. A bacteriorodopsina é uma proteína de membrana, produzida por certas *Archaea* halofílicas, por ação da qual a energia luminosa é convertida em um gradiente de prótons, que pode ser utilizado pela célula para produzir ATP. Para garantir a expressão do gene heterólogo na linhagem recombinante, inicialmente procurou-se um promotor que atuasse de forma forte e constitutiva em *C. necator*. Para tanto, foram examinados dois plasmídeos, construídos anteriormente no nosso laboratório, pLEGFP e pBB-panEGFP, contendo, respectivamente, o promotor do operon da lactose de *Escherichia coli* (plac) ou um promotor derivado do gene *mrgA* de *Bacillus subtilis* (pan), no comando do gene da proteína verde fluorescente (*egfp*). O promotor pan proporcionou alta expressão constitutiva do gene repórter em *C. necator*, verificada qualitativamente por microscopia de fluorescência e quantificada por citometria de fluxo. Por outro lado, o gene *bop* foi amplificado por PCR, a partir do DNA genômico de *Halobacterium salinarum* RI, e clonado em um vetor comercial. Em seguida, o gene *egfp* foi substituído pelo gene *bop* no plasmídeo pBB-panEGFP. Os plasmídeos de quatro clones, obtidos a partir da transformação de *C. necator* com esta construção, foram analisados por perfil de restrição, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA, confirmando o sucesso da construção. A expressão e correta localização da bacteriorodopsina num dos clones transformantes foi verificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Por fim, foram analisados os efeitos biológicos da expressão da bacteriorodopsina neste clone recombinante de *C. necator*, tendo sido verificado que, sob iluminação, a bacteriorodopsina é capaz de promover maior produção de ATP, assim como produção aumentada de PHA, sem afetar o crescimento celular.

Palavras-chave: Bacteriorodopsina. *Cupriavidus necator*. Polihidroxialcanoatos. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

MARQUEZONI, D.P. **Cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene in *Cupriavidus necator*.** 2011**.** 85 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Polyihydroxyalcanoates (PHAs) are polymers produced by several bacteria as carbon and energy storage materials, under nutrient-limited conditions. PHAs show comparable thermoplastic properties with plastics from petrochemical origin and present the advantage of being completely biodegradable, in contrast to the conventional plastics, which persist in the environment for several hundred years. However, the price of such biopolymers is not competitive with that of conventional polymers, hence it is necessary to reduce the costs related to raw materials. *Cupriavidus necator* DSMZ 545 is a non-pathogenic, facultative chemolithoautotrophic beta-proteobacterium, which is considered as a model organism for PHA production. Although previous studies in the literature show that this bacterium is able to produce PHA utilizing CO_2 as the carbon source, there are severe limitations for its autotrophic cultivation. In the present work, with the purpose of optimizing the autotrophic capability of this bacterium, the cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene (*bop*) was undertaken in *C. necator*. Bacteriorhodopsin is a membrane protein, produced by certain halophilic *Archaea*, which is able to convert light energy in a proton gradient that can be utilized by the cell for ATP production. In order to insure the expression of the heterologous gene in the recombinant strain, the first step consisted to find a promoter acting in a strong and constitutive mode in *C. necator*. To this end, we examined two plasmids, previously constructed in our laboratory, pLEGFP and pBB-panEGFP, which carry the promoter of the *Escherichia coli* lactose operon (plac), or a promoter deriving from the *Bacillus subtilis mrgA* gene (pan), respectively, to drive the expression of the gene encoding the green fluorescent protein (*egfp*). The pan promoter was found to provide high constitutive expression of the reporter gene in *C. necator*, as shown qualitatively by fluorescence microscopy and quantitatively by flow citometry. On the other hand, using *Halobacterium salinarum* RI genomic DNA as the template, the *bop* gene was PCR amplified and cloned in a commercial vector. Thereafter, the *egfp* gene was replaced by the *bop* gene in the pBB-panEGFP plasmid. The plasmids of four clones resulting from transformation of *C. necator* with the new construct were analyzed by restriction profiles, PCR amplification, and DNA sequencing, and the results confirmed the success of the construct. The bacteriorhodopsin expression and correct location in one of the transformant clones was verified through SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, the biological effects of bacteriorhodopsin expression in this *C. necator* recombinant clone were examined, showing that, upon illumination, bacteriorhodopsin expression is able to promote an increase in ATP production, as well as an increase in PHA production, without affecting cell growth.

Key words: Bacteriorhodopsin. *Cupriavidus necator*. Polyhydroxyalkanoates. Heterologous expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

bR	Bacteriorodopsina
BSA	Albumina de soro bovino
CBB	Ciclo de Calvin-Benson-Basshan
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
D.O.	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFP	Proteína verde fluorescente
IPTG	Isopropil-beta-D-Thiogalactopyranoside
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
p/v	Peso por volume
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Log $[H^+]$
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
TEB	Solução tampão Tris-ácido bórico-EDTA
TEMED	Tetramethilethilenediamine
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
UV	Luz ultravioleta
v/v	Volume por volume
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosideo
U.F.C.	Unidade Formadora de Colônia
M.M.	Meio Mineral
PR	Proteorodopsina
PSA	Persulfato de Amônio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura dos Polihidroxialcanoatos (PHA) 3
Figura 2 - Degradação de P(3HB-3V)..... 4
Figura 3 - Operon phbCAB de *C. necator* 6
Figura 4 - Bioenergética e função das duas hidrogenases de bactérias aeróbicas quimiolitoautotróficas..... 7
Figura 5 - Modelo de mecanismo para a atividade da bacteriorodopsina. 11
Figura 6 - Representação esquemática do plasmídeo pCR®2.1-TOPO®..... 14
Figura 7 - Representação esquemática do plasmídeo pBBR1MCS 14
Figura 8 - Representação esquemática do plasmídeo pBBEGFP..... 15
Figura 9 - Representação esquemática do plasmídeo pLEGFP..... 15
Figura 10 - Representação esquemática do plasmídeo pBB-panEGFP. 16
Figura 11 - Representação esquemática dos sítios de reconhecimento das enzimas *NdeI* e *XhoI* .27
Figura 12 - Etapas de confirmação do clone de *C. necator* hospedando o plasmídeo pLEGFP...38
Figura 13 - Etapas de confirmação do clone *C. necator* hospedando o plasmídeo pBB-panEGFP. 39
Figura 14 - Visualização de células de *E. coli* selvagem e recombinante em microscópio de epifluorescência com aumento de 1000 vezes..... 40
Figura 15 - Visualização de células de *C. necator* selvagem e recombinante em microscópio de epifluorescência com aumento de 1000 vezes..... 40
Figura 16 – Perfis eletroforéticos dos plasmídeos pBBRIMCS e pBBEGFP obtidos dos clones de *C. necator* 41
Figura 17 - Intensidade de fluorescência relativa medida através da citometria de fluxo nas diferentes linhagens de *C. necator*.. 42
Figura 18 – Análise eletroforética do DNA total de *H. salinarum* RI. 43
Figura 19 - Diluição do DNA genômico de *H. salinarum* RI. 44
Figura 20 - PCR gradiente..... 45
Figura 21 - Obtenção do *amplicon* do gene *bop*..... 45
Figura 22 - Esquema da construção do plasmídeo pTOPO-bop. 46
Figura 23 - Estratégias utilizadas para comprovar o sucesso da construção do vetor pTOPO-bop.... 47
Figura 24 - Obtenção do vetor e inserto para construção do plasmídeo pBB-panbop 48
Figura 25 - Esquema da construção do plasmídeo pBB-panbop..... 49
Figura 26 - Análise dos clones transformantes de *E. coli* contendo o plasmídeo pBB-panbop.... 50
Figura 27 - Confirmação da obtenção dos clones transformantes de *E. coli* contendo o plasmídeo pBB-panbop..... 50
Figura 28 - Estratégia utilizada para sequenciamento dos clones transformantes 4, 7, 8 e 12.....51
Figura 29 - Análise dos clones transformantes em *C. necator* contendo o plasmídeo pBB-panbop 52
Figura 30 - Confirmação da obtenção dos clones transformantes de *C. necator* contendo o plasmídeo pBB-panbop.. 52
Figura 31 - Perfis de migração de proteínas totais em SDS-PAGE após eletroforese e coloração com comassie blue..... 53
Figura 32 - Perfis de migração da fração solúvel (FS), membrana interna (MI) e membrana externa (ME) em SDS-PAGE após eletroforese e coloração com comassie blue..... 54
Figura 33 - (D.O.) Curvas de crescimento em presença de luz (λ_{570nm})..... 56

Figura 34 - (D.O.) Curvas de crescimento em ausência de luz. 56
Figura 35 - (U.F.C.) Curvas de crescimento em presença de luz (λ_{570nm})..... 57
Figura 36 - (U.F.C.) Curvas de crescimento em ausência de luz. 57
Figura 37 - Consumo de glicose ao longo do crescimento em presença de luz (λ_{570nm})..... 59
Figura 38 - Consumo de glicose ao longo do crescimento em ausência de luz.. 59
Figura 39 - Concentração da massa seca celular em função do tempo de cultivo em presença de luz (λ_{570nm}).. 61
Figura 40 - Concentração da massa seca celular em função do tempo de cultivo em ausência de luz. 61
Figura 41 - Teor de PHA nas diferentes linhagens..... 62
Figura 42 - Teor de PHA das diferentes linhagens cultivadas sem adição de retinal 64
Figura 43 - Análise *in silico* das vias metabólicas de *C. necator* DSMZ 545.....67
Figura 44 - Curvas de crescimento sem adição de fonte de carbono (λ_{600nm}). 68
Figura 45 - Curvas de crescimento da linhagem *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em presença de luz..... 69
Figura 46 - Curvas de crescimento da linhagem *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em ausência de luz..... 70
Figura 47 - Curvas de crescimento da linhagem selvagem *C. necator* DSMZ 545 cultivada em presença de luz..... 70
Figura 48 - Curvas de crescimento da linhagem selvagem *C. necator* DSMZ 545 cultivada em ausência de luz..... 71
Figura 49 - Curvas de crescimento dos controles..... 73
Figura 50 - Curvas de crescimento com borbulhamento de CO_2. 73
Figura 51 - Cinética de produção de ATP pelas diferentes linhagens..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos utilizados no presente trabalho. 13
Tabela 2 - Reação para amplificação do gene *bop* 28
Tabela 3 - Programa para amplificação do gene *bop* por PCR..... 29
Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho..... 29
Tabela 5 - Taxa de uso preferencial de códons em diferentes microrganismos 37
Tabela 6 - Diferentes temperaturas de *annealing* utilizadas para o PCR gradiente. 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA 1
1.1 Impacto ambiental dos plásticos derivados do petróleo 1
1.2 Polihidroxialcanoatos 2
1.3 A bactéria *Cupriavidus necator* 5
1.4 Matérias-primas 7
1.5 Rodopsinas 9
1.6 A bacteriorodopsina 9
2 OBJETIVOS 12
2.1 Objetivo principal 12
2.2 Objetivos parciais 12
3 MATERIAIS E MÉTODOS 13
3.1 Microrganismos 13
3.2 Plasmídeos 13
3.3 Meios de cultura 16
3.3.1 Meios de cultura para o cultivo de bactérias 16
3.3.2 Meio de cultura para o cultivo de *H. salinarum* RI 17
3.3.3 Meio de cultura para o acúmulo de PHA por *C. necator* 18
3.4 Condições de cultivo 18
3.5 Reagentes e Soluções 18
3.5.1 Soluções para extração e purificação de DNA 18
3.5.2 Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose 19
3.6 Extração e purificação de DNA 20
3.6.1 Extração e purificação de DNA genômico de *H. salinarum* RI 20
3.6.2 Extração e purificação de DNA bacteriano 21
3.6.3 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep) 21
3.6.4 Preparação de DNA plasmidial em grande escala (maxi-prep) 22
3.7 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose 23
3.8 Tratamento do DNA plasmidial com enzimas de restrição 23
3.9 Purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose 23
3.10 Ligação entre fragmentos de DNA 24
3.11 Transformação genética das bactérias 24
3.12 Caracterização do perfil protéico através de SDS-PAGE 26
3.13 Separação das frações de membranas 26
3.14 Reação de Polimerização em Cadeia do DNA – PCR 27
3.14.1 Amplificação por PCR do gene *bop* a partir do genoma de *H. salinarum* RI 27
3.14.2 Oligonucleotídeos empregados em reações de PCR 29
3.15 Análise de *codon usage* 29
3.16 Quantificação da expressão da proteína verde fluorescente por citometria de fluxo 30
3.17 Avaliação da linhagem selvagem e recombinante em cultivo suplementado com glicose 31
3.17.1 Crescimento Celular – Densidade Óptica (D.O.) 31
3.17.2 Crescimento Celular – Unidade Formadora de Colônias (U.F.C) 31
3.17.3 Consumo de Fonte de Carbono 32
3.17.4 Massa Seca Celular 32
3.17.5 Cromatografia Gasosa 33

3.18 Curva de Crescimento em Ausência de Fonte de Carbono 33
3.19 Cultivo das Células em Microaeforilia e Luz Solar..... 34
3.20 Cultivo das Células em Biorreator..... 34
3.21 Monitoramento de ATP intracelular 35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 36
4.1 Análise de uso preferencial de códons (*codon usage)* 36
4.2 Escolha do promotor para expressão da proteína heteróloga 37
4.3 Análise qualitativa de expressão da EGFP dirigida pelos promotores *lac* e *pan*..... 39
4.4 Quantificação da expressão da proteína EGFP através da citometria de fluxo 41
4.5 Construção do plasmídeo pBB-panbop 43
4.5.1 Amplificação do gene *bop*..... 43
4.5.2 Clonagem do gene *bop* no vetor pCR®2.1-TOPO® 45
4.5.3 Clonagem do gene *bop* no vetor pBB-panEGFP..... 47
4.6 Transformação de *Cupriavidus necator* DSMZ545 com o plasmídeo . pBB-panbop.....51
4.7 Análise de expressão da proteína recombinante..... 53
4.8 Avaliação da Função Biológica..... 55
4.8.1 Avaliação da Linhagem Selvagem e Recombinante em Cultivo Aeróbio com Glicose . 55
4.8.2 Crescimento sem Adição de Fonte de Carbono Orgânico 67
4.8.3 Cultivo das Células com a Respiração Inibida 68
4.8.4 Cultivo das Células em Biorreator..... 72
4.8.5 Efeito sobre a Produção de ATP pelas Células..... 76
5 CONCLUSÕES..... 79
6 REFERÊNCIAS..... 80

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Impacto ambiental dos plásticos derivados do petróleo

Há muitas décadas, polímeros provenientes do petróleo vêm sendo desenvolvidos para suprir as necessidades da sociedade moderna. Hoje, estima-se que a produção de termoplásticos seja da ordem de 180 milhões de toneladas/ano, sendo que mercados consumidores, como a Índia e a China, antecipam um potencial de crescimento em sua produção, da ordem de 5 a 6% ao ano. Esta elevada demanda é decorrente das inúmeras aplicações dos plásticos, que podem substituir matérias-primas convencionais, como metais, vidro e papel (PRADELLA, 2006).

No Brasil, o setor de plásticos ocupa uma posição de destaque econômico, respondendo por 1,45% do Produto Interno Bruto (PIB). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia (IBGE), cerca de 3% do total de indústrias instaladas no Brasil estão diretamente relacionadas com a produção de material plástico. Em 2010, o consumo de plásticos no país foi de 6,2 milhões de toneladas, sendo os segmentos de mercado que mais utilizam materiais plásticos, o alimentício (25,9%), seguido pela construção civil (14,6%), embalagens diversas (14,5%), utilidades domésticas (9,7%), higiene e limpeza (7,7%), agrícola (4,1%), eletrodomésticos (2,3%), cosmético e farmacêutico (2,2%), calçados (1,9%), automobilístico (1,4%) e brinquedos (0,1%) (Associação Brasileira da Indústria do Plástico, 2010).

Devido à grande produção e vasta difusão em diferentes segmentos do mercado, a quantidade de resíduos plásticos descartados anualmente tem aumentado exponencialmente, o que desperta preocupações quanto ao impacto no meio ambiente. Outro agravante deste problema é a forma com que os materiais plásticos se comportam quando descartados na natureza. De lenta degradabilidade, a estimativa é de que os plásticos provenientes da indústria petroquímica demorem até 400 anos para se decompor e, além disto, quando depositados em aterros sanitários, prejudicam a circulação de gases e a troca de líquidos resultantes do processo de decomposição da matéria orgânica (ISHIZAKI et al., 2001).

Diversos processos são empregados a fim de minimizar o impacto ambiental dos plásticos derivados de petróleo, como é o caso da incineração e da reciclagem. A incineração ainda é alvo de muitas críticas, já que, durante o processo, ocorre a produção de diversos gases tóxicos, principalmente de altas concentrações de CO_2. Embora esta técnica esteja sendo aprimorada, existindo incineradores com filtros acoplados que possuem a capacidade de controlar a emissão

desses gases, trata-se de um sistema complexo e caro, de difícil implementação no Brasil. A reciclagem também apresenta um custo elevado e existe uma limitação no número de ciclos do reaproveitamento: após sete ciclos de reciclagem, o material começa a perder suas propriedades e necessita ser descartado (Associação Brasileira da Indústria Química e de Produtos Derivados, 1997).

O desenvolvimento de novas estratégias sustentáveis é, portanto necessário, principalmente a busca por materiais plásticos com características menos agressivas ao meio ambiente. Neste cenário, os plásticos biodegradáveis representam a melhor solução como substitutos dos plásticos petroquímicos. Os polímeros biodegradáveis podem ser divididos em três principais categorias (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005):

a) Polímeros sintetizados quimicamente: Estes polímeros são susceptíveis a ações enzimáticas e degradação por microrganismos, porém não apresentam todas as propriedades dos plásticos petroquímicos. Ex: ácido poliláctico.
b) Polímeros biodegradáveis com base de amido: O amido é utilizado como complemento para a ligação da estrutura do composto, formando um misto de amido e plástico. Microrganismos, principalmente do solo, possuem a capacidade de degradar amido facilmente, levando ao enfraquecimento da matriz polimérica. Por apresentar grande parte de sua composição de plástico convencional, esta classe de polímero é apenas parcialmente biodegradável. Ex: polietileno-amido.
c) Polímeros sintetizados por microrganismos - Polihidroxialcanoatos (PHAs): São 100% biodegradáveis e produzidos a partir de matérias primas renováveis. Tais polímeros são sintetizados como material de reserva energética em condições que exigem limitação de nutrientes e, quando o ambiente se torna propício para a utilização dessa reserva, são degradados nos monômeros correspondentes. Ex: polihidroxibutirato (PHB).

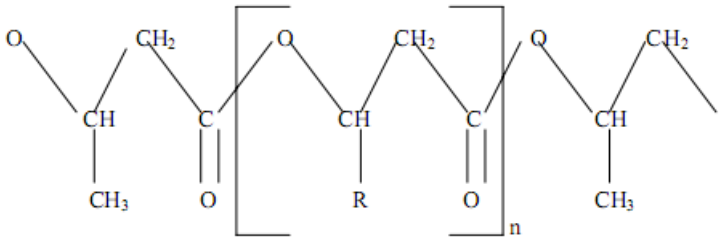
1.2 Polihidroxialcanoatos

PHA é o termo genérico aplicado à família de poliésteres produzidos e acumulados por diversos microrganismos na forma de grânulos intracelulares. Em geral, a síntese de PHA ocorre em meios de crescimento desbalanceados, apresentando excesso de carbono e limitação de, pelo menos, um nutriente necessário para a multiplicação celular (P, N, Mg, etc). Os PHAs apresentam propriedades termoplásticas comparáveis às dos plásticos de origem petroquímica,

sendo possível realizar o seu processamento industrial em equipamentos normalmente utilizados para os plásticos petroquímicos, tais como, moldes, fornos e equipamentos de extrusão. Além disso, os PHAs são extremamente versáteis, podendo apresentar propriedades físico-químicas inovadoras, possibilitando o surgimento de novos materiais no mercado (MADISON e HUISMAN, 1999).

Cerca de 150 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHAs produzidos por bactérias a partir de diversas fontes de carbono (REHM e STEINBÜCHEL, 1999) (Figura 1). Tal diversidade garante um vasto número de possíveis combinações que podem ser empregadas para a obtenção de diferentes polímeros (MADISON e HUISMAN, 1999). Os monômeros constituintes de PHA são classificados em dois grandes grupos: os de cadeia curta PHA*scl* (*short chain length*), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, e aqueles de cadeia média PHA*mcl* (*medium chain length*), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal PHA*mcl* são produzidos por diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* e PHA*scl* (principalmente P3HB) são produzidos por espécies pertencentes aos mais diversos grupos bacterianos (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

Figura 1 - Estrutura dos Polihidroxialcanoatos (PHA).



n varies from 600 to 35000

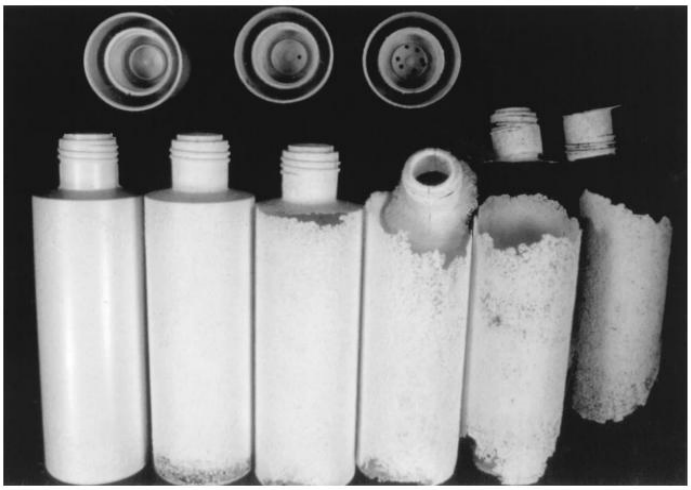
R= hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
R=methyl	Poly(3-Hydroxybutyrate)
R=ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
R=propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
R=pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
R=nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)

FONTE: KHANNA e SRIVASTAVA, 2005.

Do ponto de vista ambiental, a biodegradabilidade pode ser considerada a característica mais importante dos PHAs. A natureza é rica em consórcios microbianos que são capazes de degradar tais polímeros através da secreção de PHA hidrolases e despolimerases. A atividade

dessas enzimas depende principalmente da composição do polímero, quantidade da amostra e condições ambientais, sendo que a velocidade de degradação dos PHAs pode variar entre alguns meses (cultivo em anaerobiose) (Figura 2) até anos (água do mar) (MADISON e HUISMAN, 1999).

Figura 2 - Degradação de P(3HB-3V).



Garrafas compostas de P(3HB-3V) foram incubadas a 20 ^{o}C em anaerobiose. O processo de decomposição foi observado durante 0, 2, 4, 6, 8 e 10 meses (esquerda para direita).

FONTE: MADISON e HUISMAN, 1999.

As aplicações destes biopolímeros não se restringem apenas à utilização como polímero convencional. A biocompatibilidade dos PHAs permite que sejam utilizados em aplicações médicas, como na fabricação de próteses, materiais de sutura, contraste para imagem médica, entre outros. Possuem também aplicações na indústria farmacêutica (carreador de drogas para a liberação controlada) e de alimentos (embalagens ativas) (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; ZINN et al., 2001; GRAGE et al., 2009).

Apesar desta grande possibilidade de aplicações, os PHAs ainda não são expressivos no mercado, em decorrência do seu alto custo de produção, quando comparado com os plásticos convencionais. Para que a utilização de PHAs seja economicamente viável, é necessário dispor-se de uma matéria-prima abundante e de baixo custo, sobre a qual possam ser cultivadas as bactérias produtoras de PHAs. Uma vez que a fonte de carbono representa um importante item nos custos de produção, podendo atingir até 40% do custo total, é evidente o interesse industrial em estratégias visando à diminuição do custo deste recurso (KIM, 2000).

Considerando os impasses econômicos em se produzir PHAs, o presente trabalho tem por objetivo diminuir os custos de produção de PHAs, mais precisamente PHB, utilizando a bactéria *Cupriavidus necator* DSMZ545, o microrganismo tido como referência na produção de PHB.

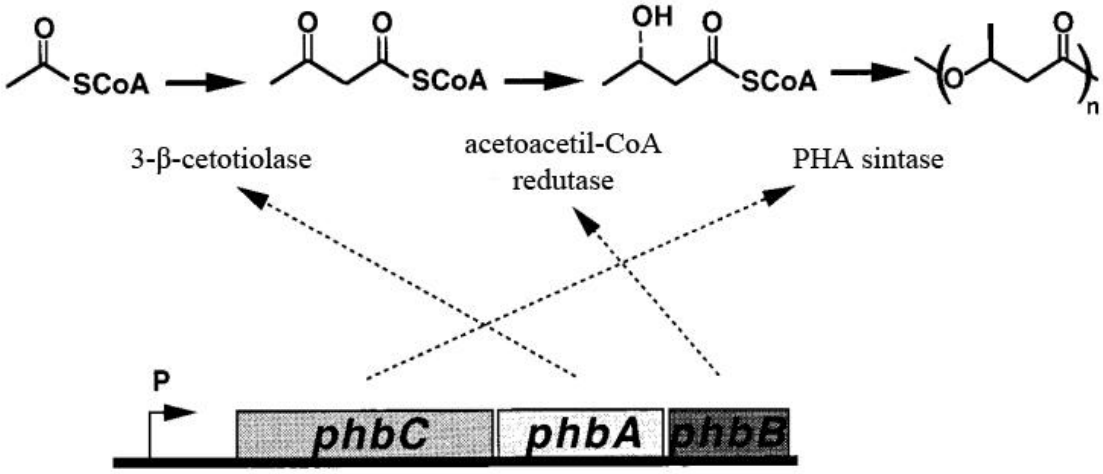
1.3 A bactéria *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator é uma beta-proteobactéria aeróbica, quimiolitoautotrófica facultativa, hidrogênio-oxidativa, que foi inicialmente descrita por Schlegel e Gottschalk em 1965 e teve recentemente o seu genoma sequenciado (POHLMANN et al., 2006). Anteriormente denominada *Hydrogenomonas eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *C. necator* apresenta grande interesse biotecnológico, por ser o melhor microrganismo produtor de PHAs que se conhece até o momento, podendo apresentar até 80% de sua massa seca na forma de PHB, dependendo das condições de cultivo (ANDERSON e DAWES, 1990; MADISON e HUISMAN, 1999).

O PHB é sintetizado em *C. necator* a partir da acetil-CoA, em condições desbalanceadas de excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial, tal como oxigênio, nitrogênio ou fosfato. A limitação de cada um destes nutrientes desencadeia a formação de PHB por diferentes processos metabólicos (DALCATON, 2006).

A síntese de PHB ocorre por uma sequência de 3 reações, que envolvem as enzimas 3-β-cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase. Tais enzimas são codificadas pelo operon *phbC*, composto pelos genes *phbA* (3-β-cetotiolase), *phbB* (acetoacetil-CoA redutase) e *phbC* (PHA sintase) (Figura 3). A enzima 3-β-cetotiolase catalisa o primeiro passo na formação do PHA, condensando, reversivelmente, 2 moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. A enzima acetoacetil-CoA redutase, por sua vez, reduz esse substrato em R-3-hidroxibutiril-CoA, que é incorporado à cadeia de polímero pela ação da PHA sintase. A enzima PHA sintase é a chave principal na biossíntese de PHAs, catalisando a formação de ligações ésteres entre as unidades D(-)3-hidroxiacil-CoAs. Em *C. necator*, esta enzima é capaz de polimerizar 3-hidroxi, 4-hidroxi e 5-hidroxialcanoatos a partir de D isômeros de 4 e 5 carbonos de hidroxiacil-CoA, substratos naturais para a PHA sintase (ANDERSON e DAWES, 1990; STEINBÜCHEL e LUTKE-EVERSLOH, 2003).

Figura 3 - Operon phbCAB de *C. necator*.



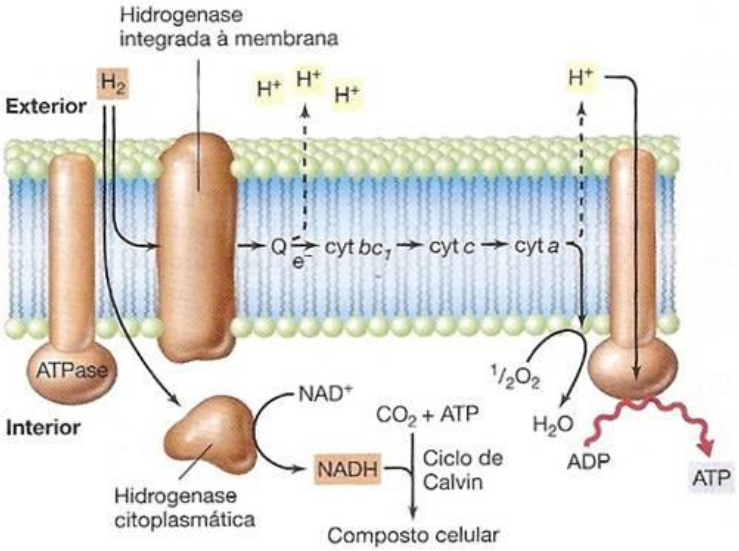
O PHB é sintetizado a partir da ação de 3 enzimas codificadas por este operon; phbA - 3-β-cetotiolase, *phbB* – acetoacetil-CoA redutase, *phbC* – PHA sintase. Um promotor a montante do gene *phbC* dirige a transcrição do operon completo.

FONTE: Modificado de Madison e Huisman (1999).

Por ser um organismo quimiolitoautotrófico facultativo, *C. necator* possui a capacidade de utilizar compostos orgânicos ou inorgânicos como fonte de energia. Esta flexibilidade bioenergética permite que a bactéria alterne entre os modos de crescimento heterotrófico e autotrófico, neste último caso fixando CO_2 através do ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB) (POHLMANN et al., 2006). Tanto as proteobactérias quimiolitoautotróficas aeróbicas quanto as fototróficas anaeróbicas (bactérias púrpuras) utilizam o CBB, sendo a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) a enzima-chave desta via, que também é produzida por *C. necator* (BOWIEN e KUSIAN, 2002).

Em crescimento autotrófico, a energia necessária para a fixação do CO_2 é obtida por meio da oxidação do gás hidrogênio com oxigênio. Para tanto, *C. necator* produz 2 hidrogenases, uma ligada à membrana e outra, solúvel, citoplasmática. A enzima ligada à membrana está envolvida na geração de ATP, enquanto a enzima solúvel capta o H_2, reduzindo diretamente NAD+ a NADH para o Ciclo de Calvin, conforme esquematizado na figura 4 (MADIGAN et al., 2010).

Figura 4 - Bioenergética e função das duas hidrogenases de bactérias aeróbicas quimiolitoautotróficas.



Em *C. necator*, duas hidrogenases estão presentes, a hidrogenase ligada à membrana está relacionada à produção energética, enquanto a hidrogenase citoplasmática produz NADH que será utilizado no Ciclo de Calvin. Pode-se notar que a hidrogenase de membrana começa o transporte de elétrons formando a força próton motiva. cyt: citocromo; Q: quinona.

FONTE: Extraída de Madigan et al., 2010.

1.4 Matérias-primas

Como citado anteriormente, um dos principais problemas da aplicação comercial dos PHAs é o seu alto custo de produção. Estudos sobre a possibilidade de utilização de substratos brutos, de baixo custo, visam produzir PHA de uma maneira mais vantajosa financeiramente. Dentre as matérias-primas empregadas, podemos citar o melaço de cana e beterraba (BEAULIEU et al., 1995), soro de leite (KOLLER et al., 2005), óleos vegetais (FUKUI e DOI, 1998), hidrolisados de amido (RUSENDI e SHEPPARD, 1995), entre outros. Porém, este tipo de matéria-prima geralmente resulta em uma produção baixa do polímero quando comparada a substratos de carbono purificados (KOLLER et al., 2005).

Outra estratégia promissora é o desenvolvimento de cepas recombinantes, que possibilitem melhorar a produção de PHA e/ou diminuir os custos de produção (LEE et al., 1999). Em trabalhos anteriores do nosso laboratório, foram construídas linhagens recombinantes da linhagem de *C. necator* DSMZ 545, com vistas a melhorar a sua capacidade em produzir plástico a partir de diferentes substratos, tais como a sacarose de cana de açúcar e o ácido

propiônico (FAVA, 1997; SARTORI, 1998). Naquela ocasião, esta estratégia apresentava-se interessante. Entretanto, na atual conjuntura econômica, a cana de açúcar passou a ter alta demanda como matéria-prima para biocombustíveis. Assim, hoje seria mais interessante, do ponto de vista da viabilidade econômica do processo, poder utilizar outras matérias-primas para a produção de PHAs e há vários trabalhos neste sentido atualmente em andamento no nosso Depto. Por outro lado, se esta bactéria pudesse ser geneticamente modificada, de modo a não depender de nenhuma matéria prima agrícola para produzir o plástico, seria evidentemente ainda mais vantajoso.

De fato, já foi demonstrado que *C. necator* pode produzir o plástico a partir de CO_2 por meio do seu metabolismo quimiolitoautotrófico. Entretanto, há vários problemas para o cultivo autotrófico desta bactéria, sendo difícil atingir uma alta concentração celular e/ou alta produtividade, uma vez que o substrato necessário para este tipo de cultivo consiste de uma mistura dos 3 gazes, CO_2, H_2 e O_2, numa proporção que se situa na faixa de explosão gasosa e, consequentemente, pode facilmente explodir. Isto implica em que devem ser criadas condições bastante especiais de processo, que envolvem um circuito fechado de cultura (planta de fermentação à prova de explosão) e um controle rigoroso da concentração de O_2, que não pode ultrapassar 6,9%. Por outro lado, é preciso garantir uma fonte de H_2 e, atualmente, espera-se que o H_2 seja suprido a partir do processo de refinação da nafta ou gerado por dissociação elétrica da água por meio da energia de usinas nucleares. Além disto, os melhores resultados só foram obtidos ao empregar-se um sistema de cultura em 2 estágios, sendo o 1º, de crescimento heterotrófico, usando frutose, e o 2º, autotrófico, respeitando a limitação de O_2 (ISHIZAKI et al., 2001).

Visando aproveitar o potencial autotrófico desta bactéria, perguntâmo-nos então, o que seria necessário para torná-la fotoautotrófica. Considerando que ela já é capaz de produzir a enzima RuBisCO, necessária para a entrada do CO_2 no Ciclo de Calvin, aparentemente, o que lhe falta é apenas a capacidade de captar a energia luminosa. Optamos pela bacteriorodopsina para desempenhar este papel.

1.5 Rodopsinas

Opsinas são proteínas integrais de membrana, que, ao se ligarem ao cromóforo retinal (vitamina A aldeído), formam pigmentos capazes de absorver luz, chamados de rodopsinas (BÉJÀ et al., 2000). Atualmente, conhecem-se 4 famílias distintas de rodopsinas:

a) As rodopsinas visuais, encontradas na retina dos olhos de todos os animais são pigmentos fotossensores (BALDWIN et al.,1997)

b) As rodopsinas de *Archaea* funcionam como bombas de prótons controladas pela luz (bacteriorodopsinas), bombas de íons cloreto (halorodopsinas) ou receptores fotossensíveis (rodopsinas sensoriais) (OESTERHELT, 1998)

c) Proteínas com alta similaridade de sequência com as rodopsinas sensoriais de *Archaea* foram encontradas no eucarioto *Neurospora crassa* (BIESZKE et al.,1999 a e b)

d) A rodopsina bacteriana, ou proteorodopsina, foi descoberta num membro não-cultivado das γ-proteobactérias, por meio de análise metagenômica de bacterioplancton marinho (BÉJÀ et al., 2000). Hoje se sabe que a proteorodopsina está amplamente distribuída entre as bactérias marinhas (STEINDLER et al., 2011).

Embora nem todas as famílias de rodopsinas apresentem similaridade de sequência significativa e possam ter origens diferentes (como é o caso das famílias 1 e 2), as rodopsinas de todas as famílias compartilham topologias idênticas, caracterizadas por sete α -hélices transmembrana, que formam uma reentrância na qual o retinal se liga covalentemente, como uma base de Schiff protonada, a uma lisina na sétima hélice transmembrana (hélice G) (BÉJÀ et al., 2000).

1.6 A bacteriorodopsina

Certas espécies de *Archaea* halofílicas são capazes de realizar a síntese de ATP dirigida pela luz. Quando se encontra em condições de limitação de oxigênio, a *Archaea Halobacterium salinarum* e outros halófilos extremos sintetizam e inserem na sua membrana citoplasmática uma proteína chamada bacteriorodopsina (bR), à qual se conjuga uma molécula de retinal, capaz de absorver a energia luminosa e bombear um próton através da membrana. A translocação do próton catalizada pela bR aumenta a força próton-motora, consequentemente levando à síntese de ATP, à medida que os prótons reentram na célula, por meio da ação do complexo H+-ATPase

(STOECKENIUS e ROWEN, 1967; OESTERHELT e STOECKENIUS, 1973; DANON e STOECKENIUS, 1974; BROCK e PETERSEN, 1976; HARTMANN et al., 1980).

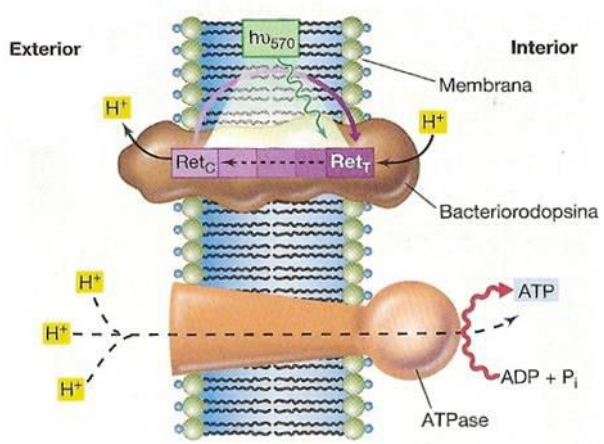
Quando reconstituída em vesículas, a bR bombeia prótons através da membrana da vesícula, criando um gradiente de prótons, que pode ser usado para gerar ATP. Assim, a bR pode servir como um substituto ou um suplemento à fosforilação oxidativa ou à fotossíntese mediada por clorofila, como um mecanismo para gerar energia (RACKER e STOECKENIUS, 1974).

A bacteriorodopsina de *H. salinarum* é codificada pelo gene *bop* de 789 pares de bases (GONZALEZ et al., 2008; CHEN et al., 2008; PFEIFFER et al., 2008; FALB et al., 2008), que já foi clonado em diversos organismos. A bR foi expressa em células eucarióticas, inclusive leveduras (HILDEBRANDT et al., 1993; HOFFMANN et al., 1994; LANG-HINRICHS et al., 1994) e ovócitos de *Xenopus laevis* (NAGEL et al., 1995). Também já foi expressa em *E. coli*, embora a ligação ao retinal não se tenha mostrado eficiente (KARNIK et al., 1990). A bacteriorodopsina (bR) é uma molécula de aproximadamente 27000 Da, altamente resistente a variações de temperatura, pH, concentração iônica, sendo relativamente fácil de ser isolada e purificada (CERCIGNAMI, 1998; HAUPTS et al., 1999; CHEN et al., 2008; FALB et al., 2008).

Estruturalmente, a bR é uma cadeia polipeptídica composta por 248 aminoácidos, sendo organizada em sete α-hélices transmembrana, que envolvem um cofator retinal fotossensível (LONDON e KHORANA, 1982; GOHON, 2008). Esta conformação da bR emite uma coloração avermelhada, por essa razão recebe o nome de “purple membrane” (OESTERHELT, 1998; HAUPTS et al., 1999; GOHON, 2008).

A função da bR é estritamente relacionada ao transporte de H^+, convertendo a energia luminosa em um gradiente de prótons (HAUPTS et al., 1999). Este gradiente pode ser utilizado pela ATPase para a produção de ATP, como esquematizado na figura 5 (HAUPTS et al., 1999; CHEN et al., 2008).

Figura 5 - Modelo de mecanismo para a atividade da bacteriorodopsina.



Luz de 570 nm, converte a forma trans (RetT) protonada da proteína retinal para a forma *cis* (RetC), com a translocação de um próton para a superfície externa da membrana, estabelecendo a força próton motora. A atividade da ATPase, também presente na membrana, é dirigida pela força próton motora.

FONTE: Extraída de MADIGAN et al., 2010.

A bacteriorodopsina absorve a luz visível na região verde do espectro (570 nm). Em seguida à absorção, o retinal da bacteriorodopsina, que normalmente existe numa configuração *all-trans*, torna-se excitado e é convertido à forma *cis*. Esta transformação resulta na translocação de um próton para a superfície externa da membrana. A molécula de retinal então retorna ao seu isômero *all-trans*, mais estável, no escuro, com a tomada de um próton do citoplasma, fechando assim o ciclo. À medida que os prótons se acumulam na superfície externa da membrana, a força próton-motora vai aumentando, até que a membrana fique suficientemente "carregada" para dirigir a síntese de ATP por ação de uma ATPase translocadora de prótons. (MADIGAN et al., 2010).

O ciclo do próton no interior da célula ainda não foi completamente esclarecido, porém, sabe-se que o primeiro passo neste fotociclo é a isomerização do retinal induzida pela luz. O retinal acoplado à proteína bR absorve a luz de comprimento de onda de 570 nm, alterando sua conformação em um curto espaço de tempo (microssegundos), resultando em uma fase intermediária (λmax = 412 nm) desprotonada. Passados alguns milissegundos, o retinal é novamente protonado (λmax = 570 nm), caracterizando a bomba de prótons (SCHÄTZLER et al., 2003; CHEN et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Obter uma linhagem recombinante da bactéria *Cupriavidus necator* DSMZ 545, que tenha adquirido a capacidade de expressar o gene *bop*, que codifica a bacteriorodopsina de *Halobacterium salinarum* R1. Espera-se que, assim, *C. necator*, que já apresenta naturalmente metabolismo quimiolitoautrófico, passe a apresentar características fototróficas, que possibilitem a síntese de PHB por ação da luz.

2.2 Objetivos parciais

- Seleção do promotor mais adequado por meio da transformação de *C. necator* DSMZ 545 com os plasmídeos pLEGFP, pBB-panEGFP, pBBRIMCS e pBBEGFP e análise qualitativa e quantitativa da expressão do gene repórter (proteína verde fluorescente) a partir dos promotores presentes nestes vetores.

- Obtenção da sequência do gene *bop*, por meio de sua amplificação a partir do DNA genômico de *H. salinarum* RI e transferência para o vetor de clonagem comercial pCR®2.1-TOPO®, para obter o novo vetor pTOPO-bop.

- Construção do vetor pBB-panbop por meio da clonagem do gene *bop* do vetor pTOPO-*bop* no vetor pBB-panEGFP.

- Transformação de *C. necator* DSMZ 545 com o plasmídeo pBB-panbop.

- Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos clones recombinantes pBB-panbop.

- Avaliação da produção de PHB pelos clones recombinantes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens utilizadas neste trabalho encontram-se no Banco de Linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

3.1 Microrganismos

Tabela 1 - Microrganismos utilizados no presente trabalho.

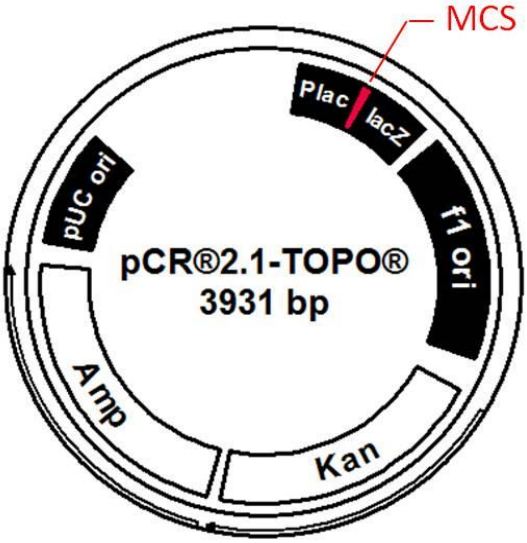
LINHAGENS	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERÊNCIA
Escherichia coli DH5α	*supE*44: Δ *lacU*169 (ϕ80 lacZ ΔM15); *hsdR*17 *recA*1; *endA*1; *gyrA*96; *thi*-1; *relA*1	SAMBROOK e RUSSELL, 2001
Cupriavidus necator DSMZ 545	PHB+, Glc+, Sac-, Fru+	MAKKAR e CASIDA, 1987
Halobacterium salinarum RI DSMZ 668/ ATCC 19700		MOORE e McCARTHY, 1969

FONTE: MAKKAR e CASIDA, 1987; MOORE e McCARTHY, 1969; SAMBROOK e RUSSELL, 2001.

3.2 Plasmídeos

Todos os plasmídeos utilizados no presente trabalho encontram-se na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

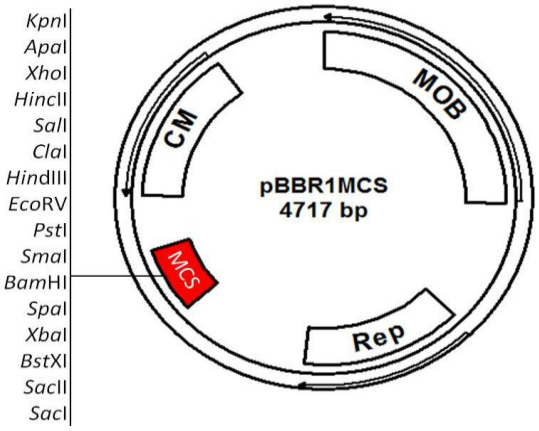
Figura 6 - Representação esquemática do plasmídeo pCR®2.1-TOPO® .



Plasmídeo comercial utilizado como vertor de clonagem. Kan: gene de resistência a canamicina; Amp: gene de resistência a ampicilina; PUC ori: origem de replicação; P*lac*: promotor do operon *lac* de *E. coli*; lacZα: gene repórter; f1 ori: origem de replicação para fagos; MCS: Múltiplo sitio de clonagem.

FONTE: Modificado de INVITROGEN® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

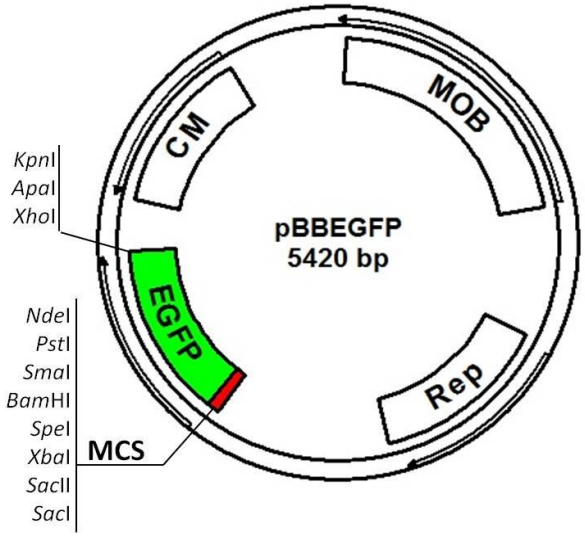
Figura 7 - Representação esquemática do plasmídeo pBBR1MCS.



CM: gene de resistência a cloranfenicol; REP: Origem de replicação; MOB: elemento de mobilização; MCS: Múltiplo sítio de clonagem.

FONTE: KOVACH et al., 1994.

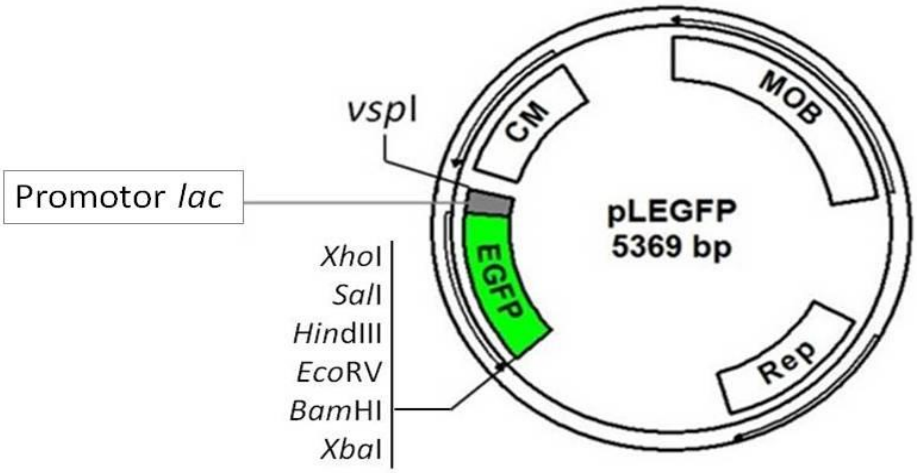
Figura 8 - Representação esquemática do plasmídeo pBBEGFP.



CM: gene de resistência a cloranfenicol; REP: Origem de replicação; MOB: elemento de mobilização; MCS: Múltiplo sítio de clonagem; EGFP: gene da proteína verde fluorescente sem promotor.

FONTE: QUADROS, 2007.

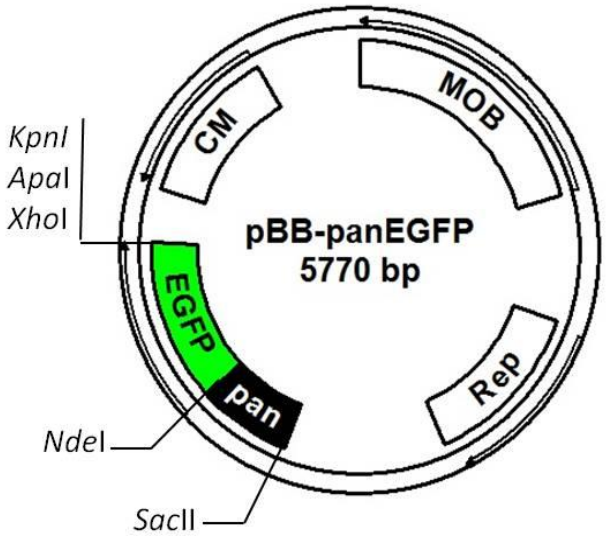
Figura 9 - Representação esquemática do plasmídeo pLEGFP.



CM: gene de resistência a cloranfenicol; REP: Origem de replicação; MOB: elementos de mobilização; P*lac*: promotor do operon *lac* de *E. coli*; EGFP: gene da proteína verde fluorescente.

FONTE: QUADROS, 2007.

Figura 10 - Representação esquemática do plasmídeo pBB-panEGFP.



CM: gene de resistência a cloranfenicol; MOB: região de mobilização; REP: origem de replicação; EGFP: gene da proteína verde fluorescente; *pan*: promotor derivado do gene *mrg*A de *B. subtilis*

FONTE: RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010.

3.3 Meios de cultura

3.3.1 Meios de cultura para o cultivo de bactérias

As bactérias foram semeadas em meio completo Luria Bertani (LB) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). O preparo dos meios sólidos foi realizado através da adição de 2% de ágar aos meios líquidos. Quando necessário, adicionaram-se os seguintes antibióticos aos meios de cultura: cloranfenicol e ampicilina, à concentração final de 25 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Os nutrientes empregados no preparo dos meios de cultura foram de procedência do fabricante Difco® (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA). Após o preparo, todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120 Kgf/cm^2 por 15 minutos.

- **Meio completo (Luria Bertani) – LB**

Triptona 1%
NaCl 1%
Extrato de levedura 0,5%
Agar Bacto 2% (sólido)

- **Meio de recuperação – SOC (eletroporação)**

Triptona 2%
Extrato de levedura 0,5%
Cloreto de Magnésio 10 mM
Sulfato de Magnésio 10 mM
Glicose 20 mM

3.3.2 Meio de cultura para o cultivo de *H. salinarum* RI

- ***Halobacterium* Medium (HM)**

Casamino ácidos 7,50 g
Extrato de levedura 10 g
Na3-citrato 3 g
KCl 2 g
$MgSO_4$ x 7H2O 20 g
$FeSO_4$ x 7H2O 0,05 g
$MnSO_4$ x H2O 0,20 mg
NaCl 250 g
Agar 20 g
Água Destilada 1000 mL

Ajustar pH para 7,4. Adicionar o ágar após a dissolução de todos os reagentes em água e após ter ajustado o pH.

3.3.3 Meio de cultura para o acúmulo de PHA por *C. necator*

- **Meio Mineral (RAMSAY et al., 1990)**

Na_2HPO_4 3,5 g/L

KH_2PO_4 1,5 g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 1 g/L

Solução elementos traços 1 mL para 1 litro

Solução de citrato de ferro amoniacal 6% 1mL para 1 litro

Solução de $MgSO_4$ 20% x $7H_2O$

Solução de $CaCl_2$ x $2H_2O$ 1% 1 mL para 1 litro

Glicose 10 g/L

3.4 Condições de cultivo

Os microrganismos utilizados no presente trabalho, quando semeados em placas de petri, foram mantidos em estufa: as células de *E. coli* e *H. salinarum* foram incubadas a 37 °C, enquanto *C. necator* foi incubada a 28 °C. Quando crescidos em meio líquido, os microrganismos foram incubados em agitador a 150 rpm, utilizando as temperaturas citadas anteriormente.

3.5 Reagentes e Soluções

3.5.1 Soluções para extração e purificação de DNA

- **Solução I**

Tris-HCl 25 mM pH 8,0

EDTA 10 mM

Glicose 50 mM

- **Solução II**

Hidróxido de sódio 0,2 M

SDS 1%

- **Solução III**

Acetato de sódio 3 M

Ácido acético 2 M

- **Solução de RNAse A**

Procedência “Sigma” 10 mg/mL em água destilada estéril

- **Solução salina**

NaCl 0,9% em água destilada

- **Solução tampão de eluição (TE)**

Tris-HCl 20 mM pH 8,0

EDTA 20 mM

- **Clorofórmio:isoamílico (clorofil)**

Clorofórmio 24 partes

Álcool isoamílico 1 parte

3.5.2 Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose

- **Solução tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 10X**

Tris-HCl 0,89 M

Ácido bórico 0,29 M

EDTA 8 mM pH 8,0

- **Solução tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X**

TBE 10X 50 mL

Água destilada 950 mL

- **Gel de agarose para eletroforese de DNA**

Agarose (Sigma tipo II) 0,8% (p/v)

TBE 0,5X

A agarose foi misturada ao tampão TBE 0,5X e aquecido até dissolução

- **Solução de Brometo de Etídeo (EtBr)**

EtBr 10 mg

Água destilada 1 mL

Solução estoque preparada na concentração de 10 mg/mL em água destilada e utilizada na concentração final de 5µg/mL

- **Solução tampão de amostra para DNA ("Stop Mix")**

Azul de Bromofenol 0,5%

EDTA 100 mM pH 8,0

Glicerol 50%

O tampão de amostra foi preparado 10 vezes (10X) concentrado e utilizado na concentração final de 1X na mistura de DNA.

3.6 Extração e purificação de DNA

3.6.1 Extração e purificação de DNA genômico de *H. salinarum* RI

As células foram incubadas por cerca de 5 dias em 30 mL de meio HM a 37 ºC. Após crescimento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e aproximadamente 0,05 g de células ressuspendidas em 540 µL de TE (Tris-Cl 10mM pH 7,4; EDTA 1mM pH 8,0). Adicionaram-se 25 µL de lisozima (10 mg/mL), 100 µL de SDS 10% e 3 µL de RNase (10 mg/mL). A suspensão foi agitada gentilmente e incubada a 37 ºC por 1 hora. Foram adicionados 3 µL de Proteinase K (100 mg/mL) e incubou-se a 55 ºC por 2 horas. Adicionaram-se 100 µL de NaCl 5M e agitou-se gentilmente. Foram adicionados 100 µL de CTBA/NaCl (10% CTBA/0,7M NaCl), vortexou-se e incubou-se a 65 ºC por 20 minutos. Foram adicionados 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e agitou-se gentilmente por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm e a fase aquosa retirada. Repetiu-se o passo de clorofórmio: ácool isoamílico (24:1), seguido da centrifugação e retirada da fase aquosa. Foram adicionados 700 µL de fenol:clorofórmio (1:1) e agitou-se gentilmente por 10 minutos. A solução foi centrifugada e repetiu-se o passo do fenol:clorofórmio (1:1). Após centrifugação e retirada da

fase aquosa, adicionaram-se 420 µL de isopropanol (6 volumes) e incubou-se a 20 ºC por pelo menos 24 horas. Após incubação, a solução foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 rpm e lavada com etanol 80%. O sedimento foi deixado à temperatura ambiente para secagem e ressuspendido em 20 µL de TE.

3.6.2 Extração e purificação de DNA bacteriano

As extrações de plasmídeos de *E.coli* e *C. necator* foram realizadas segundo metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001).

3.6.3 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep)

Os clones de *E. coli* foram inoculados em 5 mL de meio. As culturas foram incubadas a 37 °C durante a noite (aproximadamente 16 horas) com agitação a 110 rpm. Uma alíquota de 3 mL foi centrifugada em 2 minitubos de 1,5 mL a 4.500 g por 2 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o excesso retirado com uma pipeta de ponteira fina. O sedimento foi ressuspendido em 300 µL de solução I com pipeta. A seguir, foram adicionados 300 µL de solução II, e o tubo mantido em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Por último, adicionaram-se 300 µL de solução III e o tubo foi armazenado por 10 minutos no gelo. Decorrido este tempo, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4 °C a 10.000 g. O sobrenadante foi recuperado e a este foram acrescentados 750 µL de solução clorofórmio/álcool isoamílico (solução 24:1), misturando-se por inversão e centrifugando-se por 2 minutos a 4.500 g, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada e a ela acrescentaram-se 750 µL de álcool isopropílico (isopropanol). A solução foi misturada por inversão e deixada por 30 minutos à temperatura ambiente. Terminado o tempo de incubação, ela foi centrifugada a 10.000 g, por 15 minutos a 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70% a 4 °C e secado a vácuo durante 20 minutos. O resíduo seco (pellet) foi ressuspendido em água m.q. estéril.

3.6.4 Preparação de DNA plasmidial em grande escala (maxi-prep)

Os clones de *E. coli* foram inoculados em 5 mL de meio LB. A cultura foi incubada a 37 ºC durante a noite (aproximadamente 16 horas) com agitação de 110 rpm. No dia seguinte, 5 mL desta pré-cultura foram inoculados em 200 mL de LB e a nova cultura foi incubada a 37 ºC durante 24 horas sob agitação a 110 rpm. Terminado o tempo de incubação, as culturas foram transferidas para tubos de microcentrífuga com capacidade para 500 mL, centrifugadas a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4 ºC, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 4 mL de solução I e armazenada em gelo por 15 minutos. Em seguida, adicionaram-se 8 mL de solução II e o tubo foi mantido em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados 6 mL de solução III e o tubo foi armazenado em gelo durante 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 8.500 g durante 15 minutos a 4 ºC, o sobrenadante foi recuperado e o sedimento descartado. Ao sobrenadante foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol, a solução foi misturada por inversão e mantida durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 8.000 g durante 15 minutos a 4 ºC, sendo o sobrenadante descartado e o pellet dissolvido em 2 mL de água m.q. Alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos eppendorf, aos quais foram adicionados 10 µL de RNAse, sendo os tubos incubados em banho-maria a 37 ºC durante 30 minutos. Logo após foram adicionados 500 µL de fenol tamponado, a solução foi homogeneizada por inversão, centrifugada a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4 ºC e a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo. A ele adicionaram-se 500 µL de clorofórmio:isoamílico (24:1), homogeneizou-se por inversão e em seguida a solução foi centrifugada a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4 ºC, sendo a fase superior recuperada. A precipitação do DNA foi realizada através da adição de acetato de amônio 4M (10% do volume) e etanol absoluto gelado (2X volume) a solução foi estocada a -20 ºC durante 1 hora. Terminado o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 ºC, sendo o sobrenadante descartado, o pellet lavado com etanol 70%, secado a vácuo e ressuspendido em água m.q.

3.7 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose

Seguindo-se o procedimento de Sambrook e Russell (2001), foram realizadas análises dos perfis de migração dos fragmentos de DNA em géis de agarose submetidos a eletroforese a fim de verificar a sua pureza ou tamanho. Foram empregados géis de agarose "Sigma" 0,8% em tampão TBE 0,5X e 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. Para a fotodocumentação dos géis, foi utilizado o aparelho "Eagle Eye II" da "Stratagene". Para comparação da concentração e tamanho dos fragmentos (bandas) de DNA obtidos após a digestão com enzimas de restrição, foram utilizados os marcadores Gene Ruller 1 Kb DNA Ladder, Lambda DNA 100 ng/µL Fermentas® (Fermentas, Burlington,ON, Canada) e 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

3.8 Tratamento do DNA plasmidial com enzimas de restrição

Foram preparadas misturas de digestão com volume final entre 10 a 15 µL, sempre empregando o tampão de reação apropriado e as condições de incubação recomendadas pelo fabricante. A quantidade de DNA utilizada na digestão variou de acordo com o experimento. Foram utilizadas entre 1 a 2 U de enzima para cada µg de DNA. Os tempos de incubação variaram de 2 a 5 horas e, ocasionalmente, durante a noite. As enzimas de restrição e outras enzimas especiais empregadas na manipulação de DNA foram adquiridas dos fabricantes: Fermentas®, Invitrogen®, New England BioLabs® (NEB, Ipswich, MA, Canada) Promega® (Promega, Madison, WI, USA). Todas as enzimas foram utilizadas com seus tampões específicos e de acordo com os protocolos enviados pelos respectivos fabricantes.

3.9 Purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose

Após separação por eletroforese em gel de agarose, o fragmento de DNA presente na banda correspondente ao perfil de migração desejado foi recortado, com o cuidado de remover-se a menor quantidade possível de gel. O fragmento de gel foi transferido para um tubo de microcentrífuga. A partir desta etapa, utilizaram-se duas metodologias distintas:

a) GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit. Empregou-se o protocolo enviado pelo fabricante GE Healthcare® (GEHC, Waukesha, WI, USA).

b) Centrifugação por lã de vidro e posterior precipitação com sal (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

3.10 Ligação entre fragmentos de DNA

Para a etapa de ligação, utilizou-se o sistema de ligação vetor/inserto, variando a proporção de acordo com as concentrações de DNA. O sistema de ligação empregado foi o seguinte: DNAs a serem ligados (vetor+inserto), 10% do volume final de tampão de ligase 10X, 0,5-1µL de enzima DNA ligase de fago T4, 1 µL de PEG 50% 4000 (blunt end) e água bidestilada estéril para completar o volume desejado. O protocolo utilizado foi aquele fornecido pelo fabricante (Fermentas®).

3.11 Transformação genética das bactérias

Empregou-se o protocolo de transformação por eletroporação descrito por Sambrook e Russell (2001). As misturas de transformação foram semeadas em meio sólido LB contendo o antibiótico adequado.

- **Preparação de células eletrocompetentes de *E.coli* DH5α**

500 mL de LB foram inoculados com 5 mL de cultura de *E.coli* DH5α previamente crescida por 16 horas, e a nova cultura incubada a 37 ºC, com agitação de 110 rpm, até apresentar uma absorbância a 600nm (A_b600) entre 0,4 a 0,5. A seguir, as células foram incubadas em gelo durante 15 minutos. A cultura foi centrifugada a 6.000 rpm durante 15 minutos a 4 ºC, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em 500 mL de água m.q. estéril e gelada. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido em 250 mL de água m.q. estéril e gelada, centrifugado novamente e o sedimento ressuspendido em 50 mL de glicerol 10% gelado. Realizou-se novamente mais uma centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente e, por fim, o

sedimento foi ressuspendido em 1 mL de glicerol 10% gelado, distribuído em alíquotas de 40 µL em tubos eppendorf, os quais foram rapidamente estocados a -70 ºC.

- **Preparação de células eletrocompetentes de *C. necator* DSMZ545**

O protocolo para preparação de células eletrocompetentes de *C. necator* foi adaptado a partir de Taghavi et al. (1994). Células de *C. necator* DSMZ545 foram cultivadas por 16 horas, a 28 ºC e 180 rpm em 5 mL de SOB (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, 10 ml KCl 250mM). Em seguida, essa cultura foi vertida em 500 mL de meio SOB e cultivada a 28 ºC sob agitação (180 rpm) até uma DO_{600nm} de 0,8. As células foram coletadas e lavadas duas vezes com água gelada m.q. contendo 10% (v/v) de glicerol. Em seguida, as células foram concentradas em 1 mL de glicerol a 10% (v/v), aliquotadas em 40 µL e estocadas a -70 ºC.

- **Transformação por eletroporação**

Para cada transformação, uma alíquota de 40 µL de células competentes foi descongelada, incubando-se em gelo por aproximadamente 1 hora. A estes tubos, foram adicionados de 2 a 4 µL da mistura de ligação previamente realizada. Esta mistura (célula + ligação) foi posteriormente transferida para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm) previamente esterilizada em luz ultravioleta a 4 ºC. O pulso elétrico foi aplicado com o aparelho de eletroporação do “Gene Pulser Transfection Apparatus” calibrado para 2,5V, 25 µF de capacitância, a constante de tempo foi de 4 a 5 mseg. Após a aplicação do pulso elétrico, as células foram imediatamente suspendidas em 1 mL de meio SOC, transferidas para um tubo de ensaio, e incubadas durante 1 hora, a 37 ºC, com agitação de 100 rpm. Terminado o tempo de incubação, as células foram semeadas em placas de petri contendo meio LB contendo o antibiótico adequado.

3.12 Caracterização do perfil protéico através de SDS-PAGE

A caracterização do perfil protéico das células foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em sistema descontínuo, a partir do protocolo descrito por Studier (1973) com alterações.

As linhagens de *C. necator* DSMZ 545 foram cultivadas em 5 ml de LB a 28 ºC, 180 rpm até DO_{600nm} de 1,0 e em seguida centrifugadas a 1000 g, 4 ºC por 10 minutos. O sedimento de cada amostra foi diluído em tampão de amostra (240 mM TRIS pH 6.8, 0.8% SDS, 200 mM 2-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,02% azul de bromofenol) e fervido por 7 minutos a 100 ºC, para desnaturação das proteínas. As soluções utilizadas na preparação do gel de poliacrilamida foram:

a) Solução A: 30% de acrilamida (p/v) e 0,5% de bisacrilamida (p/v) em água destilada. Armazenada a 4 ºC em frasco âmbar.

b) Solução B: Tris-HCl 1,5M pH8,8.

c) Solução C: 28,5% de acrilamida (p/v) e 1,5% de bisacrilamida (p/v) em água destilada, armazenada a 4 ºC em frasco âmbar.

d) Solução D: Tris-HCl 0,5M pH 6,8.

O gel de separação (12,5%) foi preparado com 3,12 mL de solução A, 2,0 mL de solução B, 2,28 mL de H_2O, 74 µL persulfato de amônio 10% (PSA) e 5 µL de TEMED e o gel de empilhamento com 0,58 mL de solução C, 0,44 mL de solução D, 2,28 mL de H_2O, 34 µL PSA 10% e 5 µL de TEMED.

A eletroforese foi realizada a 120 mA até que as proteínas atingissem o final do gel de separação. Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em corante para proteínas por 1 hora (1 mg/mL de Comassie Blue em etanol, 10% de ácido acético) e em seguida descorado em H_2O fervente.

3.13 Separação das frações de membrana

A separação de membranas foi realizada conforme Veiga et al. (1999) com modificações. As linhagens de *C. necator* DSMZ 545 foram cultivadas em LB até DO_{600nm} igual 1,0. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 g por 5 minutos e o sedimento ressuspendido em 5 mL

de tampão fosfato de sódio pH 6,8 (NaH_2PO_4 x H_2O) e lisadas por sonicação utilizando 6 pulsos de 30 segundos. Células não rompidas foram removidas por centrifugação a 5000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi centrifugado por 1 hora, 30.000 rpm, 4 ºC para recuperar a fração de proteínas de membrana. Esse sobrenadante foi considerado a fração solúvel. O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de tampão fosfato de sódio contendo 1,5% de Triton X-100 e incubado por 30 minutos a 4 ºC. A solução foi centrifugada por 30 minutos em 55.000 rpm, 4 ºC e o sobrenadante foi considerado a fração de membrana interna e o sedimento a fração de membrana externa. 50 µL de tampão de amostra foi adicionado nas diferentes frações e fervidas por 7 minutos a 100 ºC, para a desnaturação das proteínas e em seguida submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.14 Reação de Polimerização em Cadeia do DNA – PCR

3.14.1 Amplificação por PCR do gene *bop* a partir do genoma de *H. salinarum* RI

A fim de possibilitar a clonagem do gene *bop* no vetor pBB-panEGFP, desenharam-se oligonucleotídeos iniciadores flanqueados por sítios compatíveis com as enzimas de restrição do sítio a jusante do promotor *pan*. Como era de extrema importância manter o códon de iniciação da tradução ATG para garantir a futura expressão do gene de interesse (Figura 11), adicionou-se a sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Nde*I, que contém o iniciador ATG, e, na outra extremidade, a sequência de *Xho*I, também compatível com o vetor de interesse:

Figura 11 - Representação esquemática dos sítios de reconhecimento das enzimas *NdeI* e *XhoI.*.

Em destaque o códon de iniciação ATG necessário para expressão do gene *bop*.

FONTE: MARQUEZONI, 2011

Os seguintes iniciadores (“primers”) foram sintetizados pelo fabricante Invitrogen:

5’CATATGTTGGAGTTATTGCCAAC3’*Forward* (FWD)
3’CTCGAGTCAGTCGCTGGTCGC5’ *Reverse* (REV)

Como molde para a reação de PCR, utilizou-se o DNA genômico de *H. salinarum* RI.

- Reação de PCR

Tabela 2 - Reação para amplificação do gene *bop*.

COMPONENTES	VOLUME (µL)
Água Mili-Q	86,9
Buffer 10x	12
MgCl2	3,6
dNTP	12
Primer FWD	2
Primer VER	2
Molde	0,5
Enzima	1

Kit Taq DNA polymerase Invitrogen®.

FONTE: MARQUEZONI, 2011

- Programa utilizado

Tabela 3 - Programa para amplificação do gene *bop* por PCR.

ETAPA	TEMPERATURA (^{o}C)	TEMPO
1) Desnaturação	94	3’
2) Desnaturação	94	1’
3) Annealing	58,1	30’’
4) Extensão	72	30’’
5) Repetir ciclo 2 por 30x	-	-
6) Extensão	72	10’
7) Condicionar	4	∞

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

3.14.2 Oligonucleotídeos empregados em reações de PCR

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho.

NOME	**FINALIDADE**	**SEQUÊNCIA 5’ – 3’**	***AMPLICON***
FWD *bop* CN	Amplificação do gene *bop* a partir do genoma de *Halobacterium salinarum* RI	CATATGTTGGAGTTATTGCCAAC	789pb
REV *bop* CN		CTCGAGTCAGTCGCTGGTCGC	
M13 Forward	Primers M13 presentes no kit TOPO TA Cloning®	GTAAAACGACGGCCAG	186pb
M13 Reverse		CAGGAAACAGCTATGAC	
seqbop01	Primers utilizados para o sequenciamento do vetor final pBB-panbop.	CTTGGTCTGCGTGGGGAGTCTAT	418b FWD
seqbop02		GGTACGCGTACTGGCTGTTCAC	512b FWD

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

3.15 Análise de *codon usage*

Para as análises de uso preferencial de códons, empregou-se o software JCAT®. Esse programa está disponível na internet e seu algoritmo de funcionamento foi descrito por Grote et al. (2005).

3.16 Quantificação da expressão da proteína verde fluorescente por citometria de fluxo

Os plasmídeos pBBR1MCS, pBBEGFP, pLEGFP e pBB-panEGFP foram utilizados para transformar células de *C. necator* DSMZ545 por eletroporação. Foram utilizados 100 ng de cada plasmídeo por reação de eletroporação.

A expressão da EGFP sob o controle de cada região promotora foi primeiramente observada em lâmina em microscópio de epifluorescência Leica DMLB e, posteriormente, quantificada em citômetro de fluxo (Citômetro Guava EasyCyte Plus System – GE®) em células recombinantes de *C. necator* na fase exponencial de crescimento (DO_{600} = 1,2) na presença ou ausência de íons de metais. As células de *C. necator* selvagem e recombinante pBBR1MCS e pBBEGFP foram utilizadas como controle do experimento.

Células de *C. necator* carregando as construções pBB-panEGFP foram cultivadas em meio LB até DO=1,2 e em seguida foram adicionados íons de Fe^{2+} e Mn^{2+} (100µM cada) e incubadas por 3 h a 28ºC e 180 rpm.

Células de *C. necator* portadoras do vetor pLEGFP foram cultivadas em meio LB contendo 1% de glicose ou 0,08 mg/mL.

A leitura da fluorescência da EGFP foi realizada com feixe de laser em 489 nm de comprimento de onda e a leitura da emissão foi realizada a 509 nm. A quantificação foi estimada pela intensidade média de fluorescência por célula em cada linhagem.

3.17 Avaliação da linhagem selvagem e recombinante em cultivo suplementado com glicose

Um pré inoculo de 50 mL de *C. necator* DSM545 *e C. necator* recombinante em meio mineral Ramsay suplementado com glicose 2% foi cultivado a 28 ^{o}C, 180 rpm até D.O. 600nm = 0,8. Um volume de 5 mL desta cultura foi utilizado para inocular 500 mL de meio mineral Ramsay glicose 2% e cultivado a 28 ^{o}C, 180 rpm por 72 horas. As linhagens recombinantes foram cultivadas com um acréscimo de cloranfenicol 12,5 μg/mL. O monitoramento e análises seguem citados no texto.

Os cultivos em presença de luz e cofator retinal foram baseados no trabalho de Martinez et al. (2007). A fonte luminosa foi provida por 2 holofotes contendo 1 lâmpada halógena de 160 Watts cada. O *all-trans*-retinal foi ressuspendido em etanol 70% para uma concentração estoque de 2 mM e utilizado em uma concentração final de 10 μM.

3.17.1 Crescimento Celular – Densidade Óptica (D.O)

Uma amostra de 1 mL da cultura foi retirada e medida em espectofotômetro (Micronal B583) nos períodos de início do ensaio, 24, 48 e 72 horas.

3.17.2 Crescimento Celular – Unidade Formadora de Colônias (U.F.C)

Para a avaliação do crescimento celular por unidade formadora de colônias, coletaram-se nos tempos de início, 24, 48 e 72 horas duas, alíquotas de 1 mL da cultura para realização do experimento em duplicata. Empregou-se uma diluição seriada utilizando o fator de 10x até alcançar uma concentração de 10^6 células por alíquota retirada. A diluição final foi semeada em meio mineral Ramsay sólido (Agar 2%) e as placas incubadas em estufa a 28 ^{o}C por 24 horas. As placas que apresentaram crescimento tiveram suas colônias contadas e a média de ambas as placas foi utilizada para confeccionar os gráficos.

3.17.3 Consumo de Fonte de Carbono

O consumo da glicose pelas linhagens de *C. necator*, ao longo do crescimento em meio mineral Ramsay suplementado com glicose 2% foi medido através de análise espectrofotométrica a cada 24 horas de cultivo, desde o início da cultura, totalizando 96 horas.

A quantificação da Glicose foi feita através do uso do "Kit comercial Glicose Oxidase Peroxidase" BioSystems® (BioSystems S.A.– Reagents & Instruments, Barcelona, Espanha). Para tal, seguimos as instruções do fabricante, utilizando alíquotas, diluídas 10 e 100 vezes, paras as dosagens em espectrofotômetro ("Espectrofotômetro digital", Modelo 22 , "New Química"), λ_{505nm}. Todas as medições foram feitas em duplicatas.

3.17.4 Massa Seca Celular

Para a análise da massa seca, coletaram-se nos intervalos de tempo, 24, 48, 72 e 96 horas, alíquotas de 1 mL das culturas. Esta alíquota de 1mL foi filtrada a vácuo, com membranas previamente pesadas. As membranas foram secas em forno microondas por 18 minutos, potência 135W, em seguida transferidas para dessecador por 10 minutos e depois pesadas em balança analítica (Souza, 2003).

Foi utilizada a seguinte equação para determinação da massa seca:

$$\mathbf{MS = MMC - MM\ (1 - u\% / 100) \times 1000/ vol}$$

Onde:

MS: massa seca

MMC: massa da membrana com células após secagem (g)

MM: massa da membrana (g)

Vol: volume da suspensão da amostra

u: umidade da membrana (%)

3.17.5 Cromatografia Gasosa

A quantidade e composição de PHA foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS e MAI, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2–dicloretano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados fortemente, agitados e submetidos à propanólise por 3 horas a 100 ºC, com agitação após os primeiros 30 minutos. Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada, agitando-os vigorosamente por 30 segundos. Após separação, a fase aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) utilizada para análise. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra ("split" 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890 Series GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metilsiloxano, comprimento 30 m, diâmentro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) (Agilent Technologies). A análise foi conduzida nas seguintes condições: Gás de arraste: Hélio (0,8 mL/min); Temperatura do injetor: 250 ºC; Temperatura do detector: 300 ºC; Sistema de detecção: ionização de chama (FID); Programa de temperaturas do forno: 100 ºC por 1 minuto, elevação da temperatura até 210 ºC a 8 ºC/min e 210 ºC por 15 minutos. Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxibutirato), 3HV (3-Hidroxivalerato), 3HHx (3-Hidroxihexanoato), 3HHp (3-Hidroxiheptanoato), 3HO (3-Hidroxioctanoato), 3HN (3-Hidroxinonanoato), 3HD (3-Hidroxidecanoato) e 3HDD (3-Hidroxidodecanoato).

3.18 Curva de Crescimento em Ausência de Fonte de Carbono

A curva de crescimento em ausência de fonte de carbono foi realizada em meio mineral Ramsay. Os pré inoculos de *C. necator* selvagem e recombinante foram cultivados a 28 ^{o}C, 180 rpm em meio LB até D.O. de 0,8. Um segundo pré inóculo foi realizado em meio mineral Ramsay suplementado com glicose 2% cultivado a 28 ^{o}C, 180 rpm por 24 horas. O segundo

cultivo foi utilizado para inocular (1:100) 4 erlenmayers contendo 250 mL de meio mineral Ramsay sendo 2 inoculados com o pré inóculo de *C. necator* selvagem e 2 com a linhagem recombinante. Dos 4 frascos finais, 2 foram incubados a 28 ^{o}C, 180 rpm em presença de luz e 2 em ausência total de luz. Alíquotas foram retiradas em 4 horas durante 48 horas, após este período alíquotas foram retiradas em 6 horas. As linhagens recombinantes foram cultivadas com um acréscimo de cloranfenicol 12,5 μg/mL.

3.19 Cultivo das Células em Microaeforilia e Luz Solar

O experimento foi baseado no trabalho de Walter et al., (2006). O pré-inóculo de *C. necator* selvagem e recombinante foi cultivado em meio mineral Ramsay glicose 2% até D.O. 0,8. Este cultivo prévio foi utilizado para inocular microplacas contendo 20 mL de meio mineral sem qualquer fonte de carbono em um fator de 1:10. O ensaio foi separado em grupos, sendo que a primeira parte das microplacas foi exposta a luz solar (11:00 horas) e suplementadas com Azida Sódica a 30 mM e *all-trans*-retinal 10 μM e as placas restantes em ausência de luz (cobertas com papel alumínio) e dos reagentes. À linhagem recombinante foi adicionado cloranfenicol 12,5 μg/mL. Os pontos foram retirados em um período de tempo de 30 minutos, totalizando 2 horas de tempo total do experimento

3.20 Cultivo das Células em Biorreator

O pré-inóculo de *C. necator* selvagem e recombinante foi cultivado em meio mineral Ramsay até D.O. de 0,8. Após o crescimento, este cultivo inicial foi utilizado para inocular os biorreatores que compõem o ensaio e os frascos controle.

Os frascos controle continham 100 mL de meio mineral Ramsay, um primeiro grupo sem suplementação com qualquer fonte de carbono e um segundo contendo glicose 2%. Os frascos foram incubados a 28 ^{o}C, 180 rpm por 100 horas e as medidas foram realizadas com o auxílio do espectrofotômetro a cada 24 horas.

Os biorreatores foram desenvolvidos com o objetivo de suplementar os cultivos com CO_2 e microaerofilia. A parte superior dos frascos possui 3 conectores responsáveis pela retirada da amostra a ser analisada, entrada de CO_2 e suspiro. A iluminação foi provida por 2 holofotes contendo 1 lâmpada halógena de 160 Watts cada. O all-trans-retinal foi ressuspendido em etanol

70% para uma concentração estoque de 2 mM e utilizado em uma concentração final de 10 μM. O culivo foi realizado utilizando 600 mL de meio mineral Ramsay por biorreator, temperatura controlada em banho maria 28 ^{o}C e vazão de CO_2 mantida em 1L/minuto. O ensaio foi realizado em 120 horas, com retiradas de alíquotas para análise em espectrofotômetro a cada 12 horas.

3.21 Monitoramento de ATP intracelular

O presente ensaio foi baseado no procedimento descrito por Martinez et al., (2007). Os microrganismos de interesse, *C. necator* selvagem e recombinante, foram cultivados em Meio Mineral Ramsay suplementado com glicose 2% até alcançar D.O. de 0,8. O cultivo foi então dividido em grupos, sendo que parte destas amostras foram suplementadas com retinal 20 μM e expostas à luz halógena de 160 Watts, enquanto o grupo controle foi envolto em papel alumínio para ser mantido no escuro.

As medições foram realizadas utilizando o kit comercial para monitoramento de ATP intracelular de microrganismos Intracellular ATP Kit HS® BioThema® (BIOTHEMA, Handen, MS, Suécia), que possui a capacidade de desconsiderar o ATP residente extracelular que possa interferir nos resultados finais. Para realizar o ensaio, seguimos as recomendações do fabricante, realizando as medições no tempo 0 (início da iluminação e adição do retinal), 5, 10 e 15 minutos. As amostras foram analisadas em duplicata e o resultado final apresentado corresponde à média dos resultados da replicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de uso preferencial de códons (*codon usage)*

Desde o sequenciamento dos primeiros genomas bacterianos, observou-se que os múltiplos códons que codificam um mesmo aminoácido não são utilizados na mesma frequência por diferentes organismos. Em outras palavras, cada organismo apresenta um uso preferencial de códons. Os códons considerados ótimos para a tradução são aqueles para os quais existe uma quantidade abundante de tRNA, sendo que a frequência destes códons em um determinado gene está intimamente relacionada com a taxa de expressão do mesmo (HENRY e SHARP, 2007). Conclui-se então, que os códons de um gene são fatores limitantes para a sua expressão, sobretudo, se o produto a ser expresso for codificado um gene heterólogo que apresente códons incompatíveis com o hospedeiro utilizado para expressão (FUGLSANG, 2003; CHECHETKIN, 2006).

Visto que o gene *bop* que foi empregado na clonagem é proveniente de um microrganismo do domínio *Archaea* e o que se deseja é a sua expressão eficiente numa bactéria, a análise de *codon usage* é de extrema importância para o presente trabalho. É importante ressaltar que a bR é uma proteína ancorada na membrana de *H. salinarum* e existem grandes diferenças estruturais entre as membranas de *Archaea* e *Bacteria* (MADIGAN et al., 2010).

Para a análise de preferência de códons, empregou-se o software JCAT® desenvolvido por Grote et al. (2005). O gene *bop* foi analisado com relação ao microrganismo de interesse para o presente trabalho *C. necator*, e também incluímos nesta etapa as bactérias *E. coli* e *Bacillus subtilis*, microrganismos muito bem estudados e considerados como referência para trabalhos de clonagem e expressão heteróloga. Os resultados da análise de preferência de códons estão apresentados na Tabela 4:

Tabela 5 - Taxa de uso preferencial de códons em diferentes microrganismos

BACTÉRIA	TAXA DE ADAPTAÇÃO DE CÓDONS
Escherichia coli	0.276
Bacillus subtilis	0.281
Cupriavidus necator	0.348

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

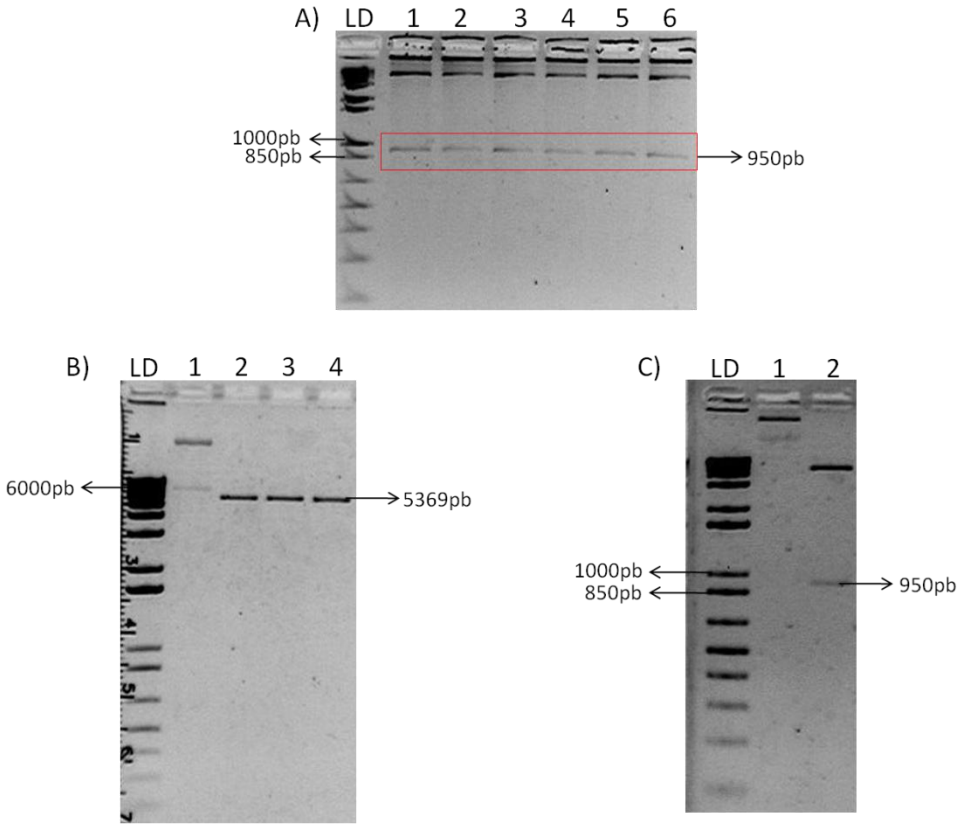
Comparando-se as 3 bactérias analisadas, pode-se observar que *C. necator* possui uma maior taxa de preferência de códons para o gene *bop*, um dado que dá sustentação ao presente trabalho, visto que existem trabalhos já publicados relacionados com a expressão de rodopsinas heterólogas em *E. coli* (KAMO et al., 2006; MARTINEZ et al, 2007).

4.2 Escolha do promotor para expressão da proteína heteróloga

Para a escolha do promotor a ser utilizado na expressão da proteína heteróloga, foram analisados dois plasmídeos previamente construídos em nosso laboratório, o pLEGFP e pBB-panEGFP. Tais plasmídeos foram construídos utilizando os promotores *lac* e *pan*, respectivamente, clonados a montante do gene da proteína EGFP, a fim de controlar a expressão da mesma, e foram hospedados em *E. coli.* Como demonstrado por Biondo (2008), ambos os plasmídeos apresentaram expressão em bactérias gram-negativas, sendo, portanto de interesse para o presente trabalho.

Realizou-se então a extração dos plasmídeos pLEGFP e PBB-panEGFP presentes em *E. coli*, que, a seguir, foram empregados na transformação de *C. necator*. A transformação com o plasmídeo pLEGFP apresentou baixo rendimento, com o crescimento de apenas 6 colônias. Todos os transformantes tiveram os seus plasmídeos extraídos para análise de restrição, empregando-se digestão dupla com as enzimas *Vsp*I e *Sal*I, sendo que todos liberaram um fragmento de 950 pb, correspondendo ao tamanho do promotor *lac* ligado ao gene da EGFP. O clone 1 foi então submetido a digestão simples com as enzimas *Vsp*I, *Sal*I e *Bam*HI e apresentou linearização na altura de 5,4 kb, o tamanho referente ao vetor completo. Por fim, uma nova digestão dupla *Vsp*I/*Sal*I confirmou o sucesso da construção, visto que o vetor liberou novamente o fragmento de 950 pb. As etapas da confirmação do clone de *C. necator* contendo o plasmídeo pLEGFP estão apresentadas na figura 12.

Figura 12 - Etapas de confirmação do clone de *C. necator* hospedando o plasmídeo pLEGFP.

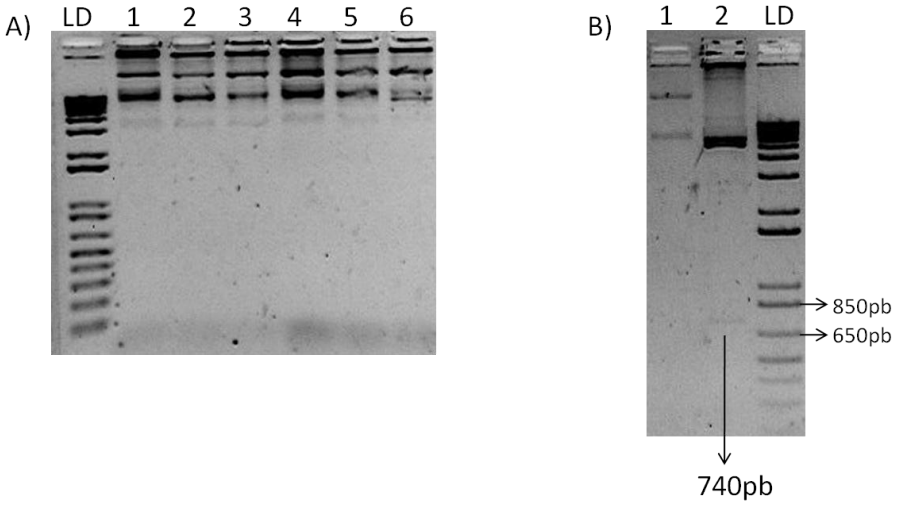


A) DNA plasmidial extraído dos transformantes e submetido a digestão dupla *Vsp*I/*Sal*I; B) Digestões simples do clone número 1, 1 – Vetor intacto, 2 – Digestão *Vsp*I, 3 – Digestão *Sal*I, 4 - Digestão *Bam*HI. C) 1- Vetor não digerido referente ao clone nº 1, 2 - Digestão dupla *Vsp*I/*Sal*I do clone I. LD) Marcador de peso molecular 1kb Plus Invitrogen®.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

A transformação de *C. necator* com o vetor pBB-panEGFP apresentou um ótimo rendimento. Iniciou-se então a análise destes transformantes, extraindo o DNA plasmidial de 6 colônias diferentes. Pôde-se observar por meio de eletroforese, que tais colônias apresentavam padrão semelhante. O plasmídeo do clone número 1 foi submetido a análise de restrição utilizando as enzimas *Xho*I e *Nde*I e foi possível observar a liberação de um fragmento de 740 pb, correspondente ao gene da EGFP, dessa maneira confirmando o sucesso da obtenção do transformante desejado (Figura 13).

Figura 13 - Etapas de confirmação do clone *C. necator* hospedando o plasmídeo pBB-panEGFP.



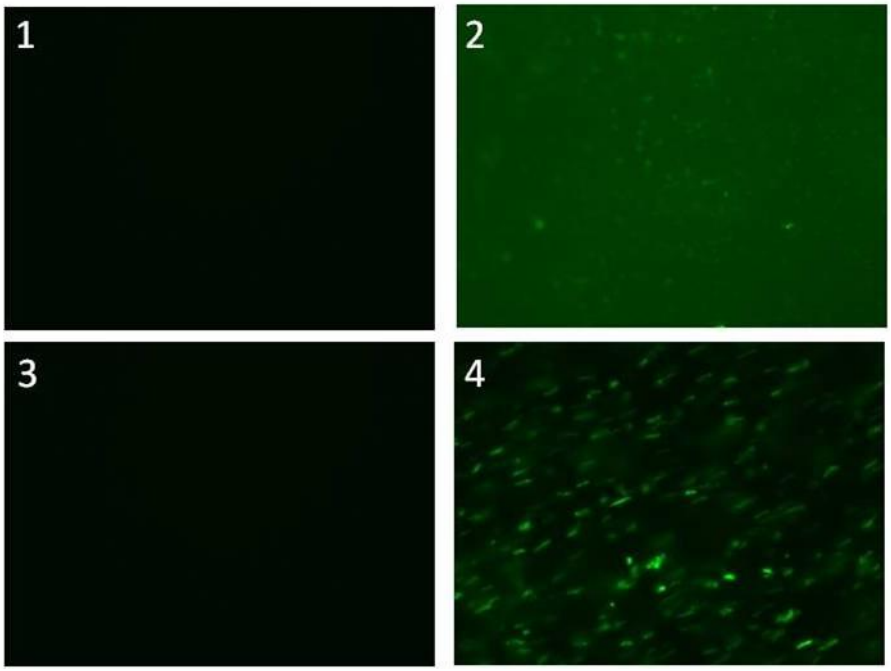
A) DNA plasmidial extraído de 6 transformantes; B) 1 – Vetor não digerido da extração plasmidial do clone 1, 2 - Digestão dupla *Xho*I/*Nde*I do clone número 1. LD) Marcador de peso molecular 1kb Plus Invitrogen®.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

4.3 Análise qualitativa de expressão da EGFP dirigida pelos promotores *lac* e *pan*

A análise de expressão foi realizada após a obtenção das linhagens recombinantes de *C. necator* portando os plasmídeos pLEGFP e pBB-panEGFP. Células, tanto de *E.coli* (Figura 14), quanto de *C. necator* (Figura 15) hospedando esses vetores, foram analisadas por observação em microscópio de epifluorescência.

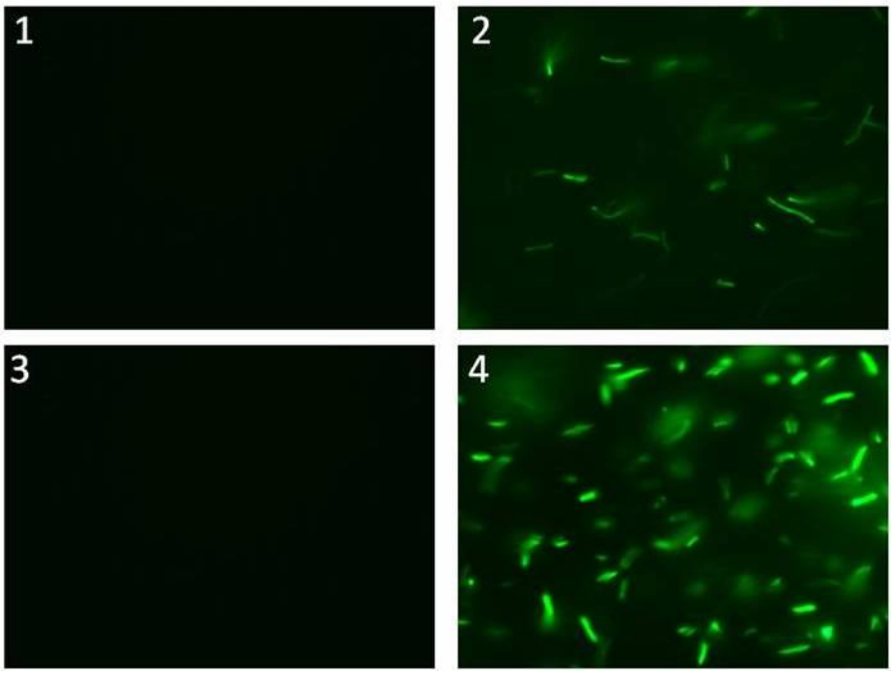
Figura 14 - Visualização de células de *E. coli* selvagem e recombinante em microscópio de epifluorescência com aumento de 1000 vezes.



1: *E. coli* selvagem; 2: *E. coli* recombinante pLEGFP (Induzida com IPTG); 3: *E. coli* selvagem; 4: *E. coli* recombinante pBB-panEGFP.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Figura 15 - Visualização de células de *C. necator* selvagem e recombinante em microscópio de epifluorescência com aumento de 1000 vezes.



1: *C. necator* selvagem; 2: *C. necator* recombinante pLEGFP (Induzida com IPTG); 3: *C. necator* selvagem; 4: *C. necator* recombinante pBB-panEGFP.

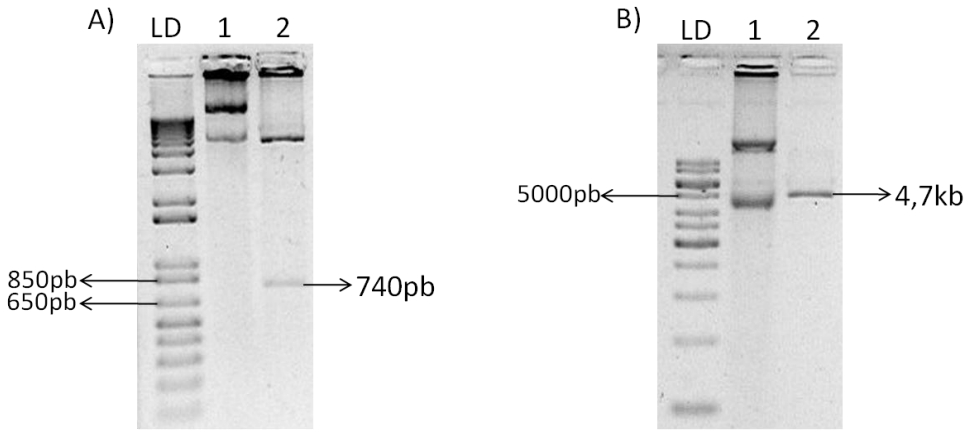
FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Pode-se observar nas fotografias que ambos os microrganismos recombinantes apresentaram expressão da proteína verde fluorescente, no entanto, o plasmídeo pBB-panEGFP proporcionou uma melhor expressão em ambos os microrganismos. O próximo passo consistiu em definir quantitativamente a diferença de expressão entre os promotores *lac* e *pan* em *C. necator*, empregando-se a citometria de fluxo.

4.4 Quantificação da expressão da proteína EGFP através da citometria de fluxo

No intuito de quantificar a expressão promovida pelos promotores *lac* e *pan*, os plasmídeos pBBRIMCS e pBBEGFP, que antecederam a construção do pLEGFP e pBB-panEGFP, foram empregados na transformação de *C. necator*. Esta etapa foi indispensável para definir se os demais genes que compunham os plasmídeos não tinham influência sobre a expressão da EGFP, sendo o promotor em análise o único responsável pelo controle da mesma. A Figura 16 demonstra o sucesso na obtenção dos clones recombinantes de *C. necator* com os plasmídeos pBBRIMCS e pBBEGFP. O DNA plasmidial extraído do clone hospedando o vetor pBBRIMCS foi submetido a digestão simples com a enzima *Xho*I, linearizando na altura esperada de 4,7kb. Para a confirmação do clone pBBEGFP, analisamos o mesmo através da digestão dupla *Xho*I e *Nde*I, que liberou um fragmento de 740 pb, correspondente ao gene da EGFP.

Figura 16 – Perfis eletroforéticos dos plasmídeos pBBRIMCS e pBBEGFP obtidos dos clones de *C. necator*.



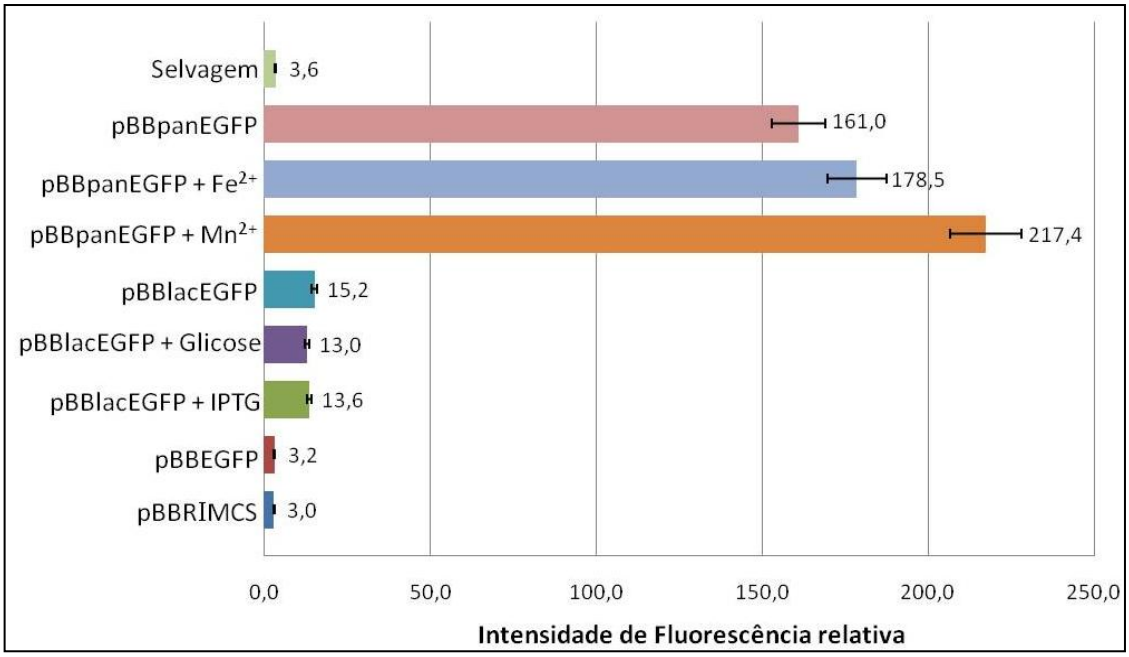
A) Perfil de migração do DNA plasmidial do clone hospedando o vetor pBBEGFP. 1 – Vetor não digerido, 2 - Digestão dupla *Xho*I/*Nde*I; B) Perfil de migração do DNA plasmidial do clone hospedando o vetor pBBRIMCS. 1 – Vetor não digerido, 2 – Digestão simples *Xho*I. LD) Marcador de peso molecular 1kb Plus Invitrogen®.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Os transformantes de *C. necator* com os diferentes plasmídeos, assim como a bactéria selvagem, foram analisados por citometria de fluxo. Amostras das culturas de cada linhagem foram retiradas na fase exponencial de crescimento e a intensidade de fluorescência para cada construção foi calculada pela mediana da intensidade relativa de cada população celular.

A expressão da proteína verde fluorescente foi então quantificada e os valores obtidos foram plotados em um gráfico para a comparação entre os promotores *lac* e *pan* e para observar a diferença de expressão em condições variadas de cultivo, como se pode ver na figura 17.

Figura 17 - Intensidade de fluorescência relativa medida através da citometria de fluxo nas diferentes linhagens de *C. necator*.



As células foram cultivadas em meios com e sem metais (Fe^{2+} e Mn^{2+}) e na presença de glicose 1% e IPTG.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como pode ser visto na figura 17, a expressão do gene da EGFP pelo promotor *pan* se mostrou muito forte em *C. necator*. O cultivo em presença de Mn^{2+} propiciou o maior nível de expressão (217,4), seguido do cultivo com Fe^{2+} (178,5) e, por fim, a bactéria recombinante cultivada sem metal (161). Os resultados mostram que, além de funcionar de maneira constitutiva, o promotor *pan* pode ainda sofrer indução pelos metais Mn^{2+} e Fe^{2+}.

A expressão do gene da EGFP pelo promotor *lac* em *C. necator* mostrou níveis baixos de intensidade de fluorescência (15,2). Além disso, a expressão permaneceu inalterada, tanto na presença de glicose, quanto na indução por IPTG.

Analisando a intensidade de fluorescência relativa conferida pelos dois plasmídeos, vê-se que claramente que o pBB-panEGFP conferiu uma melhor expressão da proteína EGFP na célula hospedeira. De fato, quando comparados os promotores sem indução alguma, a expressão da proteína EGFP pelo promotor *pan* é 10,6 vezes maior do que pelo promotor *lac*. Na presença de indutores, a diferença é ainda maior, sendo que o cultivo na presença de Mn^{2+} apresentou intensidade de fluorescência 16 vezes maior quando comparada ao induzido com IPTG.

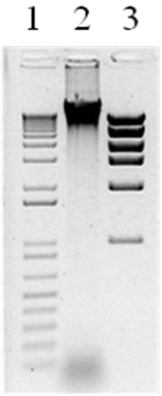
Como esperado, as bactérias portadoras dos plasmídeos pBBEGFP (3,2) e PBBRIMCS (3,0) apresentaram fluorescência semelhante à da bactéria selvagem (3,6).Com base nestes resultados, decidimos empregar o promotor *pan* para a expressão do gene heterólogo em *C. necator*.

4.5 Construção do plasmídeo pBB-panbop

4.5.1 Amplificação do gene *bop*

A primeira etapa da construção consistiu na amplificação do gene *bop*. Para tanto, foi extraído o DNA total de *H. salinarum* RI, que serviu de molde para a reação de PCR.

Figura 18 – Análise eletroforética do DNA total de *H. salinarum* RI.

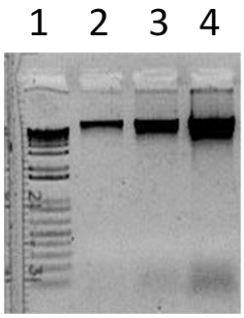


1: Marcador de peso molecular 1kb plus Invitrogen®. 2: DNA genômico de *H. salinarum* RI; 3:Marcador de massa molecular Invitrogen®.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como pode ser observado na canaleta dois da figura 18, a extração de DNA genômico foi bem sucedida e apresentou um ótimo rendimento. Decidiu-se então diluir este DNA a fim de otimizar a futura etapa de PCR (Figura 19).

Figura 19 – Diluição do DNA genômico de *H. salinarum* RI.



1: Marcador de peso molecular 1kb Plus Invitrogen®; 2: DNA genômico de *H. salinarum* RI diluído 1:100 (1µL aplicado) 3: DNA genômico de *H. salinarum* RI diluído 1:10 (1µL aplicado); 4: Molde de DNA sem diluir (0,2µL aplicado).

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

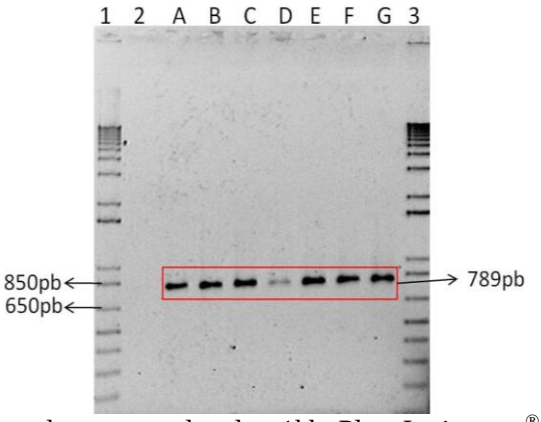
Utilizou-se então como molde o DNA diluído 1:100 para a amplificação do gene *bop*, tendo como base a reação descrita em materiais e métodos e, a fim de definir o melhor programa para a amplificação, realizou-se um PCR gradiente (Figura 20) com as seguintes temperaturas de *annealing*:

Tabela 6 - Diferentes temperaturas de *annealing* utilizadas para o PCR gradiente.

A	B	C	D	E	F	G
66 °C	65,5 °C	64,3 °C	62,4 °C	59,9 °C	58,1 °C	56,8 °C

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Figura 20 – PCR gradiente.

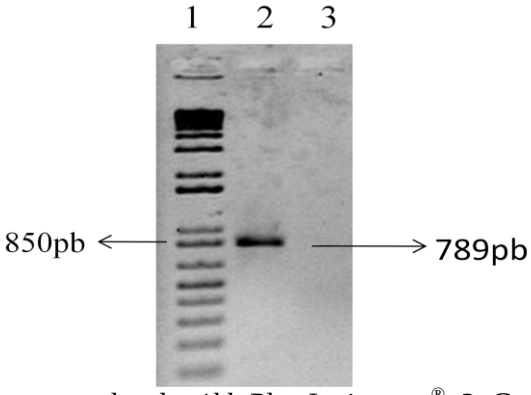


1 & 3: Marcador de peso molecular 1kb Plus Invitrogen®; 2: Controle Negativo da reação; A - G: Diferentes temperaturas de *annealing* descritas na Tabela 5.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

A partir dos resultados do PCR gradiente, definiu-se que a temperatura de *annealing* E (59,9 ^{o}C) apresentou a melhor amplificação. Repetiu-se o procedimento, agora apenas com a temperatura indicada, confirmando assim a obtenção do gene *bop*.

Figura 21 – Obtenção do *amplicon* do gene *bop*.



1: Marcador de peso molecular 1kb Plus Invitrogen®; 2: Gene *bop* amplificado a partir do genoma de *H. salinarum* RI; 3: Controle negativo (Água m.q).

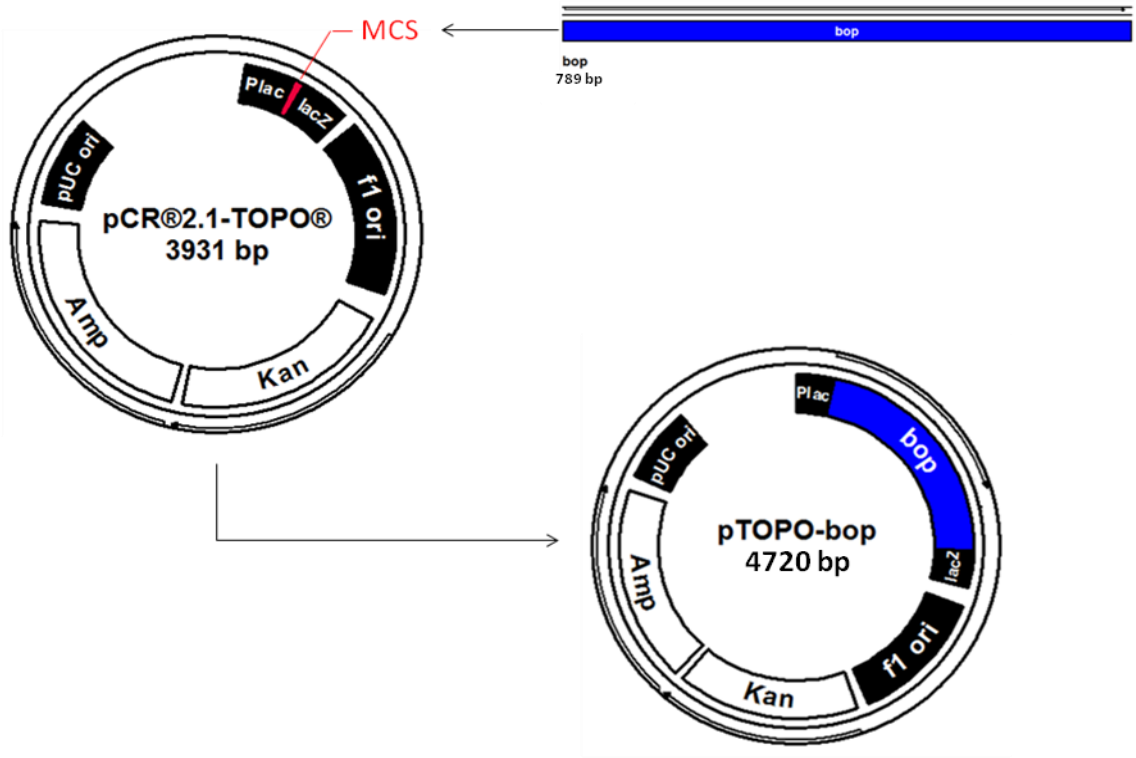
FONTE: MARQUEZONI, 2011.

4.5.2 Clonagem do gene *bop* no vetor pCR®2.1-TOPO®

Como esquematizado na figura 22, o amplicon *bop* foi clonado no vetor de clonagem pCR®2.1-TOPO®, com a finalidade de facilitar os trabalhos com o gene em questão, e também viabilizando a utilização dos oligonucleotídeos M13 presentes no kit do vetor. Os primers M13 foram desenhados com o intuito de possibilitar o sequenciamento de todo o

múltiplo sítio de clonagem presente no vetor pCR®2.1-TOPO® e, consequentemente, o inserto clonado. A mistura de ligação foi realizada entre o vetor de clonagem comercial já tratado e o inserto na proporção 1:4. Depois de terminada a incubação da ligação, a mistura foi utilizada para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α e os transformantes de interesse foram selecionados através de semeadura sobre meio contendo ampicilina, Xgal e IPTG. Apenas as colônias que apresentaram coloração branca foram selecionadas.

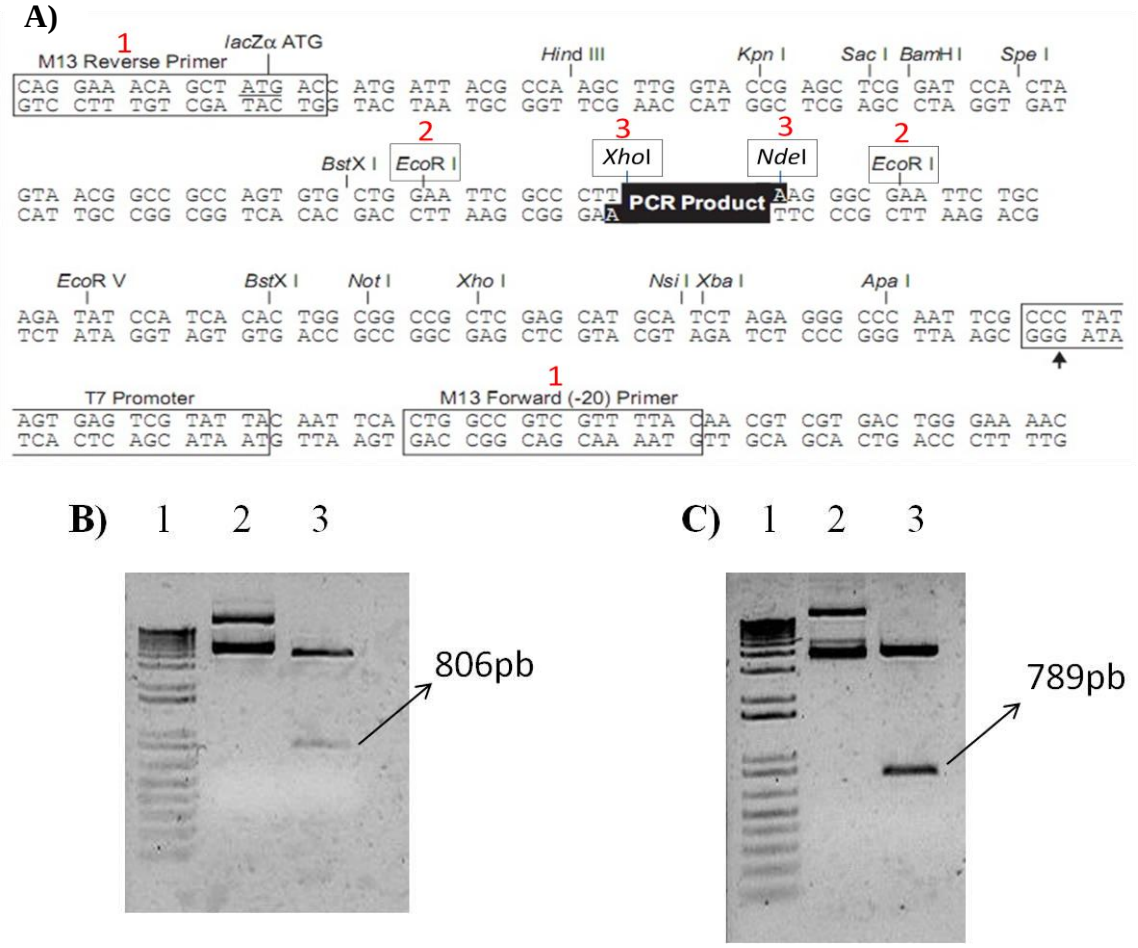
Figura 22 - Esquema da construção do plasmídeo pTOPO-bop.



FONTE: MARQUEZONI, 2011

O sucesso da construção foi comprovado através do sequenciamento utilizando os primers M13, como anteriormente citado, e também por análises de restrição, utilizando a digestão simples com a enzima *Eco*RI, liberando todo o sítio de clonagem consequentemente o inserto do gene *bop* de 789 pb, e digestão dupla com as enzimas *Xho*I e *Nde*I, liberando especificamente o gene *bop* de 789 pb. Todas as etapas estão apresentadas na figura 23.

Figura 23 - Estratégias utilizadas para comprovar o sucesso da construção do vetor pTOPO-bop.



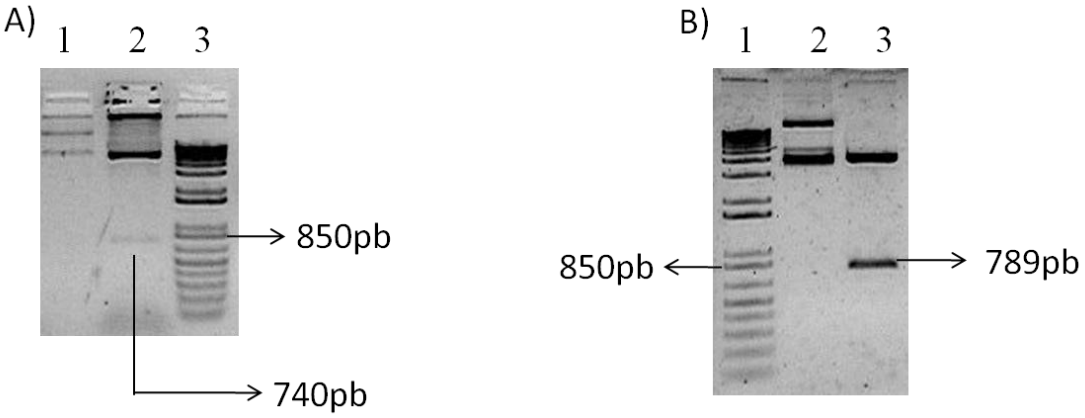
A) 1: Sítio de *anneling* dos primers M13 Reverse e Forward; 2: Sítio de restrição da enzima *Eco*RI; 3: Sítios de *Xho*I e *Nde*I flanqueando o gene *bop*. B) 1: Ladder 1kb plus Invitrogen®; 2: Vetor não digerido pTOPO-bop; 3: Digestão simples *Eco*RI; C) 1: Ladder 1kb plus Invitrogen®; 2: Vetor não digerido pTOPO-bop; 3: Digestão dupla *Xho*I/*Nde*I.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

4.5.3 Clonagem do gene *bop* no vetor pBB-panEGFP

O plasmídeo pBB-panEGFP foi digerido com as enzimas de restrição *Xho*I e *Nde*I liberando um fragmento de 740 pb correspondente ao gene que codifica a proteína EGFP. Após tal procedimento, o vetor manteve os sítios necessários para a clonagem do gene *bop* a jusante do promotor *pan*. Semelhantemente à etapa anterior, o vetor pTOPO-bop foi submetido a digestão dupla, empregando-se também as enzimas de restrição *Xho*I e *Nde*I, para liberar o inserto *bop* flanqueado pelos sítios de restrição correspondentes aos do vetor previamente digerido. Após separação eletroforética do vetor e inserto, ambos foram eluídos e purificados do gel de agarose (Figura 24).

Figura 24 - Obtenção do vetor e inserto para construção do plasmídeo pBB-panbop.

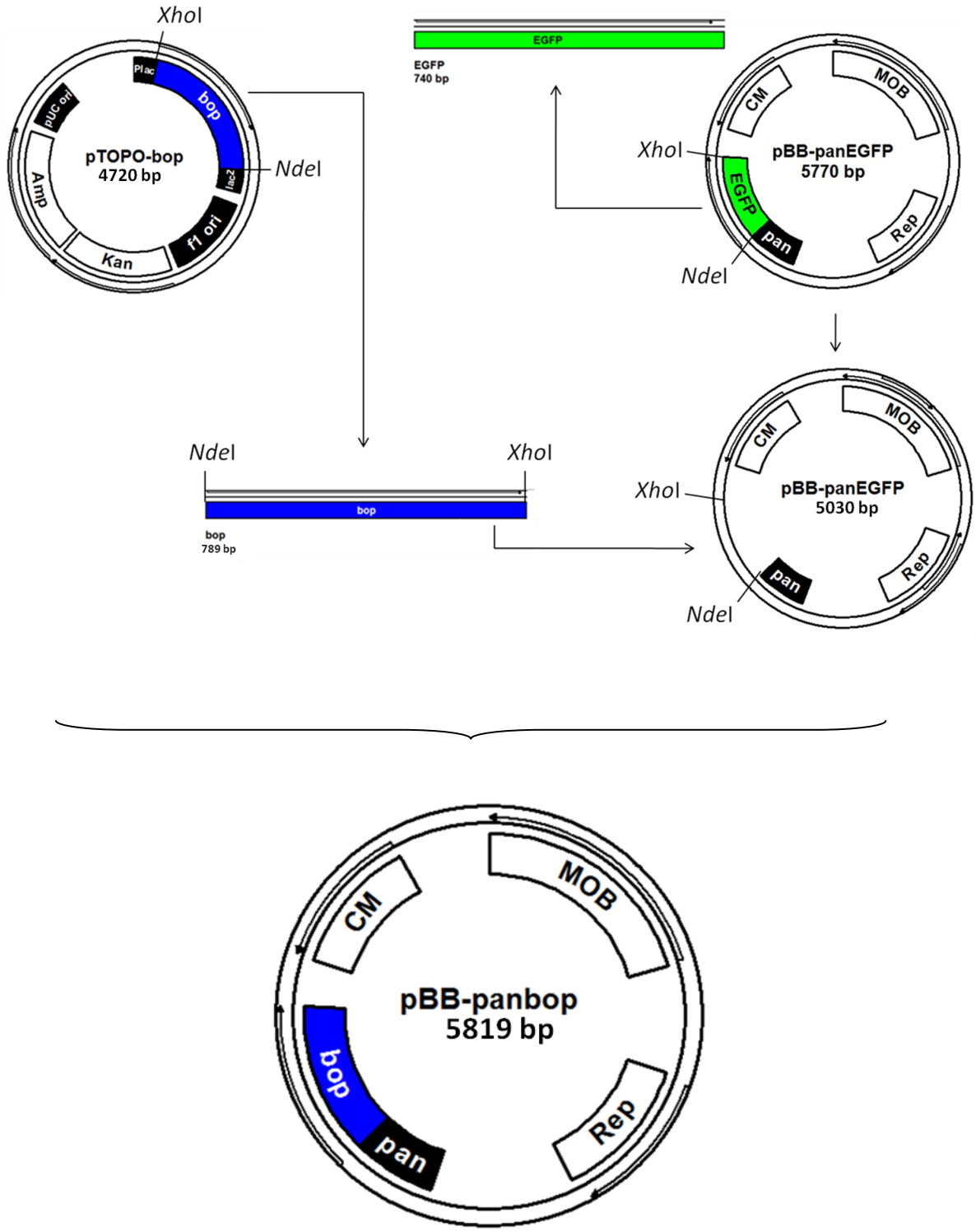


A) 1- Vetor pBB-panEGFP, 2- pBB-panEGFP após digestão dupla *Xho*I/*Nde*I; 3-DNA ladder 1kb plus Invitrogen ®. B) 1- DNA ladder 1kb plus Invitrogen®; 2- Vetor pTOPO-bop não digerido; 3-Vetor pTOPO-bop submetido a digestão dupla *Xho*I/*Nde*I.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como esquematizado na figura 25, o inserto *bop* foi então, clonado a jusante do promotor p*an*, originando o novo plasmídeo, pBB-panbop. Para tal, foi realizada uma mistura de ligação entre vetor e inserto, previamente digeridos, na proporção de 1:3. Depois de terminada a incubação de ligação, a mistura foi empregada na transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α e os clones transformantes foram selecionados através de semeadura em meio contendo cloranfenicol.

Figura 25 - Esquema da construção do plasmídeo pBB-panbop.

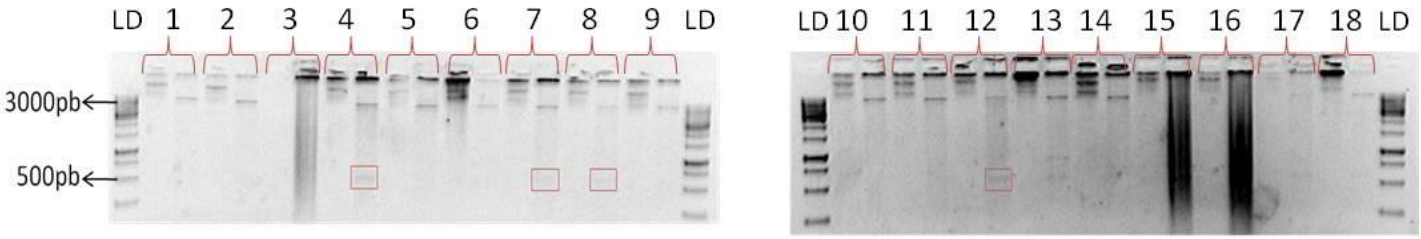


FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Para a confirmação do sucesso da ligação, os DNAs plasmidiais foram extraídos dos clones transformantes, digeridos com a enzima de restrição *Kpn*I e submetidos a análise eletroforética em gel de agarose 0,8% (Figura 26). Tal enzima possui a capacidade de digerir

o plasmídeo pBB-panbop em dois sítios específicos, posições 3894 e 4463, liberando dois fragmentos com tamanhos de 5250 pb e 569 pb.

Figura 26 - Análise dos clones transformantes de *E. coli* contendo o plasmídeo pBB-panbop.



A) LD: DNA ladder 1kb Fermentas®; 1 a 18: Vetor intacto e digestão *Kpn*I respectivamente dos transformantes obtidos.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

A análise eletroforética demonstrou que houve a liberação dos fragmentos esperados em quatro transformantes: 4, 7, 8 e 12. A presença do gene *bop* nos quatro transformantes foi confirmada através de análises de restrição, empregando digestão simples com *Eco*RI que lineariza o vetor em 5819 pb, digestão dupla *Xho*I e *Nde*I, liberando o gene *bop* de 789 pb e amplificação do inserto obtendo um amplicon correspondente ao gene *bop* (789 pb). Tais passos de confirmação estão apresentados na figura 27.

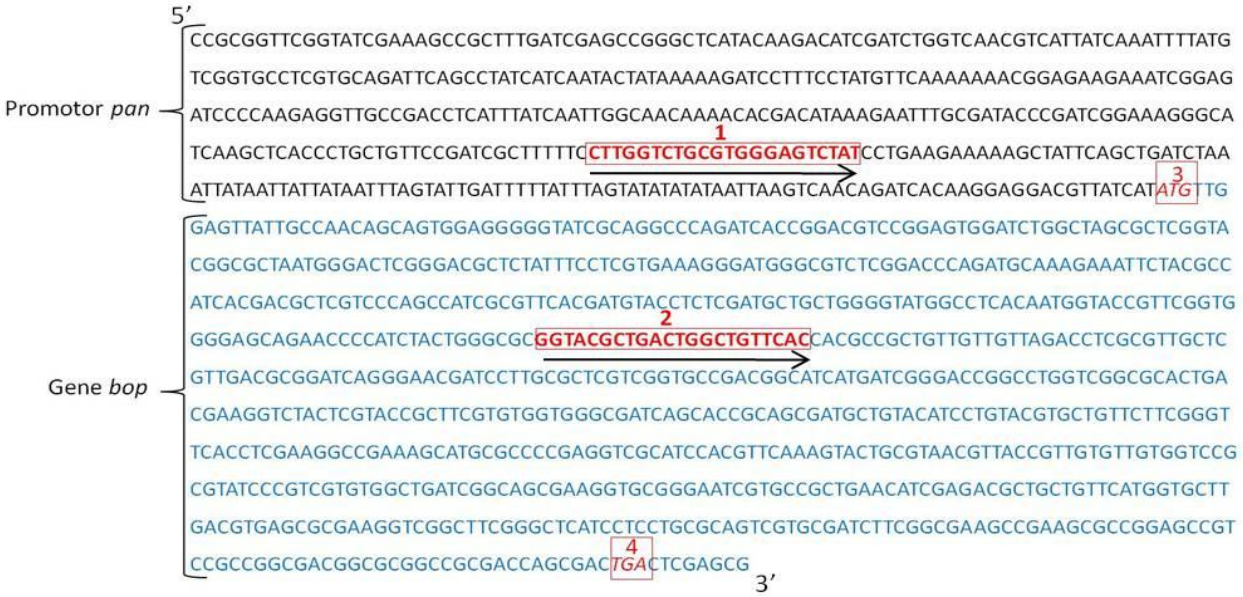
Figura 27 - Confirmação da obtenção dos clones transformantes de *E. coli* contendo o plasmídeo pBB-panbop.

A) Análises de restrição para confirmação dos clones LD: DNA ladder 1kb Fermentas®. 1 a 4: Digestão simples *Eco*RI; 5 a 8 Digestão dupla *Xho*I/*Nde*I. B) LD: DNA ladder 1kb Plus Invitrogen®; 1 a 4 Confirmação da integridade do gene *bop* através de PCR utilizando os primers FWD *bop* CN e REV *bop* CN; 5: Controle negativo.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Na etapa seguinte, os plasmídeos dos quatro clones para os quais houve confirmação da construção, foram sequenciados, visando definir a integridade da construção (Figura 28), garantindo assim a expressão do gene heterólogo *bop*. Para tal, foram desenhados dois oligonucleotídeos Forward denominados seqbop01 e seqbop02. O primer seqbop01 foi desenhado no interior da sequência do promotor *pan* a fim de sequenciar o início do gene *bop* e definir se o códon de iniciação não teria sofrido mutações durante a construção, enquanto o primer seqbop02 foi desenhado no interior da sequência do gene *bop*, possibilitando verificar se o restante do gene, assim como o códon de terminação mantinham sua integridade. Dentre os transformantes sequenciados, o clone 4 apresentou as regiões de iniciação e terminação bem determinadas, assim como não foram constatadas mutações em sua sequência, por essa razão este clone foi escolhido para dar continuidade ao trabalho.

Figura 28 - Estratégia utilizada para sequenciamento dos clones transformantes 4, 7, 8 e 12.



1) Primer Forward seqbop01; 2) Primer Forward seqbop02; 3) Códon de iniciação; 4) Códon de terminação.

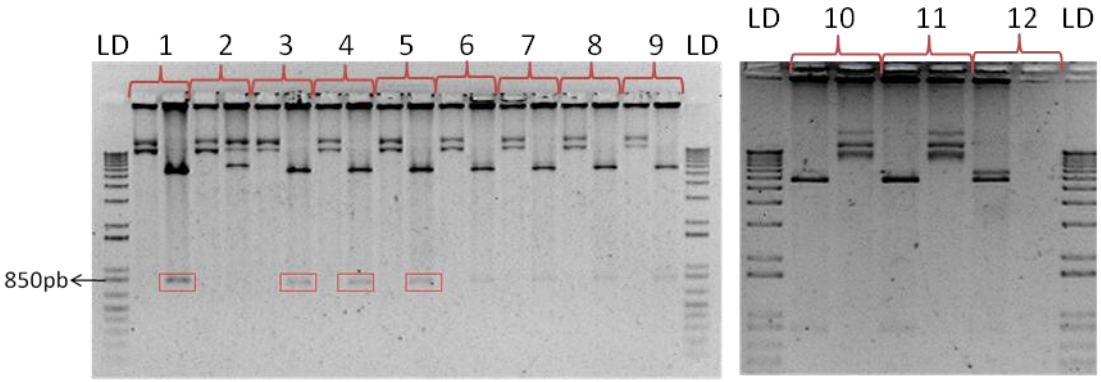
FONTE: MARQUEZONI, 2011.

4.6 Transformação de *Cupriavidus necator* DSMZ545 com o plasmídeo pBB-panbop

O DNA plasmidial do clone 4 foi extraído de *E. coli* e empregado na transformação de *C. necator* por eletroporação. Os clones transformantes foram selecionados através de

semeadura em meio contendo cloranfenicol e depois analisados através da digestão dupla empregando-se as enzimas *Xho*I e *Nde*I (Figura 29).

Figura 29 - Análise dos clones transformantes em *C. necator* contendo o plasmídeo pBB-panbop.

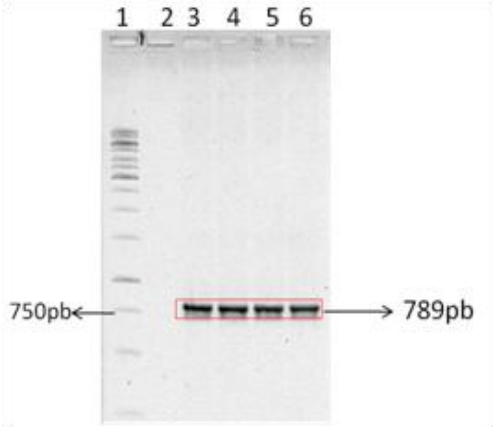


A) LD: DNA ladder 1kb Plus Invitrogen®; 1 a 12: Individualmente os números representam o DNA plasmidial de cada transformante obtido na seguinte ordem - vetor intacto e digestão dupla *Xho*I e *Nde*I respectivamente.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Os transformantes 1, 3, 4 e 5 apresentaram o padrão de restrição esperado, liberando um fragmento de 789 pb, correspondente ao gene *bop*. Posteriormente, os plasmídeos extraídos dos transformantes 1, 3, 4 e 5 foram submetidos a confirmação através de PCR, como demonstrado na figura 30.

Figura 30 - Confirmação da obtenção dos clones transformantes de *C. necator* contendo o plasmídeo pBB-panbop.



1: DNA Ladder 1kb Fermentas®; 2: Controle Negativo da reação; 3 a 6: PCR dos DNAs plasmidiais dos transformantes 1, 3, 4 e 5, respectivamente.

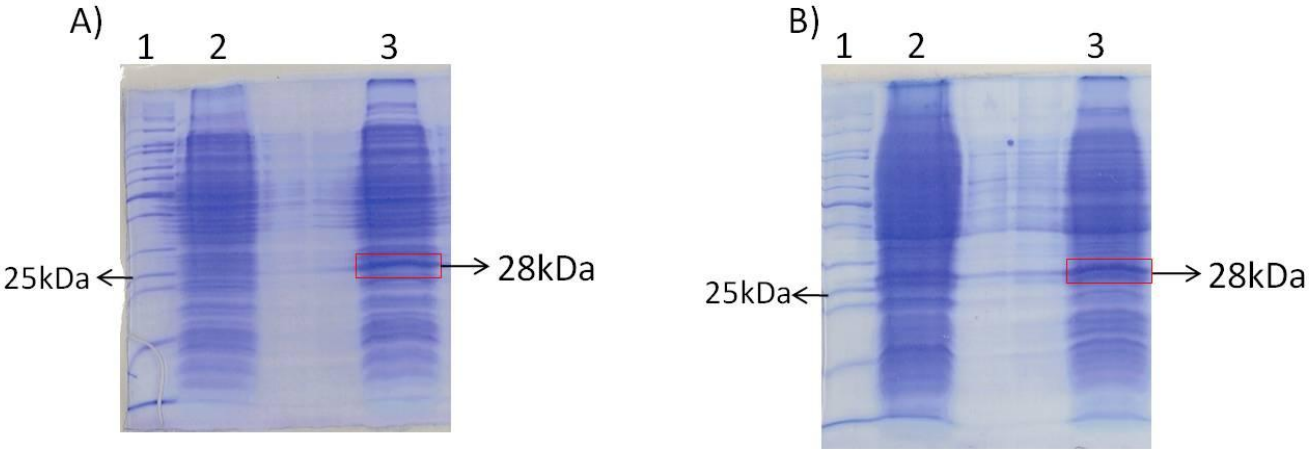
FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como se pode ver claramente na figura 30, a análise por PCR mostrou a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 789 pb, confirmando a obtenção dos clones de pBB-panbop em *C. necator*.

4.7 Análise de expressão da proteína recombinante

O sucesso da expressão da proteína recombinante bacteriorodopsina (bR), expressa pelos clones recombinantes de *E. coli* e *C. necator* foi confirmado por meio de análise em SDS-PAGE (Figura 31). As células foram crescidas em meio completo LB, e não foi necessária a adição de indutores, visto que o promotor *pan* apresenta expressão constitutiva. Após o crescimento, as bactérias foram processadas a fim de se observar o padrão das proteínas totais de ambas.

Figura 31 - Perfis de migração de proteínas totais em SDS-PAGE após eletroforese e coloração com comassie blue.



A) 1: Padrão de peso molecular PageRuler™ Unstained Protein Ladder; 2: Padrão de expressão em *E. coli* selvagem; 3: Padrão de expressão em *E. coli* transformada com o plasmídeo pBB-panbop. B) 1: Padrão de peso molecular PageRuler™ Unstained Protein Ladder; 2: Padrão de expressão em *C. necator* selvagem; 3: Padrão de expressão em *C. necator* transformada com o plasmídeo pBB-panbop.

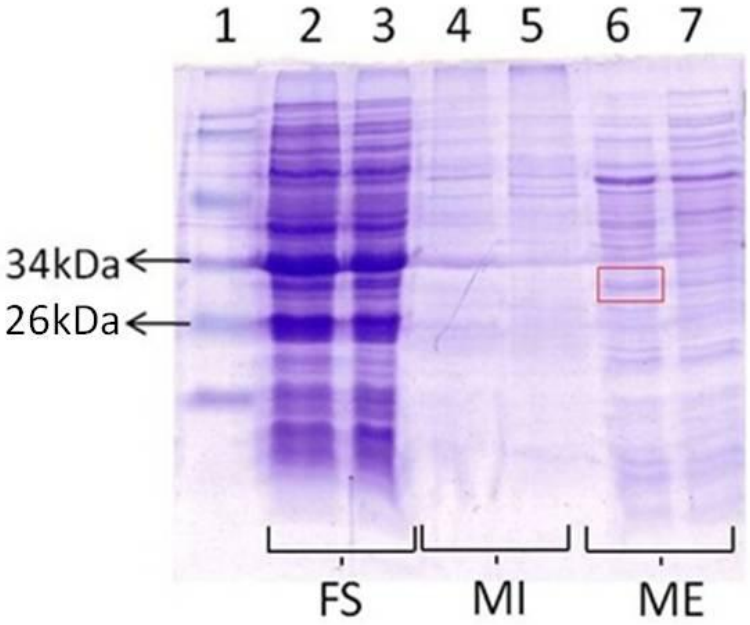
FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como se pode observar na Figura 31, ambas as linhagens recombinantes apresentaram uma banda na altura de 28 kDa, a altura esperada para a bacteriorodopsina.

Visto que a proteína bR é um translocador de prótons transmembrana, era necessário definir se a mesma estava sendo transportada e ancorada no local correto para poder executar a sua função. Para tal, empregou-se um protocolo de separação das proteínas de *C. necator*

selvagem e recombinante em três frações: Fração solúvel, membrana interna e membrana externa. As células foram lisadas e os componentes provenientes de tal extração foram submetidos a diferentes tipos de centrifugações. Ao final do procedimento, as frações foram submetidas a corrida eletroforética em SDS-PAGE (Figura 32).

Figura 32 - Perfis de migração da fração solúvel (FS), membrana interna (MI) e membrana externa (ME) em SDS-PAGE após eletroforese e coloração com comassie blue.



1: Marcador de peso molecular Prestained NEB®; 2: Fração solúvel de *C. necator* recombinante; 3: Fração solúvel de *C. necator* selvagem; 4: Membrana interna de *C. necator* recombinante; 5: Membrana interna de *C. necator* selvagem; 6: Membrana externa de *C. necator* recombinante; 7: Membrana externa de *C. necator* selvagem.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como pode ser observado na Figura 32, as frações solúvel e de membrana interna apresentaram padrão eletroforético muito semelhante, enquanto na membrana externa da bactéria recombinante aparece uma banda na altura de 28 kDa, correspondente à bR. A mesma banda não é observada na bactéria selvagem, definindo assim que a proteína está sendo expressa e transportada para a membrana externa apenas na bactéria que hospeda o plasmídeo pBB-panbop.

4.8 Avaliação da Função Biológica

Uma vez comprovada a clonagem e expressão da bacteriorodopsina em *C. necator*, foram realizados ensaios para avaliação dos efeitos biológicos da nova construção genética na linhagem recombinante.

A etapa inicial consistiu na caracterização fisiológica da linhagem recombinante em comparação à linhagem selvagem em cultivo aeróbico em meio contendo glicose como fonte de carbono. Foi analisado o comportamento de ambas as linhagens com relação a crescimento celular, consumo da fonte de carbono e caracterização, dosagem e utilização de PHA.

A seguir, foram realizados ensaios biológicos tomando por base experimentos descritos na literatura, para demonstrar funções biológicas de linhagens bacterianas recombinantes com capacidade de expressão heteróloga de rodopsinas e caracterização bioquímica destes transformantes.

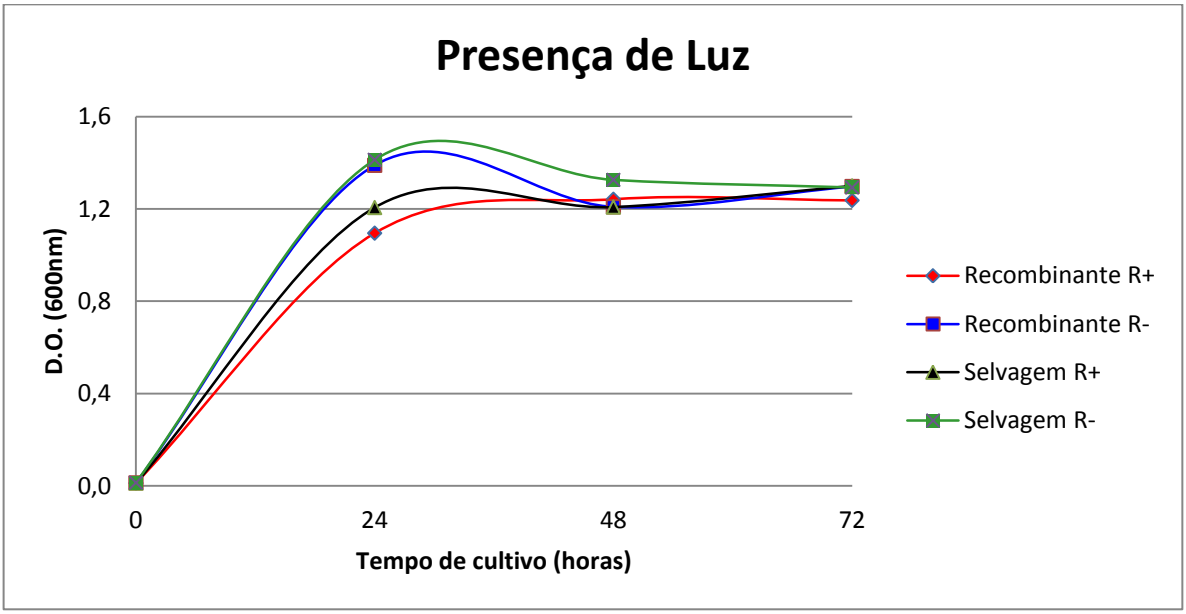
É importante ressaltar que, em todos os ensaios biológicos, a avaliação do comportamento celular foi realizada, seja na ausência de luz, seja na presença de luz de comprimento de onda 570 nm, de modo a permitir a indução da atividade da bacteriorodopsina.

4.8.1 Avaliação da Linhagem Selvagem e Recombinante em Cultivo Aeróbio com Glicose

Para avaliar e comparar as diferenças fisiológicas entre as linhagens, selvagem e recombinante, de *C. necator*, decidiu-se elaborar um ensaio capaz de demonstrar as alterações com relação a crescimento celular, consumo de fonte de carbono, dosagem de produção de PHAs e caracterização do polímero. Para tal, utilizou-se o meio mineral Ramsay, específico para crescimento de *C. necator*, suplementado com glicose 2%. O experimento foi separado em dois grupos distintos, o primeiro composto por *C. necator* selvagem e o segundo, pela linhagem recombinante na presença/ausência de luz e presença/ausência do cofator retinal. Os resultados estão apresentados nas figuras a seguir.

Crescimento Celular – Densidade Óptica (D.O.)

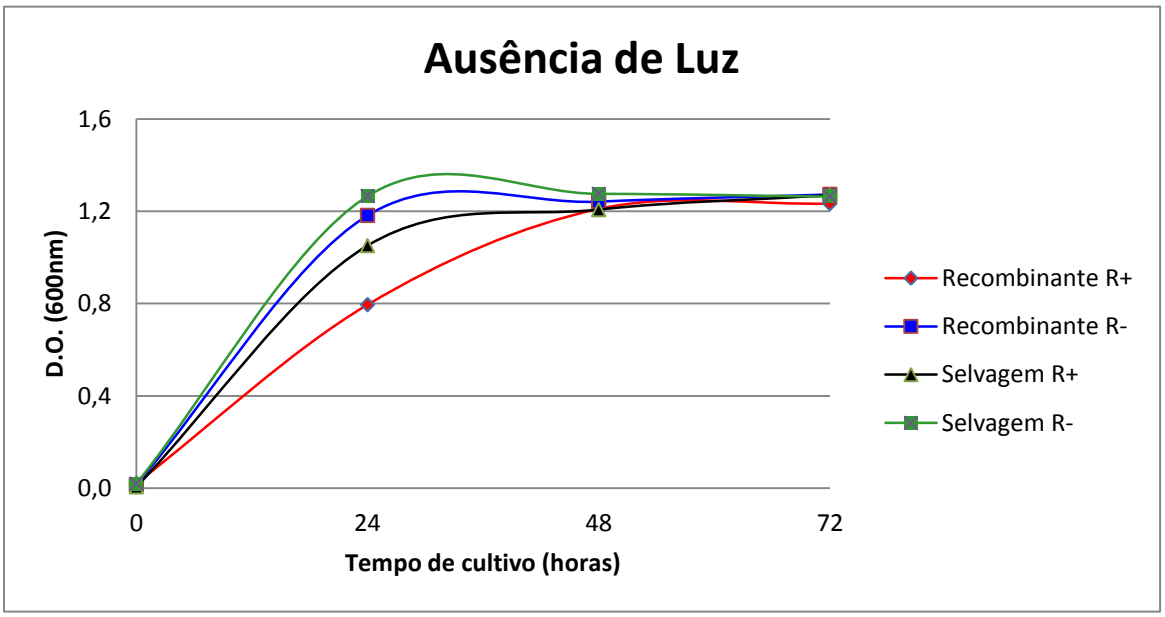
Figura 33 – (D.O) Curvas de crescimento em presença de luz (λ_{570nm}).



Selvagem: *C. necator* linhagem DSMZ 545; Recombinante: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop capaz de expressar a bR; R+: Presença de Retinal; R-: Ausência de Retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Figura 34 – (D.O.) Curvas de crescimento em ausência de luz.

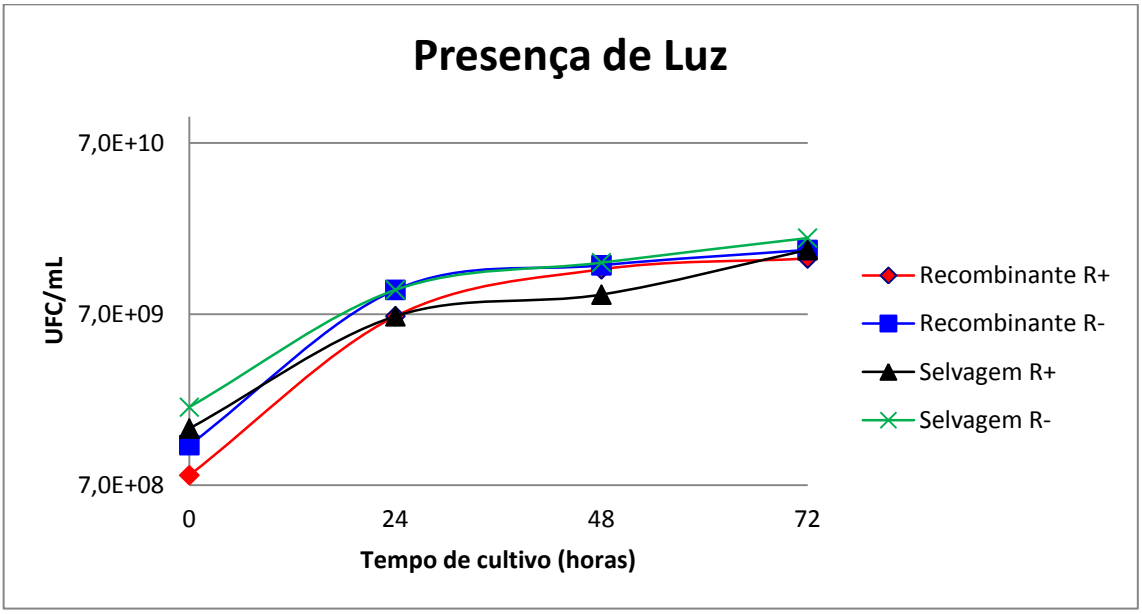


Selvagem: *C. necator* linhagem DSMZ 545. Recombinante: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop capaz de expressar a bR; R+: Presença de Retinal; R-: Ausência de Retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Crescimento Celular – Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.)

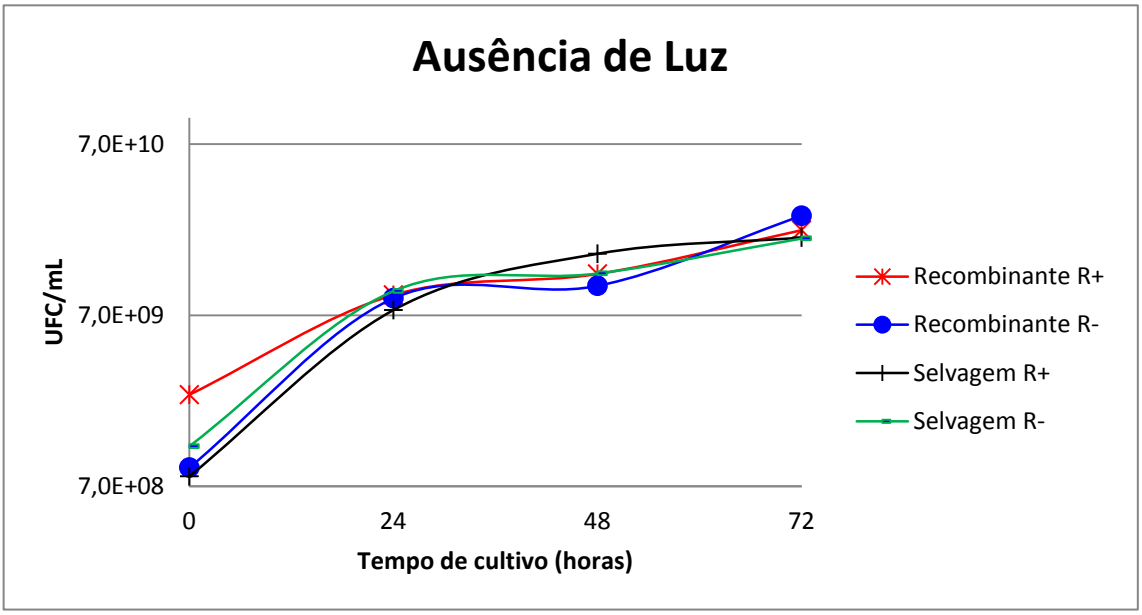
Figura 35 – (U.F.C) Curvas de crescimento em presença de luz (λ_{570nm}).



Selvagem: *C. necator* linhagem DSMZ 545; Recombinante: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop capaz de expressar a bR; R+: Presença de Retinal; R-: Ausência de Retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Figura 36 – (U.F.C) Curvas de crescimento em ausência de luz.



Selvagem: *C. necator* linhagem DSMZ 545; Recombinante: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop capaz de expressar a bR; R+: Presença de Retinal; R-: Ausência de Retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

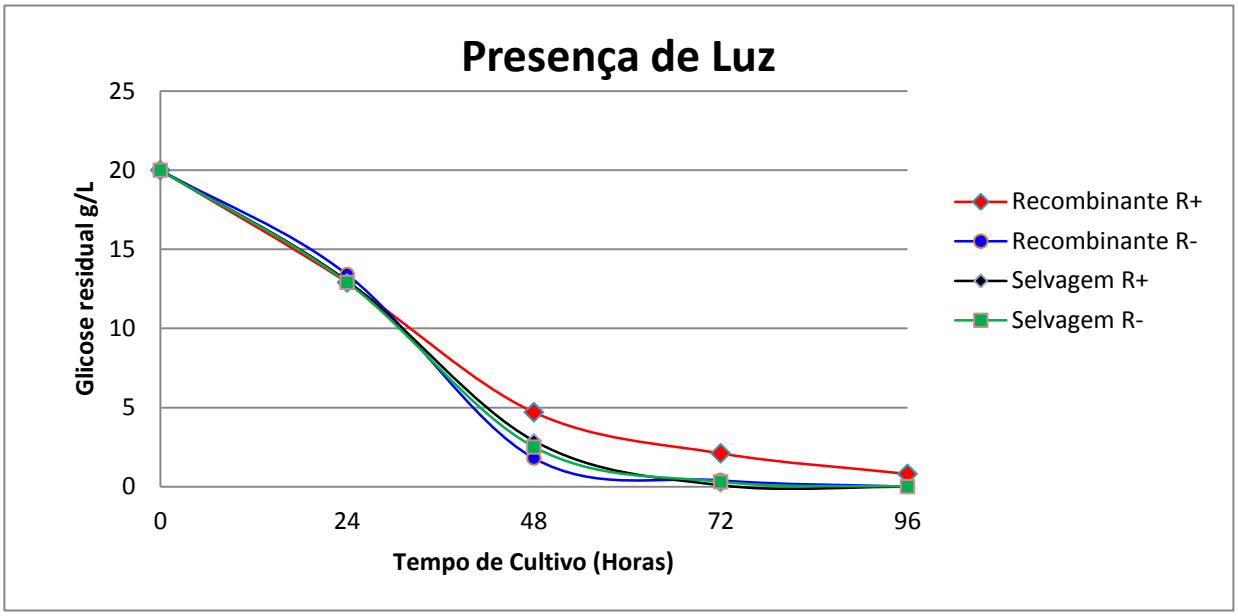
Acompanhando-se o crescimento celular pela medida da absorbância a λ_{600nm} (Figuras 33 e 34), é possível verificar que o comportamento das linhagens foi semelhante, quando cultivadas sem adição de retinal. Tanto a linhagem selvagem quanto a linhagem recombinante apresentaram o mesmo padrão de crescimento, mantendo-se em fase logarítmica nas 24 horas iniciais de cultivo, com a mesma velocidade de crescimento, entrando a seguir em fase estacionária. É interessante notar que a presença do cofator retinal inibiu o crescimento de ambas as linhagens, seja em ausência ou presença de luz. Por outro lado, todas as culturas atingiram maiores valores de absorbância em presença de luz quando comparadas aos cultivos em ausência de iluminação, podendo ser resultado da tumêscencia da célula provocada pelo acúmulo de polímero, detectável no comprimento de onda λ_{600nm}.

Assim, para garantir um monitoramento mais preciso do crescimento celular, foram realizadas em paralelo curvas de crescimento das linhagens por meio da contagem de viáveis (U.F.C./mL). Pela análise das figuras 35 e 36, pode-se verificar que a medida de Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.) foi ao encontro dos resultados da análise de absorbância, apresentando um padrão semelhante para as 2 linhagens nas diferentes condições. Em presença de luz, observou-se mais uma vez que a presença de retinal prejudicou o crescimento de ambas as linhagens. Ao analisar as curvas de crescimento em presença de luz, percebe-se que ambas as linhagens em ausência do cofator retinal apresentaram igual velocidade de crescimento, tendo a linhagem selvagem atingido um valor de densidade celular ligeiramente superior no ponto de 72 horas. No caso dos cultivos em ausência de luz, a linhagem recombinante em ausência de retinal foi a que alcançou maior densidade celular no ponto de 72 horas.

É interessante notar que, em ausência de luz, com exceção da linhagem selvagem cultivada com retinal, todas as culturas apresentaram uma parada de crescimento entre 24 e 48 horas de cultivo, retomando a seguir o crescimento até 72 horas. Uma possível explicação para esta diauxia é que as células acumulem o PHA entre 24 e 48 horas, passando em seguida a utilizar este material de reserva para retomar o crescimento quando a concentração de glicose no meio atinge valores mais baixos. O passo seguinte, portanto, consistiu em medir a concentração de glicose ao longo do crescimento celular.

Consumo de glicose ao longo do crescimento

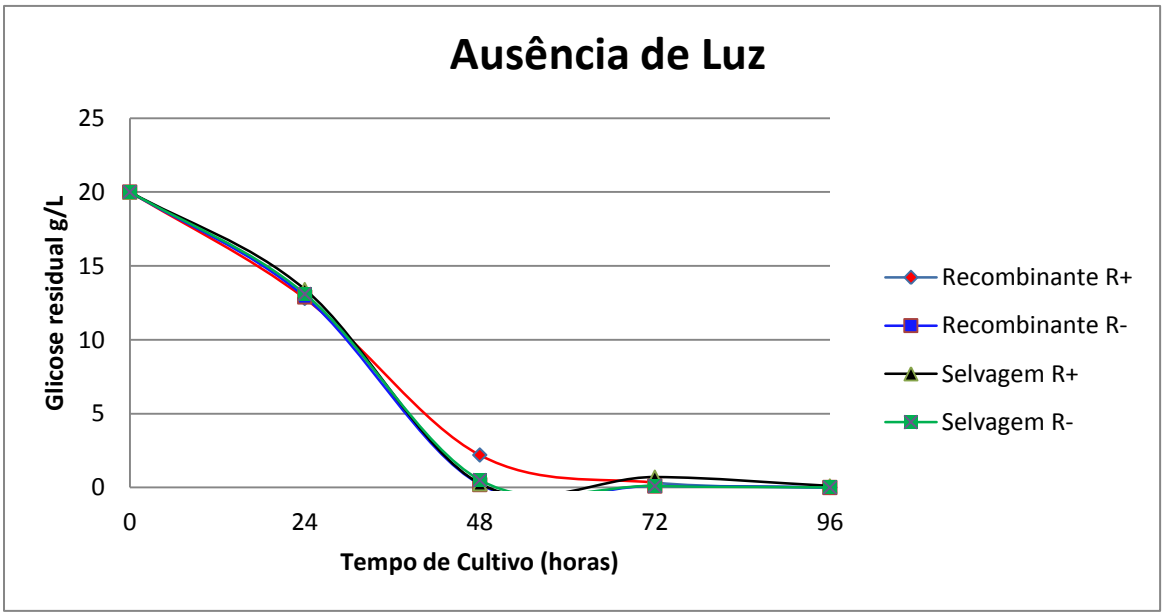
Figura 37 - Consumo de glicose ao longo do crescimento em presença de luz (λ_{570nm}).



Selvagem: *C. necator* linhagem DSMZ 545; Recombinante: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop capaz de expressar a bR; R+: Presença de Retinal; R-: Ausência de Retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Figura 38 - Consumo de glicose ao longo do crescimento em ausência de luz.



Selvagem: *C. necator* linhagem DSMZ 545; Recombinante: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop capaz de expressar a bR; R+: Presença de Retinal; R-: Ausência de Retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como pode ser observado na figura 38, em ausência de luz, a concentração de glicose decaíu exponencialmente, tendo praticamente se esgotado em 48 horas, para todas as culturas, com exceção da linhagem recombinante cultivada em presença de retinal, que sofreu um ligeiro atraso.

Em presença de luz (Figura 37), pode-se observar que, para ambas as linhagens, o consumo foi mais lento, uma vez que a glicose só foi totalmente consumida em 72 horas. Novamente se verificou que a linhagem recombinante suplementada com o cofator retinal apresentou um consumo mais lento da glicose. Uma possível explicação para estes resultados talvez advenha do fato de que, em presença de luz, esteja ocorrendo produção de ATP decorrente da ação da bacteriorodopsina.

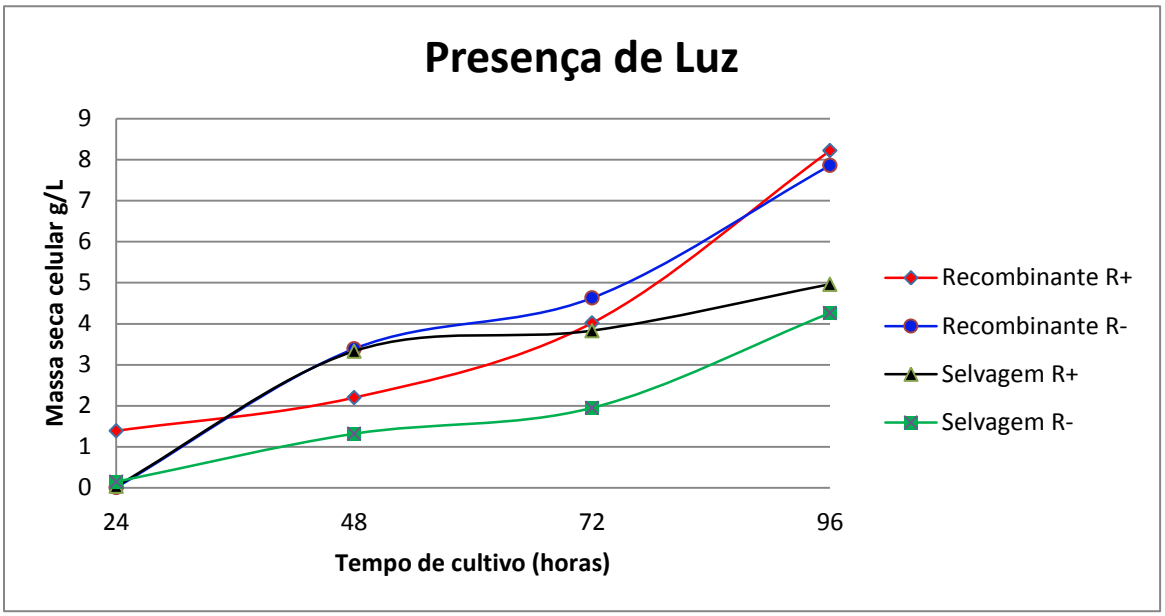
Comparando-se as figuras 37 e 38, vê-se que, em ausência de luz, a glicose foi esgotada mais rapidamente. No tempo de 48 horas, apenas a linhagem recombinante suplementada com o cofator retinal apresentou ligeira diferença, demonstrando um consumo mais lento da glicose. Parte desta glicose consumida no decorrer das 48 horas iniciais, provavelmente foi estocada na forma de PHAs, visto que o meio mineral utilizado pode provocar um desbalanço nutricional, que induz o microrganismo a estocar a fonte de carbono disponível sob a forma de PHAs.

Procedemos então à análise da produção e consumo de PHAs pelas diferentes linhagens qualitativamente (massa seca celular) e quantitativamente (cromatografia gasosa).

Produção de Polihidroxialcanoatos – Massa Seca Celular

A medida de massa seca celular proporciona uma estimativa da quantidade de massa presente em gramas por litro de cultura processado, tal quantidade tende a alterar-se de acordo com a produção de polímero pela célula. Além de fornecer dados qualitativos com relação à produção do polímero, trata-se de um procedimento precursor à quantificação de PHA, visto que tal passo é indispensável para posterior análise por cromatografia gasosa.

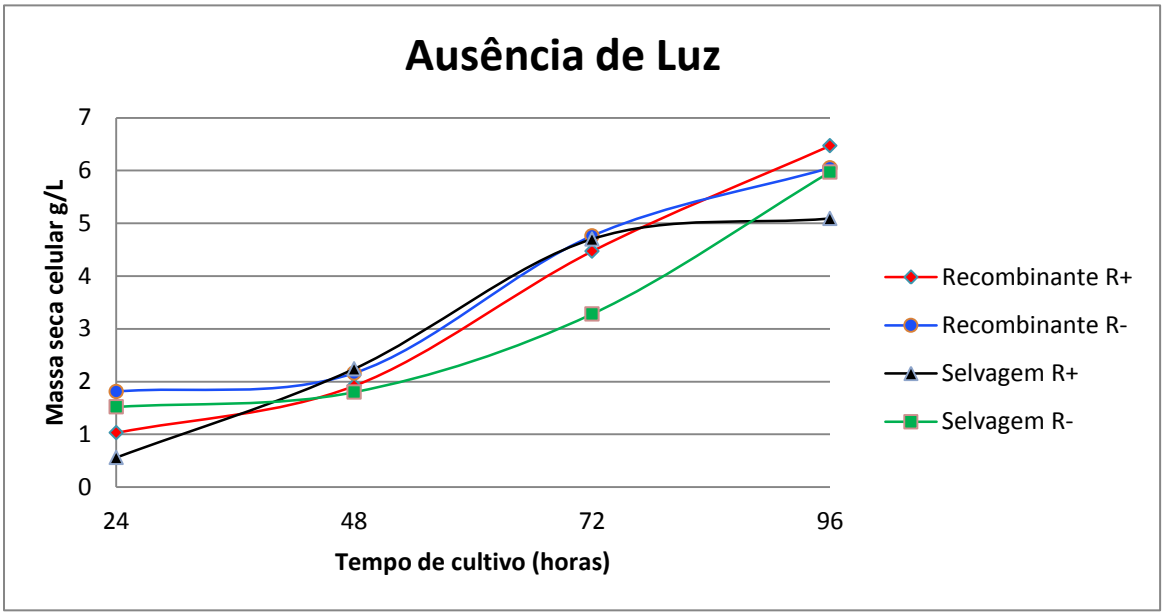
Figura 39 - Concentração da massa seca celular em função do tempo de cultivo em presença de luz (λ_{570nm}).



Selvagem: *C. necator* linhagem DSMZ 545; Recombinante: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop capaz de expressar a bR; R+: Presença de Retinal; R-: Ausência de Retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Figura 40 - Concentração da massa seca celular em função do tempo de cultivo em ausência de luz.

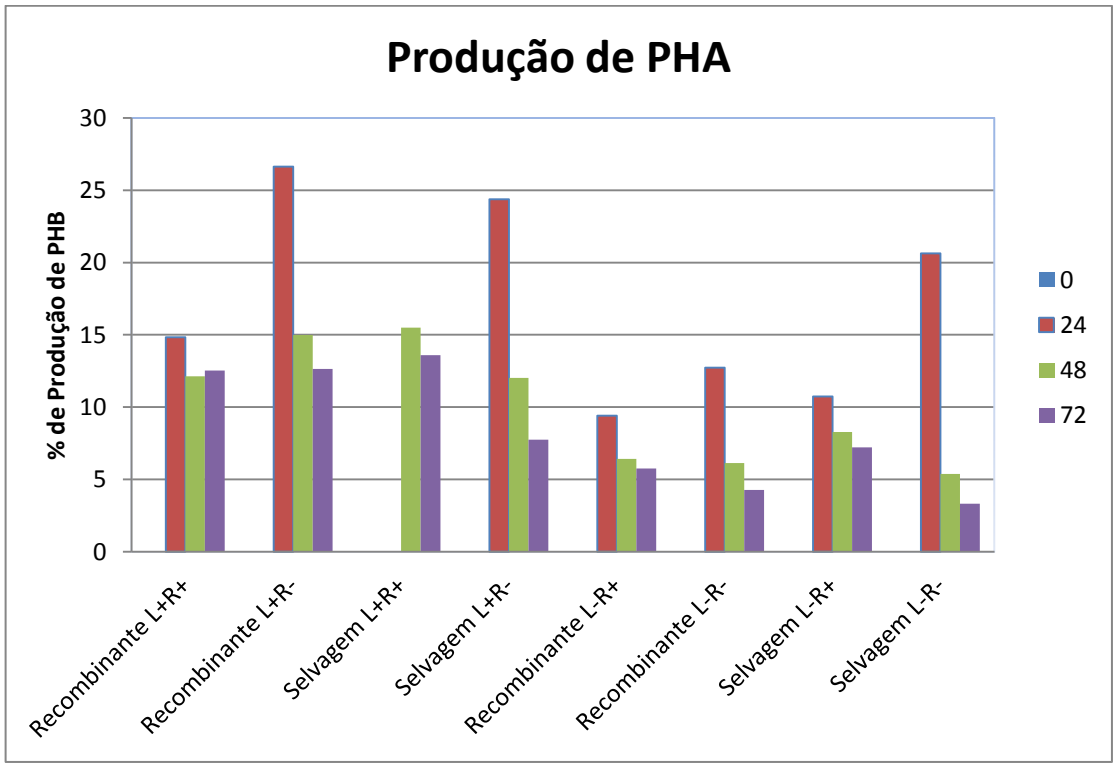


Selvagem: *C. necator* linhagem DSMZ 545; Recombinante: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop capaz de expressar a bR; R+: Presença de Retinal; R-: Ausência de Retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Produção de Polihidroxialcanoatos – Cromatografia Gasosa

Figura 41 - Teor de PHA nas diferentes linhagens.



Recombinante L+R+: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em presença de luz e retinal; Recombinante L+R-: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em presença de luz e ausência de retinal; Selvagem L+R+: *C. necator* DSMZ 545 cultivada em presença de luz e retinal; Selvagem L+R-: *C. necator* DSMZ 545 cultivada em presença de luz e ausência de retinal; Recombinante L-R+: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em ausência de luz e presença de retinal; Recombinante L-R-: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em ausência de luz e de retinal; Selvagem L-R+: *C. necator* DSMZ 545 cultivada em ausência de luz e presença de retinal; Selvagem L-R-: *C. necator* DSMZ 545 cultivada em ausência de luz e de retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Pode-se observar pela análise das figuras 39 e 40, que a linhagem recombinante, em todas as condições, apresentou maiores valores de massa seca, mesmo em presença de retinal. A linhagem selvagem ficou sempre abaixo da linhagem recombinante, conseguindo alcançar o mesmo patamar da linhagem recombinante apenas no ponto de 96 h de crescimento em ausência de luz. Em presença de luz, foram alcançados maiores valores de massa seca pela linhagem recombinante, que apresentou um valor final quase 2 vezes maior que a selvagem.

A cromatografia gasosa foi empregada a fim de se determinar o teor e composição do polímero produzido pelos microrganismos. Como esperado, o polihidroxibutirato (PHB) foi o único PHA produzido por ambas as linhagens, selvagem e recombinante.

Pela análise da figura 41, vê-se que o maior teor do polímero corresponde sempre às 24 horas iniciais do ensaio, decorrente da alta concentração de fonte de carbono presente no meio, consequentemente um alto acúmulo pelo microrganismo. A partir deste momento, a quantidade de PHB decai, diretamente relacionada com a diminuição da glicose disponível no meio de cultura, por essa razão o acúmulo de polímero diminui, ao mesmo tempo em que se inicia o consumo deste material de reserva para o suprimento das necessidades energéticas da célula.

Em ausência de luz, as células apresentaram menor produção do polímero, quando comparadas com as células cultivadas em presença de luz. O padrão geral se manteve, mostrando um maior acúmulo nas primeiras 24 horas e uma queda gradual nas 48 horas seguintes. A linhagem selvagem em ausência de luz e retinal apresentou um alto acúmulo de PHB nas primeiras 24 horas, atingindo 20% da massa total por célula composta de polímero. A mesma linhagem apresentou a maior queda nas 48 horas subsequentes, atingindo um declínio de 85%.

Em presença de luz, alcançou-se o maior teor do polímero pela linhagem recombinante cultivada em ausência de retinal. Tanto a linhagem selvagem quanto a recombinante, quando cultivadas em ausência de retinal, apresentaram maior teor de PHB nas primeiras 24 horas, atingindo respectivamente 24,3% e 26,6% da massa da célula composta pelo polímero. Nas 24 horas seguintes, ambas as linhagens apresentaram uma queda de aproximadamente 50% no teor do polímero.

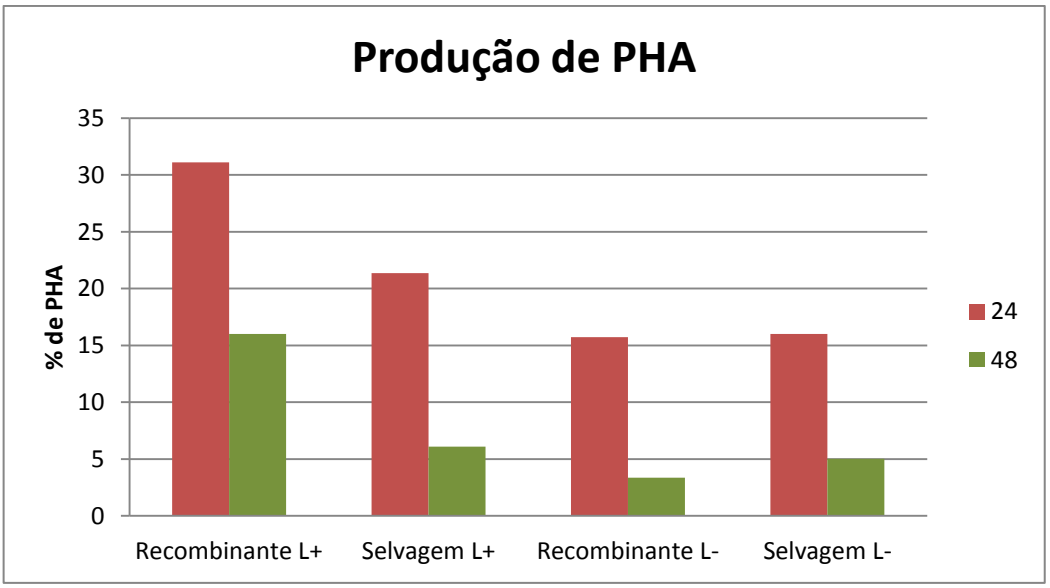
Por fim, é interessante notar o comportamento da linhagem recombinante em presença de luz e retinal. Em tais condições, a linhagem apresentou uma menor produção nas primeiras 24 horas de cultivo (14,8%), porém com um decréscimo mínimo nas horas seguintes, apresentando um baixo consumo do estoque de PHB.

Com relação à linhagem selvagem em presença de luz e retinal, a amostra de 24 horas foi insatisfatória para leitura no cromatógrafo, por essa razão este ponto não foi apresentado na figura 41.

Considerando que a linhagem selvagem não possui genes conhecidos que possam otimizar a produção de PHB em presença de luz, decidiu-se repetir o experimento para confirmar esse resultado inesperado, porém sem a suplementação das culturas com retinal, visto que, na maioria dos cultivos com adição de retinal, havia sido observada uma diminuição do crescimento celular, assim como da produção de PHB, para ambas as linhagens. Para estabelecer o perfil de produção de PHB, o ensaio foi programado de maneira similar ao anterior, porém apenas os pontos de 24 e 48 horas foram analisados, já que havíamos constatado as maiores diferenças em tais tempos. Os resultados estão apresentados na figura 42.

Produção de Polihidroxialcanoatos – Cromatografia Gasosa

Figura 42 - Teor de PHA das diferentes linhagens cultivadas sem adição de retinal.



Recombinante L+: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em presença de luz; Selvagem L+: *C. necator* DSMZ 545 cultivada em presença de luz; Recombinante L-: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivadaem ausência de luz; Selvagem L-: *C. necator* DSMZ 545 cultivada em ausência de luz.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como se pode observar na figura 42, no segundo ensaio de cromatografia gasosa, de maneira geral, os resultados se mantiveram coerentes com os resultados anteriores, sendo 24 horas o tempo em que se verificou o maior teor do polímero para ambas as linhagens, em

qualquer das condições. Confirmando os resultados da figura 41, a linhagem recombinante cultivada em presença de luz foi aquela que teve o melhor desempenho (~1,5 vezes mais do que a linhagem selvagem), apresentando o dobro de teor do polímero em relação ao seu cultivo em ausência de luz. Além disto, ambas as linhagens acumularam maior teor do polímero quando cultivadas em presença de luz. Entretanto, diferentemente do primeiro ensaio, não se verificou diferença entre as 2 linhagens cultivadas em ausência de luz, o que seria o resultado esperado.

Analisando-se em conjunto os resultados de todos os ensaios, pode-se concluir que, embora não tenha havido uma diferença significativa no crescimento das linhagens, houve um efeito considerável na capacidade de produzir polihidroxibutirato em presença de luz. A linhagem recombinante, quando comparada à linhagem selvagem, apresentou uma melhora significativa no que se refere à produção do polímero. Como citado anteriormente, ambos os ensaios de crescimento celular demonstraram que as linhagens suplementadas com o cofator retinal sofreram certa repressão em seu desenvolvimento (Figuras 33 a 38). Em contrapartida, a linhagem recombinante cultivada em presença de retinal atingiu a maior concentração de massa seca celular, tanto em presença como ausência de luz (Figuras 39 e 40), demonstrando que, mesmo consumindo a glicose mais lentamente (Figuras 37 e 38), foi capaz de produzir uma representativa quantidade de PHB. É interessante notar que a linhagem recombinante, quando cultivada em presença de retinal, também foi aquela que apresentou as menores quantidades de consumo do polímero nas 48 horas seguintes ao pico de acúmulo (Figura 41).

A repetição da cromatografia gasosa utilizando células cultivadas sem adição de retinal também foi de grande valia. Confirmou-se que a linhagem recombinante apresenta maior capacidade de acúmulo de PHB do que a linhagem selvagem, indicando que, mesmo sem adição do cofator retinal, a bR deve estar ativa. Isto também explicaria porque o PHB produzido é consumido de maneira mais lenta pelas células recombinantes, visto que a bacteriorodopsina ativa proporciona uma via alternativa para suprir a demanda de energia da célula.

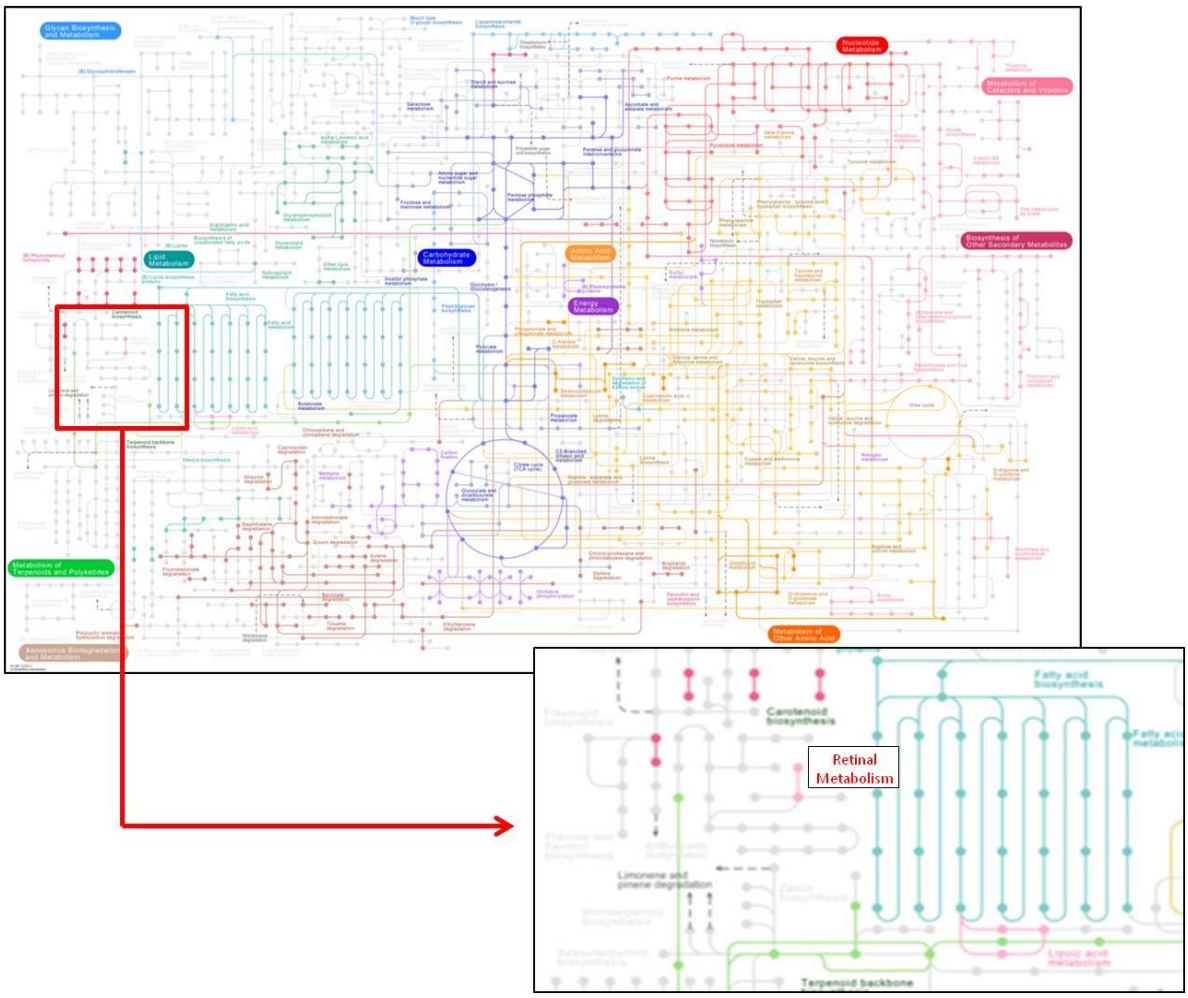
Entretanto, permanecem duas questões intrigantes:

a) Por que não é necessário adicionar o retinal para permitir a atividade da bR? Uma possível explicação seria a de que a própria *C. necator* DSMZ 545 seja capaz de sintetizar o retinal. De fato, por meio da realização de análise *in silico*, encontramos alto grau de similaridade de sequência para os genes envolvidos na via do retinal no genoma desta linhagem. Além disso, utilizando o banco de dados

KEGG, foi possível confirmar a presença da via do retinal na linhagem *C. necator* DSMZ 545, sob a sua denominação anterior (*Ralstonia eutropha* H16), como mostrado na figura 43. Se a própria linhagem já é capaz de sintetizar o retinal, talvez um excesso de retinal possa ser prejudicial ao crescimento e à produção de PHB, como observamos quando adicionamos o retinal às culturas.

b) Por outro lado, a descoberta inesperada de que a linhagem selvagem cresce melhor e acumula mais PHB quando cultivada em presença de luz (embora com menor eficiência do que a linhagem recombinante) constitui uma evidência de que a linhagem selvagem seja capaz de produzir alguma proteína com atividade semelhante à bR. A análise *in silico* não revelou nenhuma similaridade de sequência em *C. necator* DSMZ 545, nem ao nível de DNA, nem ao nível de proteína, com o gene *bop* ou a bR, respectivamente. Entretanto, encontramos 40% de similaridade (BLASTp) com a proteorodopsina de *Candidatus pelagibacter ubique* e 35% de similaridade com a proteorodopsina de *Candidatus pelagibacter* HTCC 1002, embora a similaridade de sequência de DNA tenha sido zero. Surpreendentemente, a proteína de *C. necator* DSMZ 545 assim identificada é uma integrase/recombinase.

Figura 43 – Análise *in silico* das vias metabólicas de *C. necator* DSMZ 545.



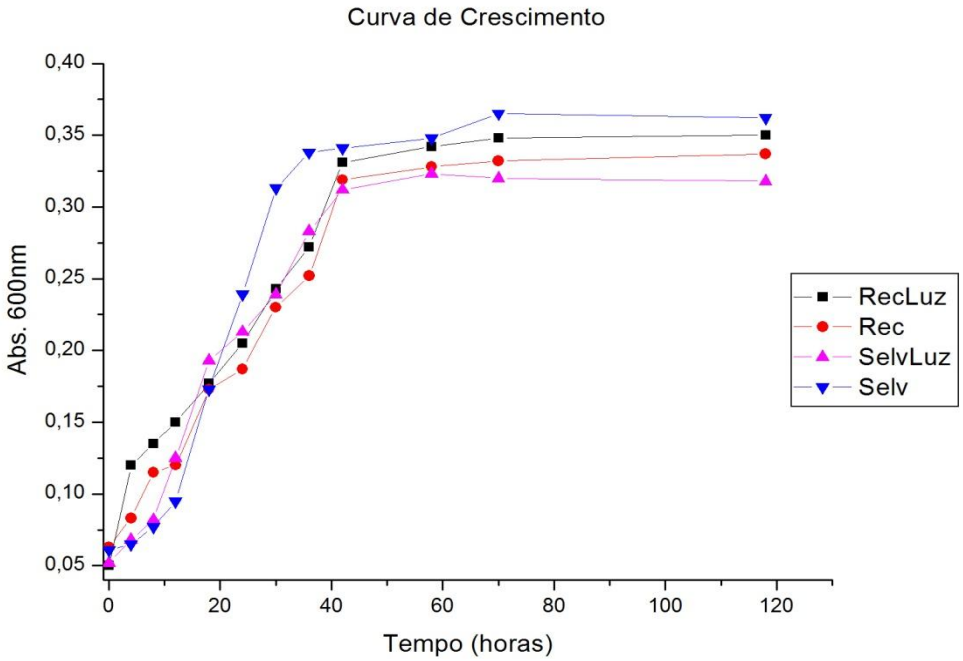
Tela do KEGG, onde é possível visualizar as vias metabólicas de *C. necator* DSMZ 545 (http://www.genome.jp/kegg/). A via em destaque representa o metabolismo do retinal.

FONTE: KANEHISA e GOTO, 2000.

4.8.2 Crescimento sem Adição de Fonte de Carbono Orgânico

A produção de ATP proporcionada pela bR pode ser utilizada por diversas vias metabólicas, sendo uma delas o Ciclo de Calvin-, existente em *C. necator*, que é um organismo quimioautotrófico (BOWIEN e KUSIAN, 2002). Por essa razão, a curva de crescimento em Meio Mineral sem qualquer fonte de carbono poderia elucidar se a expressão da bR seria capaz de influenciar diretamente no crescimento da linhagem recombinante. Como verificamos que o retinal interferiu negativamente no crescimento das culturas, decidimos não utilizar o retinal no presente experimento. Os resultados estão apresentados na figura 44.

Figura 44 - Curvas de crescimento sem adição de fonte de carbono (λ_{600nm}).



RecLuz: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em presença de luz; Rec: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em ausência de luz; SelvLuz: *C. necator* DSMZ 545 cultivada em presença de luz; Selv: *C. necator* DSMZ 545 cultivada em ausência de luz.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

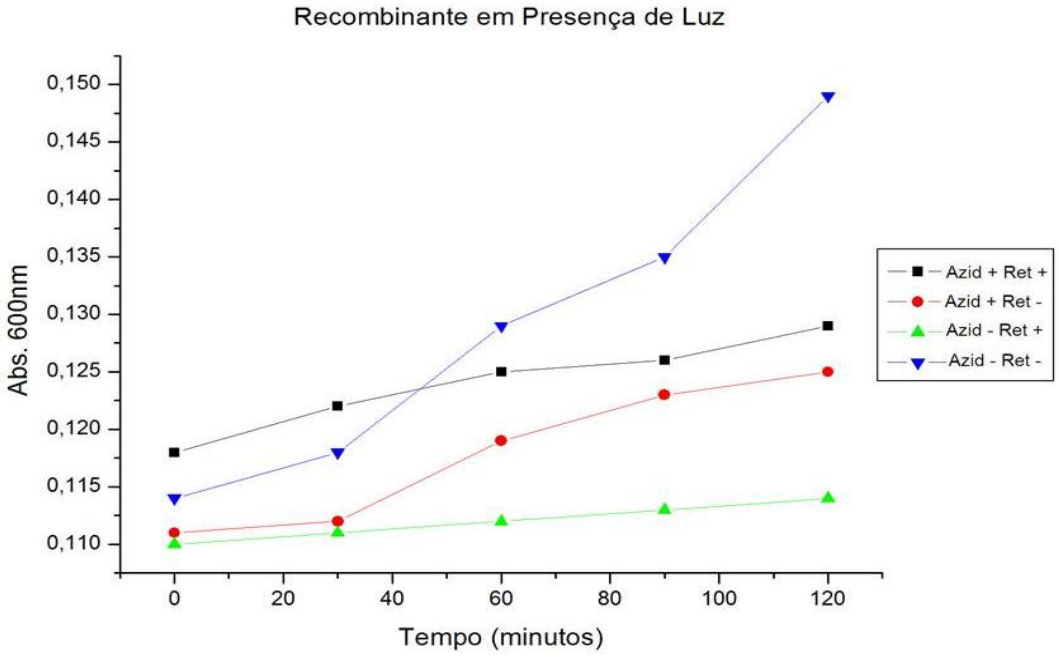
Pode-se perceber que nas primeiras 40 horas de cultivo, as linhagens demonstraram um ligeiro desenvolvimento, partindo em média de uma absorbância de 0,055 para 0,325. A partir das 40 horas, as linhagens estacionaram, indicando que este crescimento inicial provavelmente foi decorrente da glicose endógena previamente adquirida no pré-inóculo. O padrão de crescimento de ambas as linhagens, em presença de luz, foi similar, demonstrando que a linhagem recombinante não adquiriu maior capacidade de crescimento relativamente à linhagem selvagem.

4.8.3 Cultivo das Células com a Respiração Inibida

Sabe-se que a bacteriorodopsina é induzida ~50 vezes em microaerofilia (KREBS et al., 1991). Por essa razão, o presente experimento foi realizado para averiguar se haveria diferença de crescimento entre a linhagem recombinante e a selvagem, cultivadas sem adição de fonte de carbono orgânico, porém em baixas concentrações de oxigênio, de maneira a estimular a produção de ATP por meio da ação da bR. Para tal, utilizou-se azida sódica, que

inibe a respiração celular, consequentemente induzindo o metabolismo em anaerobiose, e, para estimular as células, utilizou-se luz solar, como proposto por Walter et al. (2007). Os resultados podem ser observados nos gráficos abaixo:

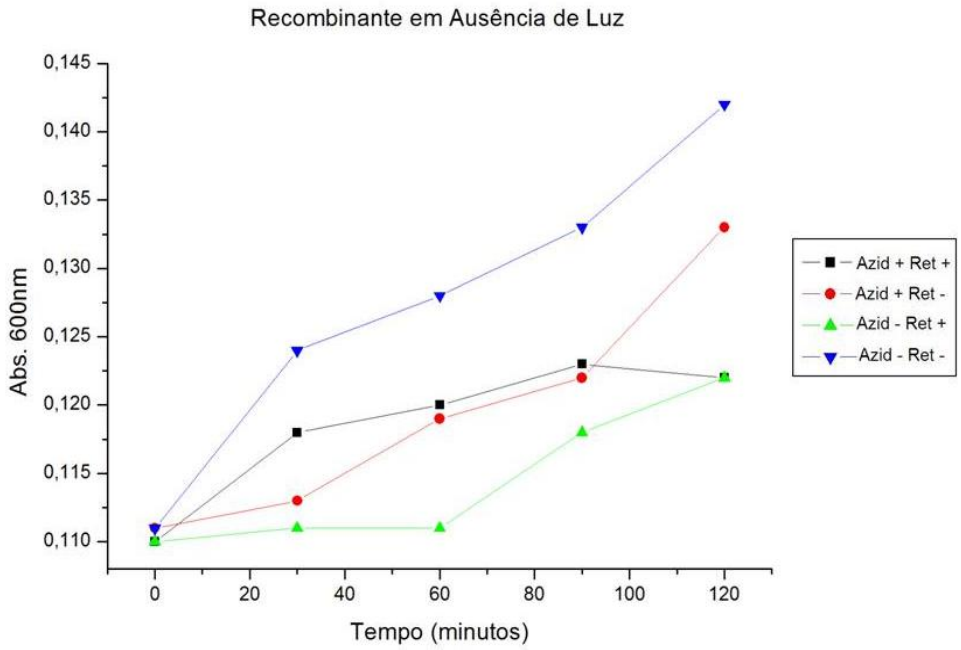
Figura 45 - Curvas de crescimento da linhagem *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em presença de luz.



Azid+: Cultivo em presença de azida sódica; Azid -: Cultivo em ausência de azida sódica; Ret +: Cultivo em presença de retinal; Ret -: Cultivo em ausência de retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

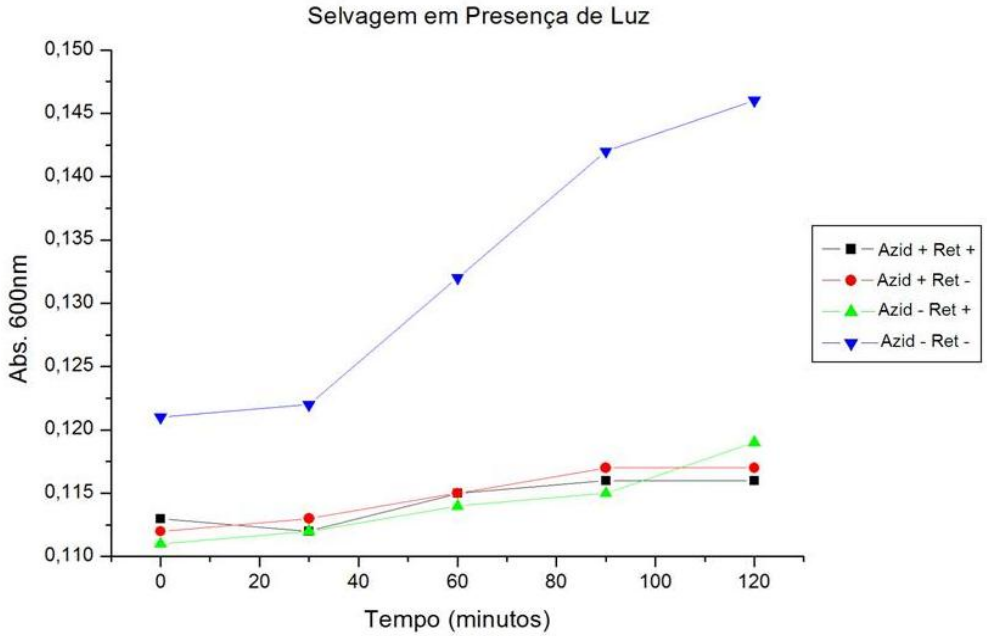
Figura 46 - Curvas de crescimento da linhagem *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em ausência de luz.



Azid+: Cultivo em presença de azida sódica; Azid -: Cultivo em ausência de azida sódica; Ret +: Cultivo em presença de retinal; Ret -: Cultivo em ausência de retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

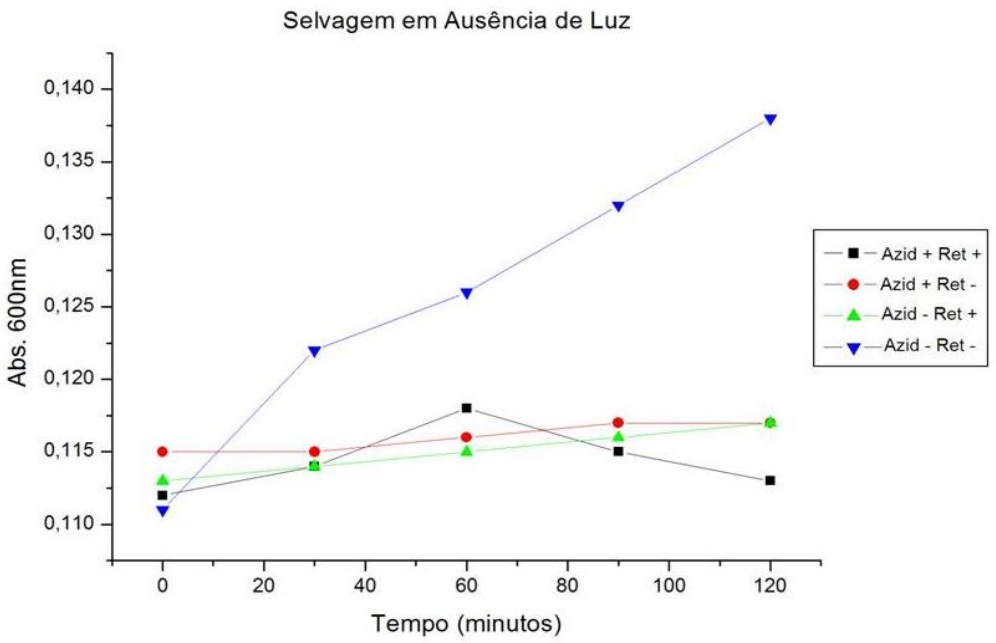
Figura 47 - Curvas de crescimento da linhagem selvagem *C. necator* DSMZ 545 cultivada em presença de luz.



Azid+: Cultivo em presença de azida sódica; Azid -: Cultivo em ausência de azida sódica; Ret +: Cultivo em presença de retinal; Ret -: Cultivo em ausência de retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Figura 48 - Curvas de crescimento da linhagem selvagem *C. necator* DSMZ 545 cultivada em ausência de luz.



Azid+: Cultivo em presença de azida sódica; Azid -: Cultivo em ausência de azida sódica; Ret +: Cultivo em presença de retinal; Ret -: Cultivo em ausência de retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como se pode observar na figura 45, em presença de luz, a linhagem recombinante, embora tenha apresentado o melhor resultado na ausência de azida sódica e retinal, aparentemente sofreu um efeito positivo da azida, que foi potencializado quando se acrescentou ao mesmo tempo o retinal. Entretanto, em ausência de luz (Figura 46), a linhagem recombinante apresentou um padrão semelhante. É interessante notar que, tanto em presença quanto em ausência de luz, o retinal exerceu uma acentuada inibição do crescimento, porém apenas quando não havia azida sódica. Como se vê nas figuras. 47 e 48, a linhagem selvagem apresentou crescimento praticamente nulo, tanto em presença como ausência de luz, quando suplementada com azida sódica ou retinal.

Pode-se concluir que o presente experimento forneceu resultado semelhante ao ensaio de curva de crescimento aeróbico em ausência de fonte de carbono orgânico. Ambas as linhagens estudadas apresentaram um desenvolvimento ínfimo, mostrando que, mesmo em condições anaeróbicas, a bR não foi capaz de fornecer a energia necessária para propiciar o crescimento celular.

Walter et al. (2007), utilizando este mesmo protocolo, foram capazes de observar aumento de movimento flagelar em células de *E. coli* portadoras do gene da proteorodopsina

(PR) de γ-proteobactéria, demonstrando que o bombeamento de prótons efetuado pela PR quando ativada pela luz pode substituir plenamente a respiração como fonte de energia para a célula. Entretanto, o efeito sobre o crescimento não foi claramente reportado por estes autores.

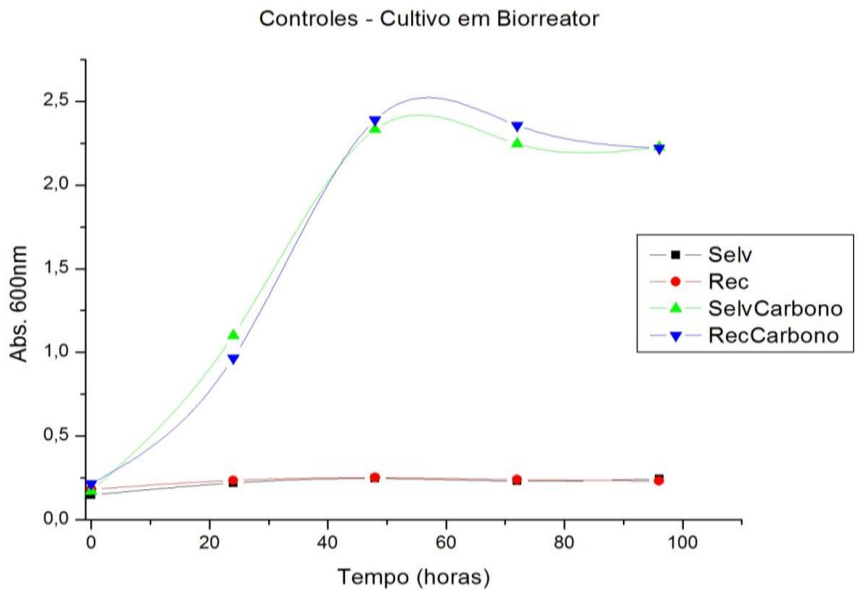
4.8.4 Cultivo das Células em Biorreator

Considerando que talvez uma razão para não termos observado melhoria do crescimento nas condições de anaerobiose (item 4.8.3.) estivesse relacionada com um baixo suprimento de CO_2, decidimos repetir o experimento em condições de microaerofilia, porém com borbulhamento de CO_2.

Para tal, foram desenvolvidos biorreatores para controlar a vazão de CO_2, assim como garantir um manuseio mais adequado dos cultivos.

Os controles foram divididos em dois grupos, presença e ausência de glicose 2%, e foram cultivados em aerobiose garantindo assim a viabilidade celular dos microrganismos utilizados para o ensaio (Figura 49). No caso do ensaio propriamente dito, as linhagens selvagem e recombinante de *C. necator* foram cultivadas em presença ou ausência de luz, utilizando apenas CO_2 como fonte de carbono, mantendo assim um ambiente de microaerofilia (Figura 50). Todas as culturas, controles e ensaio, foram suplementadas com *all-trans*-retinal 10 μM.

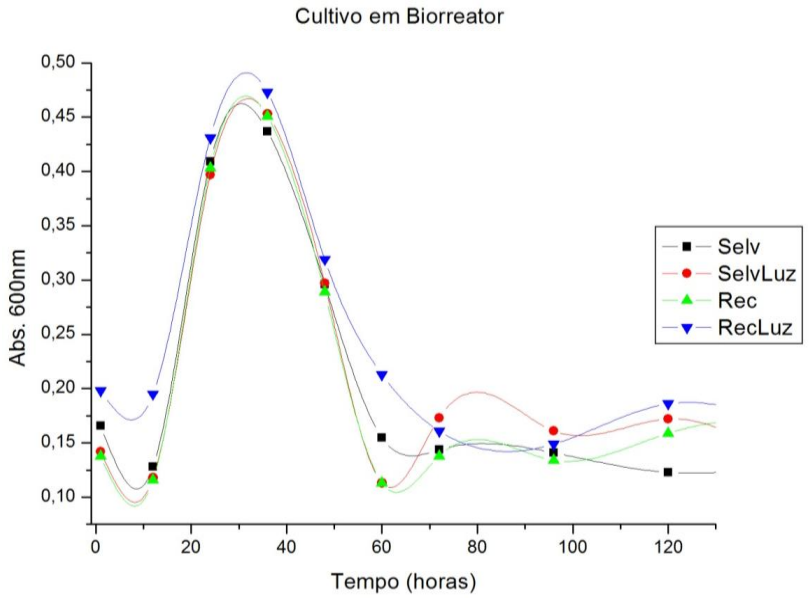
Figura 49 - Curvas de crescimento dos controles.



Selv: *C. necator* linhagem DSMZ 545 cultivada sem glicose; Rec: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada sem glicose; SelvCarbono: *C. necator* linhagem DSMZ 545 cultivada com glicose; RecCarbono: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada com glicose.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Figura 50 - Curvas de crescimento com borbulhamento de CO_2 .



Selv: *C. necator* linhagem DSMZ 545 cultivada em ausência de luz; SelvLuz: *C. necator* linhagem DSMZ 545 cultivada em presença de luz; Rec: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em ausência de luz; RecLuz: *C. necator* DSMZ 545 portadora do plasmídeo pBB-panbop cultivada em presença de luz.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como se pode observar na figura 49, as culturas-controle apresentaram o padrão esperado em ambas as condições estudadas. Os cultivos em ausência de glicose mantiveram-se com absorbância inalterada desde o início até o término do ensaio, comprovando ausência de crescimento, enquanto os cultivos em presença de glicose apresentaram a cinética de crescimento esperada, caracterizando a eficiência das células utilizadas nos biorreatores.

Como se pode observar na figura 50, até o tempo de 30 horas, o ensaio em biorreator apresentou padrão semelhante à curva de crescimento em ausência de fonte de carbono orgânico (Figura 44). Até 10 horas, os microrganismos não apresentaram qualquer alteração em termos de turbidez do meio. A partir desse ponto, verificou-se aumento da absorbância, atingindo um pico em 30 horas. Em seguida, verificou-se um decréscimo acentuado na absorbância, que voltou aos valores iniciais do experimento. Entretanto, não houve diferença de comportamento entre as duas linhagens, selvagem e recombinante, seja em presença, seja em ausência de luz, comprovando os resultados anteriores, de que a expressão da bR não é capaz de auxiliar no crescimento, nem mesmo em microaerofilia e suprimento adequado de CO_2 como fonte de carbono.

Uma amostra foi retirada de cada cultura de 48 horas, a fim de constatar a pureza do cultivo, assim como confirmar a morfologia das colônias de *C. necator*. Tal alíquota foi utilizada (100 μL) para inocular placas contendo meio mineral Ramsay sólido, e após 24 horas de incubação as colônias foram analisadas, não tendo sido observado nenhum tipo de contaminação.

É interessante notar que, em nenhum dos trabalhos da literatura que procuraram mostrar os efeitos biológicos da PR heteróloga clonada em *E. coli*, foi possível demonstrar um efeito sobre o crescimento celular (MARTINEZ et al., 2007; WALTER et al., 2007), embora tenha ficado demonstrado que, sob iluminação, a PR ativa a fotofosforilação, quando o gene da pR está presente em alto número de cópias em *E. coli* (MARTINEZ et al., 2007). Além disso, em bactérias marinhas que produzem PR, tampouco se observou efeito da luz sobre o crescimento (STINGL et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2008). Também não foi encontrado nenhum incremento no crescimento (velocidade de crescimento ou máximo rendimento de células), por ação da luz em *Pelagibacter ubique*, uma bactéria naturalmente produtora da PR, que contém 10.000 moléculas de PR/célula, ocupando cerca de 20% da área de superfície da membrana (GIOVANNONI et al., 2005). Assim, ainda não está perfeitamente elucidado qual é o papel que a PR desempenha no metabolismo celular das bactérias naturalmente produtoras. Uma ideia corrente é de que a PR deva atuar somente em condições de carência

nutricional. De fato, foi descrita uma flavobactéria marinha, produtora natural de PR, que, em presença de luz, apresenta taxa de crescimento mais elevada, porém somente quando cultivada sob condições de limitação de energia (GÓMEZ-CONSARNAU et al., 2007). Outra evidência nesse sentido consiste no fato de que uma linhagem de *Vibrio* sp produtora de PR apresentou, sob efeito da luz, maior sobrevivência à carência nutricional (GÓMEZ-CONSARNAU et al., 2010).

Recentemente, foi demonstrado que a expressão da PR heteróloga na bactéria *Shewanella oneidensis* permitiu que, quando crescidas sob iluminação, as células sobrevivessem por extensos períodos na fase estacionária, além de apresentarem um aumento na sua capacidade de geração de eletricidade, característica desta bactéria (JOHNSON et al., 2010). Em outro trabalho recente, utilizando *Pelagibacter ubique* (STEINDLER et al., 2011), foi verificado que o conteúdo de ATP/célula aumenta nas células em fase estacionária após iluminação, proporcionalmente ao tempo em que entraram em fase estacionária. Em outras palavras, a contribuição da PR ao balanço energético total das células aumenta à medida que aumenta o período de carência. Tais resultados sustentam a ideia de que as células em carência nutricional, quando iluminadas, sobrevivem por meio da substituição da respiração pela produção de ATP mediada pela PR (STEINDLER et al., 2011). Os nossos resultados estão de acordo com esses recentes relatos da literatura, que tampouco verificaram efeito da PR nas células em fase logarítmica de crescimento, mas apenas na fase estacionária ou outras condições de carência nutricional. Por outro lado, considerando que o acúmulo de PHB só ocorre em condições de carência nutricional, fica mais fácil entender que tenhamos encontrado um aumento da produção de PHB em *C. necator* sob efeito da luz.

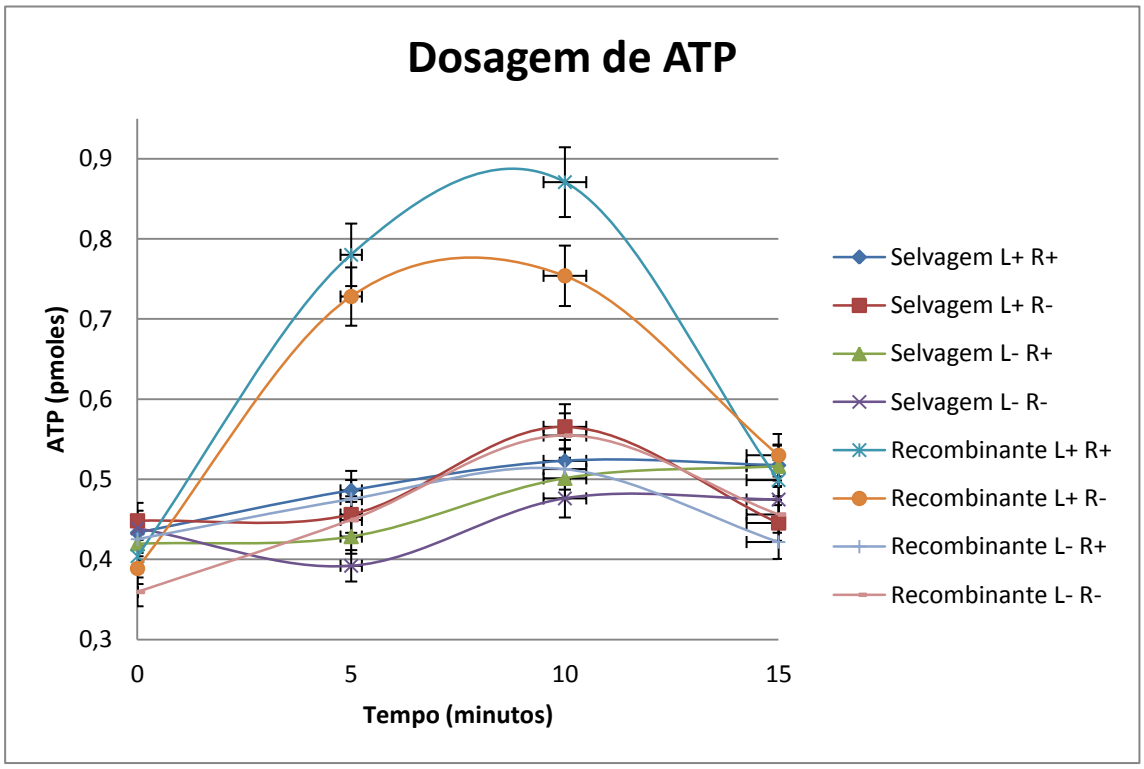
Entretanto, para compreender melhor o fenômeno de ativação da produção de PHB pela luz, que descobrimos no presente trabalho, seria necessário realizar uma análise molecular mais aprofundada. Uma análise de transcrição por micro-arrays permitiria esclarecer se, por exemplo, o gene da PHB sintase é mais ativamente transcrito quando as células são cultivadas sob iluminação do que em ausência de luz.

De fato, num trabalho recente (STEINDLER et al., 2011), foi verificado que o transcriptoma de *Pelagibacter ubique* foi significativamente alterado pela luz, quando a bactéria se encontrava em carência nutricional.

4.8.5 Efeito sobre a Produção de ATP pelas Células

O mecanismo de ação da bR já foi elucidado há mais de três décadas, quando ficou demonstrado que a bR, sob o efeito da luz, funciona como uma bomba de prótons, formando um gradiente de prótons através da membrana celular, que pode ser utilizado para a síntese de ATP, por ação do complexo da ATP sintase (OESTERHELT e STOECKENIUS, 1973; DANON e STOECKENIUS, 1974). Mais recentemente, este mecanismo também foi verificado para uma proteorodopsina heteróloga expressa em células de *E. coli* (MARTINEZ et al., 2007; SLAMOVITS et al., 2011). Estes autores demonstraram que, sob efeito da luz, a linhagem recombinante apresentou maior produção de ATP que a linhagem selvagem. Decidimos, portanto examinar a capacidade de produção de ATP pela linhagem recombinante de *C. necator* construída neste trabalho. Para monitorar a produção de ATP pelas linhagens de *C. necator*, a selvagem e a recombinante capaz de expressar a bR em sua membrana, adotamos o procedimento descrito por Martinez et al. (2007). Os resultados estão apresentados na figura 51.

Figura 51 - Cinética de produção de ATP pelas diferentes linhagens.



Selvagem L+ R+: *C. necator* DSMZ 545 em presença de luz e retinal; Selvagem L+ R-: *C. necator* DSMZ 545 em presença de luz e ausência de retinal; Selvagem L- R+: *C. necator* DSMZ 545 em ausência de luz e presença de retinal; Selvagem L- R-:*C. necator* DSMZ 545 em ausência de luz e de retinal; Recombinante L+ R+: *C. necator* DSMZ 545/pBBpanbop em presença de luz e retinal; Recombinante L+ R-: *C. necator* DSMZ 545/pBBpanbop em presença de luz e ausência de retinal; Recombinante L- R+: *C. necator* DSMZ 545/pBBpanbop em ausência de luz e presença de retinal; Recombinante L- R-: *C. necator* DSMZ 545/pBBpanbop em ausência de luz e de retinal.

FONTE: MARQUEZONI, 2011.

Como pode ser observado na figura 51, com exceção da linhagem recombinante em presença de luz, todos os demais cultivos apresentaram padrão de produção de ATP muito semelhante, demonstrando alteração negligível na quantidade de ATP produzido no intervalo de 15 minutos.

Em relação à linhagem selvagem, ambos os cultivos da linhagem recombinante em presença de luz (com ou sem a presença de retinal) demonstraram um aumento significativo na produção de ATP, desde o início da iluminação (tempo 0) até 10 minutos. Também se pode observar que a presença de retinal favoreceu a produção de ATP pela linhagem recombinante, quando iluminada. Após 10 minutos de iluminação em presença de retinal, a linhagem de *C. necator* portadora do plasmídeo recombinante pBBpanbop apresentou concentração intracelular de ATP 1,7 vezes maior do que a linhagem selvagem. Os cultivos

realizados apenas com iluminação também apresentaram maior concentração intracelular de ATP na linhagem recombinante, porém em escala ligeiramente menor (1,3 vezes).

A concentração mínima de ATP produzida pelas células foi observada na linhagem selvagem cultivada em ausência de luz e retinal (0,392 pmoles). Por sua vez, a linhagem recombinante, quando em presença de luz e de retinal, apresentou um aumento de 2,2 vezes de ATP intracelular (0,871 pmoles), em relação à condição de não-iluminação. Em presença de luz, sem a adição do cofator retinal, a linhagem recombinante também apresentou aumento em relação à não iluminada, porém na proporção de 1,9 vezes (0,754 pmoles).

Considerando que a linhagem selvagem de *C. necator*, mesmo em presença de luz e suplementada com o cofator retinal, não apresentou qualquer alteração em termos de concentração intracelular de ATP, é possível concluir que a bR expressa na membrana da linhagem recombinante realmente exerce uma importante função biológica neste microrganismo.

Este é um resultado inédito, uma vez que tal efeito de fotofosforilação só havia sido descrito até hoje para *E. coli* expressando a proteorodopsina (MARTINEZ et al., 2007).

5 CONCLUSÕES

- A análise da expressão da proteína verde fluorescente em *C. necator*, conferida pelos dois plasmídeos escolhidos para o presente trabalho, pLEGP e pBBpanEGFP, mostrou que o clone hospedando o vetor pBBpanEGFP apresentou intensidade de fluorescência 10,6 vezes maior do que o clone hospedando o vetor pLEGP. Além disso, foi verificado que a expressão da EGFP a partir do plasmídeo pBBpanEGFP pode ainda ser induzida pelos íons metálicos Fe^{2+} e Mn^{2+};
- O gene *bop*, que codifica a bacteriorodopsina, foi obtido por meio de PCR utilizando como molde o DNA total de *H. salinarum* R1;
- A análise *in silico* utilizando padrões de preferência de códons, mostrou que, em comparação com *B. subtilis* e *E. coli*, *C. necator* possui maior probabilidade de expressar a bacteriorodopsina, tendo alcançado um valor suficiente de índice adaptativo (2,6) para garantir uma boa expressão;
- Foi realizada com sucesso a clonagem do gene *bop* de *H. salinarum* RI no vetor pBBpanEGFP, sob o comando do promotor pan, originando o plasmídeo pBBpanbop;
- A análise das proteínas totais, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, revelou a presença de uma banda de 28 kDa, tamanho coincidente ao da bacteriorodopsina, no clone transformante *C. necator*/pBBpanbop, fato não observado na linhagem não transformada;
- A análise por SDS-PAGE das amostras fracionadas, confirmou a presença da banda de 28 kDa na membrana externa do clone recombinante de *C. necator*, confirmando a expressão e também a correta localização da proteína heteróloga;
- Foram analisadas diferentes condições de crescimento, entretanto não se verificou um efeito considerável da presença da bR sobre o crescimento celular na linhagem recombinante;
- Foi constatado que ambas as linhagens, selvagem e recombinante, possuem maior capacidade de acumular PHB quando cultivadas em presença de luz, embora a linhagem recombinante tenha apresentado uma melhor eficiência de produção.
- A análise da produção de ATP em presença de luz revelou um efeito considerável na linhagem recombinante relativamente à selvagem, demonstrando o efeito biológico da expressão da bR.

6 REFERÊNCIAS*

ABIPLAST – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO. **Análise estatística de 2010**: ABIPLAST, 2010 <**http://www.abiplast.org.br/upload/File/2011/PERFIL_2010.pdf**>**;** Acessado em 13/01/2012.

ABIQUIM – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA E DE PRODUTOS DERIVADOS. **Plásticos em foco:** ABIQUIM, 1997.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Ocurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.,** v. 54**,** p.450-472, 1990.

BALDWIN, J. M.; SCHERTLER, G. F.; UNGER, V. M. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. **J. Mol. Biol.,** v.272, p.144-164, 1997.

BEAULIEU, M.; GOULET, J.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutirate. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.61**,** p.165-169, 1995.

BÉJÀ, O.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V.; SUZUKI, M. T.; HADD, A.; NGUYEN, L. P.; JOVANOVICH, S. B.; GATES, C. M.; FELDMAN, R. A.; SPUDICH, J. L.; SPUDICH, E. N.; DELONG, E. F. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. **Science.**, v.289, p.1902-1906, 2000.

BÉJÀ, O.; SPUDICH, E. N.; SPUDICH, J. L.; LECLERC, M.; DELONG, E. F. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. **Nature.,** v.411, p.786-789, 2001.

BIESZKE, J. A.; BRAUN, E. L.; BEAN, L. E.; KANG, S.; NATVIG, D. O.; BORKOVICH, K. A.The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to *Archaeal* rhodopsins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.96, p.8034-8039, 1999a

BIESZKE, J. A.; SPUDICH, E. N.; SCOTT, K. L.; BORKOVICH, K. A.; SPUDICH, J. L. A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an *Archaea*l rhodopsin-like photochemically reactive pigment. **Biochemistry,** v.38, p.14138-14145, 1999b

BIONDO, R. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para a biorremediaçãode efluentes contendo metais pesados**. 2008. 206 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BOWIEN, B.; KUSIAN, B. Genetics and control of CO_2 assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. **Arch. Microbiol.,** v.178, p.85-93, 2002

BROCK, T. D.; PETERSEN, S. Some effects of light on the viability of rhodopsin-containing halobacteria. **Arch. Microbiol.,** v.109, p.199-200, 1976.

CERCIGNAMI, G.; LUCIA, S.; PETRACCHI, D. Photoresponses of *Halobacterium salinarum* to repetitive pulse stimuli. **Biophys. J.,** v.75, p.1466–1472, 1998.

CHECHETKIN, V. R. Genetic code from tRNA point of view. **J. Theor. Biol.,** v.242, p.922-934, 2006.

*De acordo com:
International Commitee of Medical Journal Editors, Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Avaiable from: http://www.icmje.org[2007 May 22].

CHEN, C. C., WEI, C. C., SUN, Y. C., CHEN, C.M. Packing of transmembrane helices in bacteriorhodopsin folding: Structure and thermodynamics. **J. Struct. Biol.,** v.162, p.237–247, 2008.

DALCATON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos.** 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

DANON, A.; STOECKENIUS, W. Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.71, p.1234-1238, 1974.

FALB, M.; MÜLLER, K.; KÖNIGSMAIER, L.; OBERWINKLER, T.; HORN, P.; VON GRONAU, S.; GONZALEZ, O.; PFEIFFER, F.; BORNBERG-BAUER, E.; OESTERHELT, D. Metabolism of halophilic *Archaea*. **Extrem.,** v.12, p.177–196, 2008.

FAVA, A. L. B. **Clonagem e expressão do regulon-*scr* em *Alcaligenes eutrophus* visando a produção de poli-hidroxibutirato a partir de sacarose.** 1997. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FUGLSANG, A. The effective number of codons for individual amino acids: some codons are more optimal than others. **Gene,** v.320, p.185-190, 2003.

FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** v.49, p.333-336, 1998.

GIOVANNONI, S. J.; BIBBS, L.; CHO, J. C.; STAPELS, M. D.; DESIDERIO, R.; VERGIN, K. L.; RAPPE, M. S.; LANEY, S.; WILHELM, L. J.; TRIPP, H. J.; MATHUR, E. J.; BAROFSKY, D. F. Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. **Nature,** v.438, p.82-85, 2005.

GOHON, Y. Bacteriorhodopsin/Amphipol Complexes: Structural and Functional Properties. **Biophys. J.,** v.94, p.3523–3537, 2008.

GÓMEZ-CONSARNAU, L.; GONZALEZ, J. M.; COLL-LLADO, M.; GOURDON, P.; PASCHER, T.; NEUTZE, R.; PEDROS-ALIO, C.; PINHASSI, J. Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine Flavobacteria. **Nature,** v.445, p.210-213, 2007.

GÓMEZ-CONSARNAU, L.; AKRAM, N.; LINDELL, K.; PEDERSEN, A.; NEUTZE, R.; MILTON, D. L.; GONZALEZ, J. M.; PINHASSI, J**.** Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation. **PLoS. Biol.,** v.8, n.4, p.1-10 , 2010.

GONZÁLEZ, J. M.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, B.; FERNÁNDEZ-GUERRA, A.; GÓMEZ-CONSARNAU, L.; SÁNCHEZ, O., et al. Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.105, p.8724–8729, 2008.

GONZALEZ, O.; GRONAU, S.; FALB, M.; PFEIFFER, F.; MENDOZA, E.; ZIMMER, R.; OESTERHELT, D. Reconstruction, modeling & analysis of *Halobacterium salinarum* R-1 metabolism. **Mol. Biosyst.,** v.4, p.148–159, 2008.

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. A. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. **Biomacro.,** v.10, p.660-669, 2009.

GROTE, A.; KARSTEN, H.; SCHEER, M.; MÜNCH, R.; NÖRTEMANN, B.; HEMPEL, D.C.; JAHN, D. JCAT: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. **Nucleic. Acids. Res.,** v.33, p.526–531, 2005.

HARTMANN, R.; OESTERHELT, D. Bacteriorhodopsin-mediated photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. **Eur. J. Biochem.,** v.77, p.325–335, 1977.

HAUPTS, U.; TITTOR, J.; OESTERHELT, D. Closing on Bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.,** v.28, p.367–399, 1999.

HENRY, I.; SHARP, P. M. Predicting gene expression level from codon usage bias. **Mol. Biol. Evol.,** v.24, p.10-12, 2007.

HILDEBRANDT, V.; FENDLER, K.; HEBERLE, J.; HOFFMANN, A.; BAMBERG, E.; BÜLDT, G. Bacteriorhodopsin expressed in *Schizosaccharomyces pombe* pumps protons through the plasma membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.90, p.3578-3582, 1993.

HOFFMANN, A.; HILDEBRANDT, V.; HEBERLE, J.; BÜLDT, G. Photoactive mitochondria: *In vivo* transfer of a light-driven proton pump into the inner mitochondrial membrane of *Schizosaccharomyces pombe*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.91, p.9367-9371, 1994.

ISHIZAKI, A.; TANAKA, K.; TAGA, N. Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO2. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** v.57, p.6–12, 2001.

JOHNSON, E. T.; BARON, D. B.; NARANJO, B.; BOND, D. R.; SCHMIDT-DANNERT, C.; GRALNICK, J. A. Enhancement of survival and electricity production in an engineered bacterium by light-driven proton pumping**. Appl. Environ. Microbiol.,** v.76, p.4123–4129, 2010.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic. Acids. Res.,** v. 28, n.1, p.27-30, 2000.

KAMO, N. T.; HASHIBA, T.; KIKUKAWA, T.; ARAISO, K.; IHARA, 1.; NARA, T**.** A light-driven proton pump from *Haloterrigena turkmenica*: Functional expression in *Escherichia coli* membrane and coupling with a H+ co-transporter**. Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v.341, p.285-290, 2006.

KARNIK, S.; DOI, T.; MOLDAY, R.; KHORANA, H. G. Expression of the archaebacterial bacterio-opsin gene with and without signal sequences in *Escherichia coli*: The expressed proteins are located in the membrane but bind retinal poorly. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.87, p.8955-8959, 1990.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalcanoates. **Proc. Bioch.,** v.40, p.607-619, 2005.

KIM, B. S. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enz. Micro. Tech.,** v.27, p.774-777, 2000.

KOLLER M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. **Biomacro.,** v.6, p.561-565, 2005.

KOVACH, M.E.; PHILLIPS, R. W.; ELZER, P. H.; ROOP, R. M.; PETERSON, K. M. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotech.,** v.16, p.800, 1994.

KREBS, M. P.; HAUSS, T.; HEYN, M. P.; RAJBHANDARY, U. L.; KHORANA, H. G. Expression of the bacterioopsin gene in *Halobacterium halobium* using a multicopy plasmid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.88, p.859-863, 1991.

LANG-HINRICHS, C.; QUECK, I.; BÜLDT, G.; STAHL, U.; HILDEBRANDT, V. The archaebacterial membrane protein bacterio-opsin is expressed and N-terminally processed in the yeast *Saccharomyces cerevisae*. **Mol. Gen. Genet.,** v.244, n.2, p.183-188, 1994.

LANYI, J. K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. **Bioch. Bioph.,** v.1757, p.1012-1018, 2006.

LEE, S. Y.; CHOI, J.; WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxybutyrate production by bacterial fermentation: mini-review. **Inter. J. Biol. Macro.,** v.25, p.31-36, 1999.

LONDON, E.; KHORANA, H. G. Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures. **J. Biol. Chem.,** v.257, p.7003-7011, 1982.

MADIGAN M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**.. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MADISON, L. L.; HUISMAN G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. **Microbiol. Mol. Biology. Rev.,** v.63, p.21–53, 1999.

MAKKAR, N. S.; CASIDA, L. E. *Cupriavidus necator* en-nov, sp-nov – a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. **Int. J. Syst. Bac.,** v.47, p.323-326, 1987.

MARTINEZ, A.; BRADLEY, A. S.; WALDBAUER, J. R.; SUMMONS, R. E.; DeLONG, E. F. Proteorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,** v.104, n.13, p.5590-5595, 2007.

MOORE, R. L., McCARTHY, B. J. Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halofilic bacteria. **J. Bacteriol.,** v.99, p.248-254, 1969.

NAGEL, G.; MÖCKEL, B.; BÜLDT, G.; BAMBERG, E. Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H + pumping. **FEBS Lett.,** v.377, p.263-266, 1995.

OESTERHELT, D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic *Archaea*. **Curr. Opin. Struct. Biol.,** v.8, p.489-500, 1998**.**

OESTERHELT, D.; STOECKENIUS, W. Functions of a new photoreceptor membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.70, p.2853-2857, 1973.

PFEIFFER, F.; SCHUSTER, S. C.; BROICHER, A.; FALB, M.; PALM, P.; RODEWALD, K.; RUEPP, A.; SOPPA, J.; TITTOR, J.; OESTERHELT, D. Evolution in the laboratory: The genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1. **Genomics,** v.91, p.335-346, 2008.

POHLMANN, A.; FRICKE, W. F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; EWERING, C.; POTTER, M.; SCHWARTZ, E.; STRITTMATTER, A.; VOB, I.; GOTTSCHALK, G.; STEINBÜCHEL, A.; FRIEDRICH, B.; BOWIEN, B. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature Biotech.,** v.25, p.472-478, 2006.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório Técnico: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, São Paulo, 2006.

QUADROS, O. F. **Construção de biossensor bacteriano para detecção de mercúrio**. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

RACKER, E.; STOECKENIUS, W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. **J. Biol. Chem.,** v.249, p.662-663, 1974.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHEVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. Production of poly-β-hydroxybutyric-co- β-hydroxyvaleric acids. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.56, p.2093–2098, 1990.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **J. Biol. Macromol.,** v.25, p.3-19, 1999.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; BIONDO, R.; QUADROS, O. F.; VICENTE, E. J.; SCHENBERG, A. C. G. A metal-repressed promoter from gram-positive *Bacillus subtilis* is highly active and metal-induced in gram-negative *Cupriavidus metallidurans*. **Biotech. Bioeng.,** v.107, p.469-477, 2010.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly-3-hydroxybutyric acid in microbial biomass-esther hydroxychloric acid propanolysis. **J. Chromatog.,** v.445, p.285-289, 1988.

RUSENDI, D.; SHEPPARD, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly-b-hydroxybutyrate. **Biores. Tech.,** v.54, p.191-196, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning:** a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1448p.

SARTORI, D. M. **Obtenção de um mutante de *Alcaligenes eutrophus* melhorado geneticamente para a produção do co-polímero polihidroxibutirato-polihidroxivalerato (PHB-PHV).** 1998. 112 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SCHÄTZLER, B.; DENCHER, N. A.; TITTOR, J.; OESTERHELT, D.; YANIV-CHECOVER, S.; NACHLIEL, E.; GUTMAN, M. Subsecond proton-hole propagation in bacteriorhodopsin. **Bioph. J.,** v.84, p.671-686, 2003.

SCHLEGEL, H. G.; GOTTSCHALK, G. Verwertung von Glucose durch eine Mutante von Hydrogenomonas H 16, **Biochem. Z,** v.341, p.249-259, 1965.

SLAMOVITS, C.H.; OKAMOTO, N.; BURRI, L.; JAMES, E.R.; KEELING, P.J; A bacterial proteorhodopsin proton pump in marine eukaryotes. **Nature Comm.,** v.2, p.1-6, 2011.

STEINDLER, L.; SCHWALBACH, M. S.; SMITH, D. P.; CHAN, F.; GIOVANNONI, S. J. Energy Starved *Candidatus* Pelagibacter Ubique Substitutes Light-Mediated ATP Production for Endogenous Carbon Respiration. **PLoS ONE,** v.6, n.5, p.1-10, 2011.

STOECKENIUS, W.; ROWEN, R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. **J. Cell Biol**., v. 34, p.365-393, 1967.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends Biotechnol.,** v.16, p.419-27, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; LUTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biothecnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biotech. Eng. J.,** v.16, p.81-96, 2003.

STEINBÜCHEL, A; VALENTIN; H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **Microbiol. Lett.,** v.128, p.219-228, 1995.

STINGL, U.; DESIDERIO, R. A.; CHO, J. C.; VERGIN, K. L.; GIOVANNONI, S. J. The SAR92clade: an abundant coastal clade of culturable marine bacteria possessing proteorhodopsin. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.73, p.2290–2296, 2007.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T4 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.,** v.79, p.237-248, 1973.

TAGHAVI, S.; VAN-DER-LELIE, D.; MERGEAY, M. Electroporation of *Alcaligenes eutrophus* with (mega) plasmids and genomic DNA fragments. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.60, p.3585-3591, 1994.

VEIGA, E.; LORENZO, V.; FERNANDEZ, L. A. Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. **Mol. Microbiol.,** v.33, p.1232-1243, 1999.

WALTER, J. M.; GREENFIELD, D.; BUSTAMANTE, C.; LIPHARDT, J. Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.104, p.2408-2412, 2007.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Ocurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug. Deliv. Rev.,** v.53, p.5-21, 2001.