

  
UNESP  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE  
ADESÃO DO *Acidithiobacillus ferrooxidans* EM  
CALCOPIRITA (CuFeS<sub>2</sub>)**

Aluna: Diana Marcela Ossa Henao

Orientador: Dr. Oswaldo Garcia Jr. (IQ - UNESP)

Colaboradora: Dra. Laura M. Mariscal Ottoboni (CBMEG–UNICAMP)

Araraquara, SP 2010

**DIANA MARCELA OSSA HENAO**

**ESTUDO DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE  
ADESÃO DO *Acidithiobacillus ferrooxidans* EM  
CALCOPIRITA (CuFeS<sub>2</sub>)**

Tese apresentada ao instituto de  
Química, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor  
em Biotecnologia.

**Orientador: Dr. Oswaldo Garcia Jr.**

**Colaboradora: Dra. Laura M. Mariscal Ottoboni.**

FICHA CATALOGRÁFICA

H493e Diana Marcela Ossa Henao  
Estudo de genes envolvidos no processo de adesão do *Acidithiobacillus ferrooxidans* em calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>) / Diana Marcela Ossa Henao. – Araraquara : [s.n], 2010  
150 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Oswaldo Garcia Junior  
Coorientador: Denise Bevilaqua

1. Biotecnologia. 2. Biolixiviação. 3. Caracterização biofísica.  
4. Proteína ligante de cluster Fe-S. I. Título.

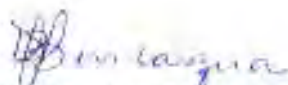
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara  
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

## DIANA MARCELA OSSA HENAO

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 26 de julho de 2010.

### BANCA EXAMINADORA




Dr<sup>a</sup> Denise Bevilaqua (Co-orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



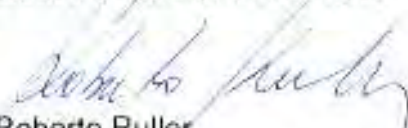
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Célia Bertolini  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Lucio Fábio Caldas Ferraz  
Universidade de São Francisco – USF, Bragança Paulista



Dr<sup>a</sup> Fabiana Alexandrino  
Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, Campinas



Dr. Roberto Ruller  
Centro de Tecnologia do Bioetanol – ABTLuS, Campinas

*Dedico este trabalho a minha família,  
Minha querida e amada filhinha Natasha  
Inspiração da minha vida.  
Ao meu esposo Jimmy pelo grande amor, amizade, carinho e ajuda.  
A minha mãe e meu irmão pela afeição e apoio.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Dr. Oswaldo Garcia Jr. e a Dra. Laura Ottoboni pela orientação, confiança e oportunidade oferecida.

A Dra. Denise Bevilaqua, pela ajuda e favores realizados.

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos amigos do laboratório do CBMEG/UNICAMP pela ajuda técnica e afetiva.

A Viviane Drumond, pelo companheirismo e amizade sincera.

A Susy Ferraz, pelo companheirismo e ajuda no começo deste trabalho.

A Ana Paula Felício, pela experiência compartilhada e ajuda incondicional.

A Fernanda e Fabiana pela ajuda e orientação.

A Renata Rocha pela amizade incondicional, orientação e ajuda imensa na última fase deste trabalho.

## INDICE

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xix
RESUMO .....	xx
ABSTRACT .....	xxii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Biolixiviação de Minérios .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Mecanismo de adesão .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Mecanismo de formação de pilus tipo IV .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Genes selecionados envolvidos na adesão .....</b>	<b>14</b>
1.5.1 Genes Tad .....	14
1.5.2 Genes que codificam Pilinas Tipo IV.....	15
1.5.3 Genes que codificam proteínas ligantes de <i>cluster</i> Fe-S.....	15
1.5.4 MsrA, metionina-S-sulfóxido redutase, subunidade A .....	16
<b>1.6. Proteínas com potencial biotecnológico .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>20</b>

2.2.1. Análise da expressão de genes envolvidos no mecanismo de adesão em <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> LR na presença de calcopirita por PCR em tempo real.....	20
2.2.2. Caracterização da proteína recombinante pertencente à família de cluster Fe-S codificada pelo gene no locus <i>Afe_0551</i> por métodos biofísicos.....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Amostra mineral e cultivo da bactéria .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Análise de bioinformática .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Isolamento de RNA e síntese da primeira fita de cDNA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Análise da expressão dos genes através de PCR em tempo real .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5. Clonagem, expressão e purificação da proteína codificada pelo gene no locus <i>Afe_0551</i> .....</b>	<b>27</b>
3.5.1 Extração de DNA genômico .....	27
3.5.2 Amplificação do gene de interesse .....	27
3.5.3 Clonagem no vetor de expressão pET28a .....	28
3.5.4 Preparação de células competentes .....	29
3.5.5 Transformação .....	39
3.5.6 Confirmação da presença de clones positivos .....	30
3.5.7 Seqüenciamento dos clones .....	32
3.5.8 Testes de expressão protéica .....	32
3.5.9 Análise das amostras em gel de poliacrilamida 15%.....	33
3.5.10 Expressão da proteína em larga escala .....	34
3.5.11 Purificação .....	34
3.5.12 Extração de corpos de inclusão .....	35
<b>3.6. Medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....</b>	<b>35</b>



<b>3.7. Espectrometria de massa.....</b>	<b>36</b>
<b>3.8. Medidas de UV- Visível.....</b>	<b>36</b>
<b>3.9. Experimentos de dicroísmo circular .....</b>	<b>37</b>
<b>3.10. Experimentos de desnaturação térmica.....</b>	<b>39</b>
<b>3.11. Experimentos de desnaturação química.....</b>	<b>39</b>
<b>3.12. Experimentos de fluorescência.....</b>	<b>40</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Análise de bioinformática .....</b>	<b>41</b>
4.1.1 Genes <i>tad A</i> , B e C .....	41
4.1.2 Genes Pilinas e pilus tipo IV .....	44
4.1.2.1 Locus Afe_2078 .....	44
4.1.2.2 Locus Afe_2301 .....	45
4.1.2.3 Genes PilT 1-2, Loci Afe_2763 e Afe_2764 .....	46
4.1.2.4 Gene <i>mrsA</i> , locus Afe_0163 .....	47
4.1.3 Genes <i>cluster Fe-S</i> .....	49
4.1.3.1 Locus Afe_0350.....	49
4.1.3.2 Locus Afe_0547 .....	50
4.1.3.3 Locus Afe_0551 .....	50
<b>4.2. Análise da expressão dos genes por PCR em tempo real .....</b>	<b>53</b>
4.2.1 Células livres após 1 e 20 dias de incubação com calcopirita .....	53
4.2.2 Células livres e aderidas após 2 h de incubação com calcopirita (inoculo obtido com 60% de oxidação de Fe <sup>2+</sup> ) .....	57
4.2.3 Células livres e aderidas após 2 h de incubação com calcopirita (inoculo obtido com 80% de oxidação de Fe <sup>2+</sup> ) .....	60

<b>4.3. Expressão, purificação e caracterização da proteína ligante de <i>cluster</i> Fe-S codificada pelo gene no <i>locus</i> Afe_0551 de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>.....</b>	<b>66</b>
4.3.1 Expressão .....	66
4.3.2 Purificação .....	68
4.3.3 Espalhamento dinâmico de luz.....	70
4.3.4 Espectrometria de massa .....	71
4.3.5 Medidas no UV visível .....	73
4.3.6 Medidas de dicroísmo circular em diferentes pHs .....	74
4.3.6.1 Medidas de CD no UV distante.....	74
4.3.6.2 Medidas de CD no UV próximo.....	83
4.3.7 Desnaturação térmica.....	85
4.3.8 Desnaturação química.....	90
4.3.9 Medidas de emissão de fluorescência.....	94
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO: artigo submetido a Journal of Process Biochemistry.....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura-1</b>	Sulfeto metálico Calcopirita: (a) amostra de rocha e (b) representação de sua estrutura cristalina e ordenamento atômico.....	4
<b>Figura-2</b>	Mecanismo direto de biolixiviação. Representação de adesão através de fenômenos de “ <i>tight adherence</i> ”. Modificado de SAND e GEHRKE (2006).....	6
<b>Figura-3</b>	Representação de fatores que influenciam a interação bactéria - minério. Adesão, quimiotaxia e sinais de Quorum sensing. Modificado de JEREZ, 2008.....	7
<b>Figura-4</b>	Representação do mecanismo de formação de pilus em bactérias Gram negativas. Os genes que codificam as proteínas PilA, PilB (homóloga de TadA), PilT e PilU (homólogas de PilT1 e PilT2), PilC (homóloga de TadC), PilM e PilF (possível homóloga de TadB), foram selecionados para avaliar sua expressão gênica em células de <i>A. ferrooxidans</i> LR incubadas com calcopirita. Modificado de KAISER, 2007.....	13
<b>Figura-5</b>	Mapa do vetor de expressão pET28a. Novagen, pET System Manual, 2005.....	18
<b>Figura-6</b>	(a) princípio da técnica de dicroísmo circular. (b) espectro de CD de vários tipos de estrutura secundária.....	38
<b>Figura-7</b>	Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe_0403 com proteínas Tad de <i>Ralstonia metallidurans</i> (Rmet_3656), <i>Burkholderia pseudomallei</i> (BPSL1893), <i>Burkholderia</i> sp. (Bcep18194) e <i>Ralstonia eutropha</i> (Reut_B5411). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi (2,6e – 9,6e).....	41
<b>Figura-8</b>	Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe_0404 com proteínas Tad de <i>Ralstonia eutropha</i> (Reut_B5412), <i>Ralstonia metallidurans</i> (Rmet_3657), <i>Burkholderia cenocepacia</i> (Bcen_1044) e <i>Bordetella bronchiseptica</i> (BB1829). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi (1,2e – 5,6e).....	43

- Figura-9** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0405 com proteínas Tad de *Ralstonia solanacearum* (RSp\_183), *Burkholderia thailandensis* (BTH\_12538), *Burkholderia mallei* (BMA\_1286) e *Burkholderia pseudomallei* (BPSL1891). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons na cor cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi (1,3e – 9,5e)..... 43
- Figura-10** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2078 com pilinas tipo IV de *Dechloromonas aromática* (Daro\_3038), *Pelobacter carbinolicus* (Pcar\_2380), *Geobacter metallireducens* (Gmet\_0760), *Legionella philadelphia* (Lphi\_0663). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi (0,5e – 4,1e)..... 44
- Figura-11** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2301 com pilinas tipo IV de *Thiobacillus denitrificans* (Tden\_0202), *Azoarcus* sp. (Azoa\_2266), *Polaromonas* sp. (Polar\_0781) e *Nitrosococcus oceani* (Noc\_0247). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons cinza claro entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi (1,3e – 9,3e)..... 45
- Figura-12** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2763 com proteínas PilT de *Azoarcus* sp. (Azoa\_1772), *Thiobacillus denitrificans* (Tden\_2420), *Pseudomonas aeruginosa* (Paeur\_396) e *Methylobacillus flagellatus* (Mfla\_2106). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons cinza claro entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi (1,2e – 5,9e)..... 46
- Figura-13** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2764 com proteínas PilT de *Thiobacillus denitrificans* (Tden\_2419), *Azoarcus* sp. (Azoa\_1770), *Dechloromonas aromática* (Daro\_3883) e *Nitrosococcus oceani* (Noc\_3004). Os blocos pretos representam

- resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons cinza claro entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi ( $3e - 4,8e$ )..... 35
- Figura-14** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0163 com proteínas MsrA de *Alcanivorax borkumensis* (ABO\_1530), *Rhodopseudomonas palustris* (RPB\_1517), *Rhodopseudomonas palustris* (RPA\_4070) e *Thiobacillus denitrificans* (Tbd\_2632). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi ( $3,2e - 9,5e$ )..... 48
- Figura-15** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0350 com proteínas pertencentes ao cluster Fe-S de *Nitrosomonas europaea* (Neur\_0967), *Burkholderia cenocepacia* (Bcen\_2192), *Chromobacterium violaceum* (CViol\_4201) e *Pseudomonas syringae* (P syr\_0416). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons cinza claro entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi ( $2,4e - 7,1e$ )..... 49
- Figura-16** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0547 com proteínas pertencentes ao cluster Fe-S de *Methanosarcina barkeri* (Mbar\_A1953), *Moorella thermoacetica* (Moth\_0809), *Methanospirillum hungatei* (Mhun\_1836) e *Carboxydothemus hydrogenoformans* (Chy\_0927). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi ( $1,e - 8,6e$ )..... 50
- Figura-17** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551 com proteínas pertencentes ao cluster Fe-S de *Acidithiobacillus caldus* (ACA\_2420), *Thioalkalivibrio* sp. (Tgr7\_2212), *Rhodobacter* sp. (Rsw2\_3300), *Hyphomicrobium denitrificans* (Hden\_2630), *Hydrogenivirga* sp. (HG\_18434), *Hydrogenobaculum* sp. (HYO\_1078) e *Sulfolobus solfataricus* (Ssol\_2103). Os blocos

	pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi (3e – 7,5e).....	51
<b>Figura-18</b>	Padrão de expressão gênica por PCR em tempo real, quando <i>A. ferrooxidans</i> LR foi colocado em contato com calcopirita por 1 dia. Os dados representam à média (três réplicas) da expressão gênica em relação à condição controle (células crescidas em sulfato ferroso e ausência de sulfeto). A expressão do ferro no controle foi considerada 1.....	54
<b>Figura-19</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes <i>tad</i> , quando <i>A. ferrooxidans</i> LR foi colocado em contato com calcopirita por 20 dias. Os dados representam à média (duas réplicas) da expressão gênica em relação à condição controle (células crescidas em sulfato ferroso e ausência de sulfeto). A expressão do ferro no controle foi considerada 1.....	55
<b>Figura-20</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes que codificam pilinas e pilus tipo IV, quando <i>A. ferrooxidans</i> LR foi colocado em contato com calcopirita por 20 dias. Os dados representam à média (duas réplicas) da expressão gênica em relação à condição controle (células crescidas em sulfato ferroso e ausência de sulfeto). A expressão do ferro no controle foi considerada 1.....	56
<b>Figura-21</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real do gene <i>msrA</i> e dos genes que codificam proteínas ligantes de <i>cluster</i> Fe-S, quando <i>A. ferrooxidans</i> LR foi colocado em contato com calcopirita por 20 dias. Os dados representam à média (duas réplicas) da expressão gênica em relação à condição controle (células crescidas em sulfato ferroso e ausência de sulfeto). A expressão do ferro no controle foi considerada 1.....	57
<b>Figura-22</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes <i>tad</i> , em células livres e aderidas após 2 h de incubação de <i>A. ferrooxidans</i> LR (inoculo obtido com 60% de oxidação de Fe <sup>2+</sup> ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.....	58
<b>Figura-23</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes que codificam pilinas e pilus tipo IV, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de <i>A. ferrooxidans</i> LR (inoculo obtido com 60% de oxidação de Fe <sup>2+</sup> ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.....	59

<b>Figura-24</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real do gene <i>msrA</i> e dos genes que codificam proteínas ligantes de <i>cluster</i> Fe-S, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de <i>A. ferrooxidans</i> LR (inoculo obtido com 60% de oxidação de Fe <sup>2+</sup> ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.....	60
<b>Figura-25</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes <i>tad</i> , em células livres e aderidas após 2 h de incubação de <i>A. ferrooxidans</i> LR (inoculo obtido com 80% de oxidação de Fe <sup>2+</sup> ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.....	61
<b>Figura-26</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes que codificam pilinas e pilus tipo IV, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de <i>A. ferrooxidans</i> LR (inoculo obtido com 80% de oxidação de Fe <sup>2+</sup> ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.....	63
<b>Figura-27</b>	Padrão de expressão por PCR em tempo real do gene <i>msrA</i> e dos genes que codificam proteínas ligantes de <i>cluster</i> Fe-S, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de <i>A. ferrooxidans</i> LR (inoculo obtido com 80% de oxidação de Fe <sup>2+</sup> ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.....	64
<b>Figura-28</b>	Possível mecanismo de reconhecimento de grupos tiol em calcopirita. Hp: pontes de hidrogênio. Modificado .....	65
<b>Figura-29</b>	Amplificação e purificação do gene em gel de agarose 1,5%, em tampão 1X TAE, pH 8,3. A primeira coluna é o padrão de massa molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder da Gibco BRL. A voltagem aplicada na separação foi de 100 V por 30 minutos. Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV a 365 nm.....	66
<b>Figura-30</b>	Resultados do PCR e miniprep das colônias do gene clonado. Gel de agarose 1,5% em tampão 1X TAE, pH 8,3. A primeira coluna é o padrão de massa molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder da Gibco BRL. A voltagem aplicada na separação foi de 100 V por 30 minutos. Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV a 365 nm.....	67
<b>Figura-31</b>	SDS-PAGE a 15% da porção solúvel da proteína codificada pelo gene no locus <i>Afe_0551</i> .....	68

<b>Figura-32</b>	Gel de SDS_PAGE a 15%. Resultado da purificação em coluna de afinidade Ni-NTA. M: marcador de peso molecular. FT: lavagem coluna.....	69
<b>Figura-33</b>	Gel de SDS_PAGE a 15%. Resultado da purificação em coluna de afinidade Ni-NTA. M: marcador de peso molecular. R: resina.	69
<b>Figura-34</b>	Resumo de padronização da purificação da proteína codificada pelo gene no locus Afe_0551. Gel de SDS-PAGE a 15%. Linha (1): marcador de peso molecular. Linha (2): fração não induzida. Linha (3): fração induzida (IPTG) por 2 h. Linha (4): fração induzida (IPTG) overnight. Linha (5): fração solúvel após indução (IPTG). Linha (6): fração insolúvel após indução (IPTG). Linha (7): fração lisada com 8 M de uréia. Linha (8): frações eluídas com 300 mM de imidazol.....	70
<b>Figura-35</b>	Resultado de DLS após purificação e renaturação da proteína codificada pelo gene no locus Afe_0551.....	71
<b>Figura-36</b>	Espectro no UV-visível da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551. A linha tracejada indica a proteína oxidada com 5 mM de persulfato de amônio e a linha contínua indica a proteína reduzida com 2 mM de DTT. O aumento na absorção na faixa entre 300 a 500 nm é mostrado...	73
<b>Figura-37</b>	Espectros de CD, no UV distante, da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 incubada em pHs entre 1 e 12 (amostras 9 µM em tampão Tris-HCl). Média de 20 acumulações.....	74
<b>Figura-38</b>	Espectros de CD, no UV distante, da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 incubada em pHs entre 1 e 5 (amostras 9 µM em tampão Tris-HCl), comparada com pH 8 nativa (condições de purificação). Média de 20 acumulações.....	75
<b>Figura-39</b>	Espectros de CD, no UV distante, da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 incubada em pHs entre 9 e 12 (amostras 9 µM em tampão Tris-HCl), comparada com pH 8 nativa (condições de purificação). Média de 20 acumulações.....	76
<b>Figura-40</b>	Predição da estrutura secundária da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551. Os cilindros representam alfa hélice, as setas representam folha beta e as linhas representam estrutura desordenada (random coil). A predição da estrutura foi realizada no programa PHD a partir da	



	seqüência de aminoácidos.....	78
<b>Figura-41</b>	Estimativa de porcentagem de estrutura secundária a partir dos dados de elipticidade molar obtidos por CD no UV-distante (198 nm e 260 nm) da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene Afe_0551 em pH 8. A estimativa foi realizada pelo programa CDNN.....	79
<b>Figura-42</b>	Estimativa de porcentagem de estrutura secundária a partir dos dados de elipticidade molar obtidos por CD no UV-distante (198 nm e 260 nm) da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene Afe_0551 em pH 2. A estimativa foi realizada pelo programa CDNN.....	80
<b>Figura-43</b>	Estimativa de porcentagem de estrutura secundária a partir dos dados de elipticidade molar obtidos por CD no UV-distante (198 nm e 260 nm) da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene Afe_0551 em pH 12. A estimativa foi realizada pelo programa CDNN.....	81
<b>Figura-44</b>	Estimativa das percentagens de estrutura secundaria: alfa hélice, folha beta e random coil, da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene Afe_0551 incubada em pHs entre 1 e 12. As percentagens de foram obtidas a partir da medida de CD no UV distante utilizando o programa CDNN.....	82
<b>Figura-45</b>	Espectros de CD, no UV próximo, da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 incubada em pH 2, 8 e 12 (amostras 50 µM em tampão Tris-HCl). Média de 20 acumulações.....	84
<b>Figura-46</b>	Gráfico de subida de temperatura desde 10 a 110 °C da proteína ligante de cluster Fe-S codificada pelo gene Afe_0551, incubada em pH 8 (condições de purificação). Tm 46° C obtida através de regressão sigmoidal.....	85
<b>Figura-47</b>	Gráfico de subida de temperatura desde 10 a 110 °C da proteína ligante de cluster Fe-S codificada pelo gene Afe_0551, incubada em pH 2. Tm 97,5° C obtida através de regressão sigmoidal.....	86
<b>Figura-48</b>	Conjunto de espectros de CD de proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 incubada em pH 2 e temperatura entre 10 a 110° C (amostra 9 µM em tampão Tris-HCl). Média de 20 acumulações.....	87
<b>Figura-49</b>	Gráfico de subida de temperatura desde 10 a 110° C da proteína ligante de cluster Fe-S codificada pelo gene Afe_0551, incubada	

	em pH 12. Tm 75° C obtida através de regressão sigmoidal.....	88
<b>Figura-50</b>	Conjunto de espectros de CD de proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 incubada em pH 12 e temperatura entre 10 a 110° C (amostra 9 µM em tampão Tris-HCl). Média de 20 acumulações.....	89
<b>Figura-51</b>	Dependência do pH na temperatura de transição da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551. Tm = 96 °C (pH 1); Tm = 97,5 °C (pH 2); Tm = 99 °C (pH 3); Tm = 95,5 °C (pH 4); Tm = 40 °C (pH 5); Tm = 46 °C (pH 8); Tm = 49 °C (pH 9); Tm = 81 °C (pH 10); Tm = 74 °C (pH 11); Tm = 75 °C (pH 12).....	90
<b>Figura-52</b>	Gráfico de estabilidade da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 (nativa pH 8) incubada em concentrações crescentes de guanidina GuHCl (1 a 4.6 M). Ponto médio na transição de desnaturação 2,17 M obtido através de regressão sigmoidal.....	91
<b>Figura-53</b>	Gráfico de estabilidade da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 (pH 2) incubada em concentrações crescentes de guanidina GuHCl (1 a 7 M). Ponto médio na transição de desnaturação 4,02 M obtido através de regressão sigmoidal.....	92
<b>Figura-54</b>	Gráfico de estabilidade da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 (pH 12) incubada em concentrações crescentes de guanidina GuHCl (1 a 5 M). Ponto médio na transição de desnaturação 3,29 M obtido através de regressão sigmoidal.....	93
<b>Figura-55</b>	Gráfico de dependência de pH na estabilidade da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 (pH 8, 2 e 12) incubada em concentrações crescentes de guanidina GuHCl. Dados normalizados. Os pontos médios na transição de desnaturação em função do pH são mostrados no enquadramento.....	94
<b>Figura-56</b>	Espectros de emissão de fluorescência da proteína cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 a valores de pH 2, 8 e 12. As medidas foram realizadas com excitação a 295 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada no intervalo de 300 nm a 450 nm. A concentração de proteína utilizada foi de 5 µM.....	96

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela-1</b> Principais características dos genes selecionados para análise de expressão por PCR em Tempo Real na presença de calcopirita. As informações para cada gene baseiam-se nos dados disponíveis no site da TIGR ( <a href="http://www.tigr.org">www.tigr.org</a> ).....	15
<b>Tabela-2</b> Pares de primers sintetizados para cada gene selecionado para análise por PCR em Tempo Real com respectivas temperaturas de anelamento e tamanho de produto de PCR. * F: primer Forward ou Direto, R: primer Reverse ou Reverso..	26
<b>Tabela-3</b> Média da expressão gênica de cada cultivo: células crescidas em ferro (Fe), células livres (Lv) e células aderidas (Ad) nos experimentos de 60% e 80% oxidação de Fe <sup>2+</sup> . Com uma confiança de 95%, a designação de uma mesma letra não difere estatisticamente entre si. *teste F:diferenças significativas a 5%.....	62
<b>Tabela 4-</b> Identificação da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe_0551 por LC/MS/MS.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>pH</b>	Potencial de Hidrogênio
<b>Eh</b>	Potencial de oxidação e redução
<b>EPS</b>	Exopoli-sacarídeos
<b>AHL</b>	Acyl-homoserine lactone
<b>MS</b>	Sulfeto metálico
<b>RT-PCR</b>	Real time – Reação em cadeia da polimerase
<b>IQ-UNESP</b>	Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista
<b>CBMEG-UNICAMP</b>	Centro de Biologia Molecular e engenharia genética Universidade Estadual de Campinas
<b>LR</b>	Linhagem de <i>A. ferrooxidans</i>
<b>ATCC</b>	Linhagem tipo de <i>A. ferrooxidans</i>
<b>kDa</b>	kilo-Daltons
<b>DEPC</b>	Dietil – piro – carbonato
<b>Expasy</b>	Expert Protein Analysis System
<b>GeneDoc</b>	Sequence Analysis and Alignment – Biology Software
<b>BioEdit</b>	DNA and Protein Sequence Alignment
<b>cDNA</b>	DNA de primeira fita
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>MOPS</b>	4-Morpholinepropanesulfonic acid
<b>TIGR</b>	The Institute for Genomic Research
<b>pET</b>	Sistema de Vetor de expressão
<b>LNLS</b>	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
<b>A. f</b>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
<b>LB</b>	Meio de cultura Luria-Bertoni
<b>TE</b>	1X TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA)
<b>IPTG</b>	Isopropil β-D-1-Tiogalactopiranosídeo
<b>Locus</b>	Posição fixa de um gene no cromossomo
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamino
<b>PAGE</b>	Gel de poli-acrilamida
<b>IMAC</b>	Immobilized Metal Affinity Chromatography
<b>Ni-NTA</b>	Sistema de purificação com resina de níquel
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
<b>CD</b>	Dicroísmo circular
<b>CDNN</b>	Circular Dichroism Secondary Structure Analysis
<b>PHD</b>	Protein Structure Prediction
<b>HDR</b>	Hetero-dissulfeto redutase
<b>PMF</b>	Força Próton Motora
<b>DLS</b>	Espalhamento dinâmico de luz
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Gu-HCl</b>	Guanidina HCl
<b>LNBio</b>	Laboratório Nacional de Biologia

**LISTA DE SÍMBOLOS**

<b>V</b>	Interações eletrostáticas
<b>I</b>	Forças iônicas
<b>RPM</b>	Revoluções por minuto
<b>T&amp;K</b>	Meio de cultura <i>Tuovine &amp; Kelly</i>
<b>M</b>	Concentração molar
<b><math>\lambda</math></b>	Comprimento de onda

## RESUMO

A bactéria acidofílica *Acidithiobacillus ferrooxidans* é encontrada em ambientes inorgânicos e ácidos tais como depósitos minerais e drenagem ácida de minas, sendo a principal bactéria envolvida na biolixiviação, um processo pelo qual o metabolismo microbiano causa a solubilização do metal contido em minérios que possuam sulfetos metálicos. A adesão da bactéria à superfície do mineral com a subsequente formação de biofilme é um pré-requisito para a dissolução do sulfeto metálico. Apesar de existirem pesquisas sobre a biogênese, a bioquímica e a regulação da formação de biofilme, o processo primário de adesão e os genes que participam destes processos têm sido pouco estudados nessa espécie bacteriana. O objetivo do presente trabalho foi analisar a adesão e o reconhecimento de grupos tióis na linhagem *A. ferrooxidans* LR em presença do sulfeto de cobre calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ). Para este fim, foram selecionados onze genes descritos no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, disponibilizado pela TIGR. Os genes selecionados para este trabalho são: *cluster tad* (*tadA*, *tadB* e *tadC*) envolvidos na formação de pilus e fimbrias; genes que codificam pilinas do tipo IV; genes pertencentes ao *cluster Fe-S* e o gene *msrA* que codifica uma metionina -S-sulfóxido redutase. A análise da expressão destes genes foi realizada por PCR em tempo real. Foi feita uma análise de bioinformática com o objetivo de conhecer o grau de conservação das seqüências das proteínas codificadas pelos genes e a busca de domínios conservados nessas proteínas. Além disso, foi clonada, purificada e caracterizada por métodos biofísicos uma proteína ligante de *cluster Fe-S*, com o objetivo de avaliá-la futuramente no processo global de biolixiviação. Os resultados de expressão a partir de PCR em tempo real de células livres e aderidas incubadas em presença de calcopirita mostraram que a maioria dos genes selecionados apresentou diferenças no nível de expressão dependendo das condições avaliadas (tempo de incubação e velocidade de agitação). Além disso, revelaram que depois de 24 h de incubação os genes são inalterados ou reprimidos, porém, depois de 20 dias de incubação, a expressão dos genes muda, sendo que vários genes são induzidos. Por outro lado, parece que o processo de adesão e reconhecimento de grupos tióis é favorecido nas primeiras horas de

incubação com calcopirita, tempo no qual provavelmente as células estão mais aptas para se aderir ao minério. A proteína recombinante ligante de *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus *Afe\_0551*, foi expressa adequadamente em células de *E. coli* BL21. Esta proteína apresentou uma alta resistência e termo estabilidade em uma ampla faixa de pH. As medidas de CD no UV distante revelaram que a proteína é altamente estruturada em pH ácido na faixa entre 1 e 4, na qual prevalece um alto conteúdo de alfa hélice. Nestas condições a proteína também apresenta uma grande estabilidade térmica, sendo que sua temperatura de transição se encontra em torno de 100 °C.

## ABSTRACT

The acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* is capable of causing dissolution of metals have been identified in acid mine water and mineral processing plants. Usually this microorganism is found in those places and they have been widely studied in bacterial oxidation and lixiviation in which use inorganic electron donors and fixed carbon dioxide. For this reason has been utilized for enhancing the extraction rates of metals in the ores. The mineral-associated bacteria, adhesion and biofilm formation are critical steps for colonization and subsequent mineral solubilization. Despite research of biogenesis, biochemistry and regulation of biofilm formation has been reported, adhesion process through pilus assembly mechanisms is not studied in this bacterium in spite of related genes involved in the formation of a type IV pilus and tight adherence were identified in thus genome. The objective of this work was to analysis tight adherence, type IV pilus and possibly thiol recognition *cluster* Fe-S genes expression for time real PCR in planktonic and adhered cells of *A. ferrooxidans* strain LR incubated in the presence of chalcopyrite. As well, *In Silico* analysis was realized for genes selected to conservation and conserved domains research. Finally, the Fe-S cluster-binding protein codified by locus Afe\_0551 was cloned and expresses to characterize for spectroscopic methods. The results of gene expression revealed to level expression differences in planktonic and adhered cells incubated with chalcopyrite. The genes were unaltered or repressed after 24 h of incubation, however, the expression changed to induction after 20 dyes. Probably, the process of adhesion in first hours of incubation is favored. In the other hand, the Fe-S cluster-binding protein codified by locus Afe\_0551 showed high thermal resistance and stability in widen pH range. Far-UV CD measurements showed a high structure in a pH range from 1 to 4, in which a great content of  $\alpha$ -helice and a  $T_m$  around 95 °C has been observed. In pH ranged 9 to 11 a structural reorganization probable occurred with additions of  $\beta$  sheet and coil random combinations. Nevertheless, in extreme pH 12 the protein is less structured and random coil arrangement prevail. These results are in agreement to prediction of secondary structure programs.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Biolixiviação de Minérios

A biolixiviação é o processo em que metais existentes em minérios na forma de compostos insolúveis são solubilizados pela ação direta ou indireta de uma comunidade de microrganismos. Na forma direta, os sulfetos metálicos são oxidados pela ação oxidativa direta das bactérias, gerando sulfatos solúveis. Na biolixiviação indireta, o metabolismo das bactérias produz substâncias lixiviantes que oxidam quimicamente os sulfetos, causando a solubilização dos metais contidos nos minérios, sendo que os principais agentes lixiviantes produzidos são  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e íons  $\text{Fe}^{3+}$  (BOSECKER, 1997).

Na prática, os dois processos, direto e indireto, ocorrem simultaneamente em uma série complexa de reações químicas. Entretanto, existe certa divergência sobre qual dos dois processos é mais importante para biolixiviação, sendo que pela complexidade dos mecanismos, é muito difícil determinar qual dos dois domina os processos de lixiviação bacteriana ou como ocorre a interação entre eles. Apesar de que existe evidência da adsorção dos *Acidithiobacillus* na superfície do minério, a contribuição ao processo de lixiviação por contato direto ainda não é totalmente esclarecida (ROHWERDER *et al.*, 2003).

A distribuição dos padrões de corrosão e lixiviação na superfície dos sulfetos é influenciada pelas bactérias que interagem com a superfície a nível microscópico, e este fenômeno começa a ser restringido para alguns sítios de atração específicos. Esta interação restringida define e desempenha um papel crucial no ataque inicial e no desenvolvimento dos padrões de corrosão na superfície dos minérios (NDLOVU e MONHEMIUS, 2005). Este processo inicial vai controlar o progresso da lixiviação.

A biolixiviação dos minérios refratários incluindo pirita, calcopirita, esfalerita entre outros, é fortemente influenciada pela temperatura, pH, potencial redox e o tamanho de partícula e por esta razão, pode existir um controle bioquímico específico para cada minério. A biolixiviação pode ser monitorada indiretamente determinando-se o pH, potencial redox e metais dissolvidos. Também, os efeitos galvânicos acoplados entre os minérios podem diminuir as barreiras cinéticas da oxidação, acentuando assim o papel do movimento dos íons metálicos no redor da superfície do sulfeto, e isto determinará a velocidade da reação (CRUZ *et al.*, 2005).

As mudanças físicas e químicas anteriormente mencionadas: pH, Eh, temperatura e concentração de metais dissolvidos, que ocorrem durante o curso da oxidação do minério, determinam pressões seletivas que resultam na predominância de alguns microorganismos como os acidófilos, e no declínio de outros associados com amostra do minério original. Estes últimos não terão importância significativa no processo de dissolução do metal, mas eles podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos dentro do processo geral de biooxidação (TUOVINEN *et al.*, 1994).

A área específica da superfície dos minérios é um fator importante que afeta o processo de oxidação bacteriana, e dessa forma, a velocidade de lixiviação do sulfeto aumenta quando a área da superfície também aumenta, ou seja, com uma redução do tamanho de partícula (DEVECI, 2004).

Nesse processo, também influencia o tipo de sulfeto e as formas de enxofre que ele possua. Outro fator importante a considerar é a densidade de polpa (relação sólido/líquido), já que uma alta concentração de sólidos pode interferir com o transporte de nutrientes e gases, além de aumentar a viscosidade do sistema (ROSSI, 2001).

A biolixiviação ocorre em um sistema geral que pode se resumir em três fases:

- A fase aquosa: solução de sais basais que provém de nutrientes essenciais os microorganismos que atuam como catalisadores biológicos nos processos de oxidação.
- A fase sólida: substrato finamente moído, que contém uma mistura de fases minerais, com metais de interesse e enxofre em forma de sulfetos.
- A fase gasosa: mistura de oxigênio molecular e dióxido de carbono.

Cada uma de estas fases tem um propósito fundamental na biolixiviação dos minérios:

- A fase aquosa é o meio suspenso onde os diferentes processos elementares ocorrem: crescimento dos microrganismos, encontro das partículas sólidas com os microrganismos, descarregamento de íons metálicos, distribuição uniforme e efetiva de oxigênio e dióxido de carbono.
- A fase sólida contendo o sulfeto metálico é a fonte de energia para o crescimento microbiano.
- A fase gasosa tem os requerimentos necessários de oxigênio (receptor final dos elétrons na respiração celular das bactérias aeróbicas envolvidas) e de gás carbônico para a biossíntese celular dessas espécies autotróficas.

Outros fatores importantes que podem afetar o crescimento bacteriano e o processo de biolixiviação são: o atrito entre as partículas, o qual aumenta com a elevação da quantidade do minério a utilizar, e que pode causar dano mecânico às células em suspensão; a acumulação de metabolitos tais como o íon férrico ou a lixiviação de altas concentrações de metais tóxicos como Cu, As, Pb, entre outros; temperatura acima do limite dos microrganismos e um pH extremamente ácido na solução (ROSSI, 2001).

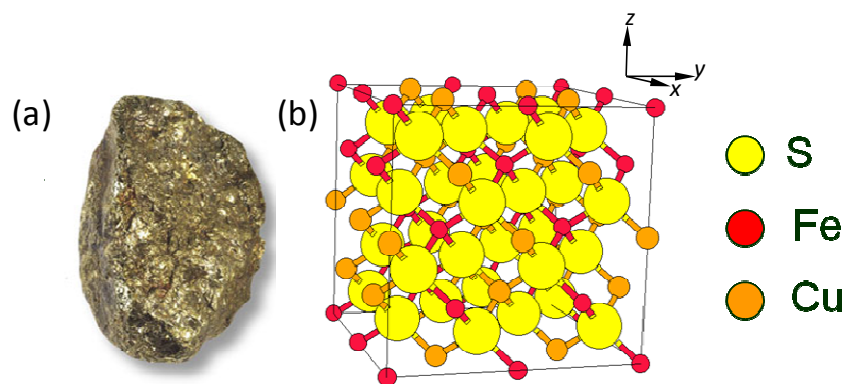
O processo de lixiviação bacteriana apresenta vantagens em relação a outros processos tradicionais como o pirometalúrgico, que consiste na oxidação do minério contendo o metal de interesse, pela queima em altas temperaturas. Devido à necessidade de elevadas temperaturas nesse tratamento, o processo pirometalúrgico requer alto gasto energético, atingindo, assim, elevados custos, sendo apenas economicamente viável em minérios, nos quais o metal de interesse encontra-se em alto teor. Outra desvantagem apresentada por esse processo é referente ao problema ambiental, pois a queima de sulfetos minerais provoca a liberação de SO<sub>2</sub> para a atmosfera, um dos gases responsáveis pela chuva ácida (GARCIA e URENHA, 2001).

Outro processo tradicional, o hidrometalúrgico, utiliza soluções ácidas ou básicas para o tratamento dos minérios e a recuperação do metal de interesse; nessa atividade a principal vantagem em relação à pirometalurgia, é o gasto energético. Em termos

gerais, pirometalurgia e hidrometalurgia são processos aplicados aos minérios que contenham alto teor de metais, pois além de ambos serem mais rápidos na aplicação em escala industrial, o valor agregado ao metal obtido no processo acabado viabiliza os custos e a sua obtenção (GARCIA e URENHA, 2001).

Por outro lado, as vantagens que a biohidrometalurgia apresenta em relação a ambos os processos tradicionais seriam: o baixo custo dos insumos (ácidos e agentes oxidantes), pois os mesmos são produzidos pela própria bactéria; reduzidos gastos energéticos; baixo investimento de capital; baixo custo operacional; reduzida mão-de-obra especializada na operação em relação aos demais processos de beneficiamento dos metais, agregando, assim, valor aos rejeitos de minérios de baixo teor, podendo ainda ser uma alternativa para jazidas de pequeno porte, longe de centros com infraestrutura (GARCIA e URENHA, 2001).

Vários estudos têm sido realizados para adquirir novos conhecimentos sobre os microrganismos utilizados na biolixiviação e sobre os mecanismos envolvidos neste processo para, desta forma, otimizar as plantas de biolixiviação de sulfetos minerais. As taxas e a eficiência final da solubilização dos sulfetos metálicos (pirita, calcopirita, bornita, covelita, arsenopirita, galena, esfalerita, entre outros) são bastante diferentes, variando desde os mais solúveis, como por exemplo, a bornita, até os mais refratários como a calcopirita. A conhecida refratariedade da **calcopirita** é devida principalmente a sua estrutura e ordenamento atômico, com ligações fortes entre seus átomos, o qual dificulta sua oxidação, ver Figura 1 (WATLING, 2006).



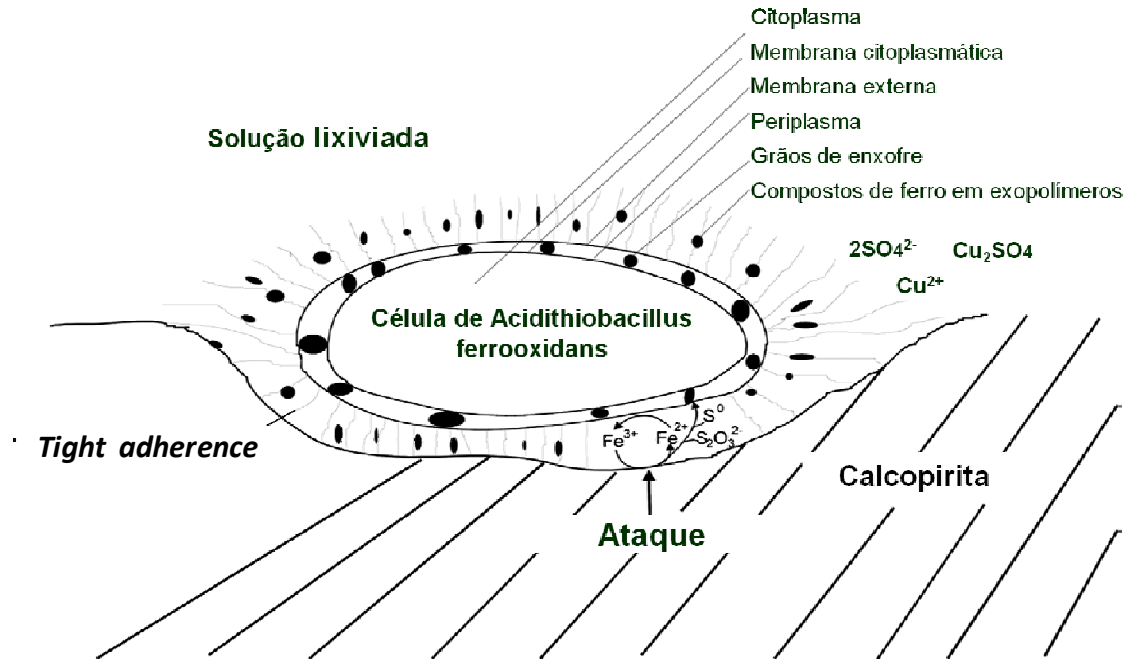
**Figura-1** Sulfeto metálico Calcopirita: (a) amostra de rocha e (b) representação de sua estrutura cristalina e ordenamento atômico.

A calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) é um dos sulfetos de cobre mais abundantes na natureza. As operações industriais de biolixiviação, sobretudo do cobre, são realizadas essencialmente através da lixiviação estática em pilhas de minérios de baixos teores do metal. A pouca reatividade da calcopirita tem sido atribuída à formação de um filme passivo que limita a reação de dissolução com o meio lixiviante. A camada passiva e as condições nas quais ela é formada têm sido investigadas, porém a natureza desta camada não foi totalmente esclarecida (THIRD *et al.*, 2000).

Independente das taxas e eficiência de solubilização, a interação da bactéria com os sulfetos minerais ainda é um dos temas mais controversos na literatura. A degradação dos sulfetos ácido-solúveis como esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), galena ( $\text{PbS}$ ), molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ), entre outros, foi sugerida por SCHIPPERS e SAND (1999) como sendo ocasionada por íons  $\text{Fe}^{3+}$  e/ou por prótons. Nesse caso, o principal intermediário é o polissulfito (e conseqüentemente enxofre elementar). Polissulfitos foram detectados na superfície de calcopirita oxidada (HACKL *et al.*, 1995).

Mecanismos de adesão bacteriana ao mineral têm sido descritos como sendo provocados por efeitos eletrostáticos e forças de interação hidrofóbica (DEVASIA *et al.*, 1993). Geralmente é sugerido que os polissacarídeos extracelulares (exopolímeros chamados de EPS) são os responsáveis da adesão bacteriana aos minerais (ESCOBAR *et al.*, 1997; POGLIANI e DONATI, 1999) sendo que, BARRETO *et al.* (2005) indicaram cinco genes que estão envolvidos na formação de EPS.

SAND e GEHRKE (2006) sugerem que *A. ferrooxidans* pode aderir ao sulfeto através de outros mecanismos (*tight adherence*) além dos EPS, porém, não descrevem com detalhes que forças ou estruturas envolvem tais mecanismos. Além disso, explicam como possíveis íons férricos presentes nos EPS, atacariam o sulfeto liberando assim grãos de enxofre que poderiam ser transportados até o periplasma, enquanto que outros compostos reduzidos de enxofre solúveis, como o tiosulfato, poderiam ser liberados ao meio, onde seriam finalmente oxidados até sulfatos. Quando o substrato mineral é calcopirita, outros produtos da oxidação são: íons de  $\text{Cu}^{2+}$  e sulfatos de cobre  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ , ver Figura 2.



**Figura-2** Mecanismo direto de biolixiviação. Representação de adesão através de fenômenos de “tight adherence”. Modificado de SAND e GEHRKE (2006).

ROJAS-CHAPANA e TRIBUTSCH (2001) tentaram provar a existência do mecanismo direto e identificaram que a cisteína, a qual contém grupo tiol, é utilizada por *A. ferrooxidans* para romper a interface do sulfeto de ferro formando pontes de enxofre (S-S ou -S-) com a pirita. Embora a cisteína e fosfolipídios estejam presentes nos exopolímeros secretados na superfície bacteriana, ainda não foi provado o papel desses agentes químicos na lixiviação.

BLAKE II *et al.* (2001) investigaram a adesão do *A. ferrooxidans* e da aporusticianina na pirita, baseados no modelo onde a proteína encontrada na superfície da célula bacteriana age como um receptor mineral específico para a adesão inicial da bactéria à pirita. Eles sugeriram que a aporusticianina poderia se unir por ligações coordenadas aos íons ferro da superfície de pirita, o que possivelmente alteraria e enfraqueceria ligações de valência do ferro. Esse enfraquecimento seria suficiente para difundir íons férricos da pirita, os quais seriam liberados no meio líquido como ferro solubilizado. A proteína aporusticianina poderia então se ligar a outro átomo de ferro da pirita e iniciar outro ciclo catalítico de solubilização do ferro. Outra hipótese sugerida foi que a aporusticianina funcionaria para promover um caminho de transferência de



Deste modo, o conhecimento dos mecanismos de interação sulfeto - bactéria é de grande importância para poder manipular e aperfeiçoar processos de biolixiviação, especialmente de minérios refratários, já que, para que a bactéria se associe ao mineral, adesão e formação de biofilme são passos críticos para colonização e subsequente solubilização do substrato.

## **1.2. *Acidithiobacillus ferrooxidans***

*Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia ou anaeróbia facultativa, que utiliza o CO<sub>2</sub> atmosférico como fonte de carbono e obtém energia através da oxidação de íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>), enxofre e compostos reduzidos de enxofre. *A. ferrooxidans* tem a capacidade de crescer em condições ambientais extremas de alta acidez. Esta espécie possui considerável interesse econômico por estar envolvida na bioxidação de minérios e na biolixiviação de metais, encontrando-se comumente no ambiente em zonas de mineração e em lugares com presença de sulfetos.

Uma característica importante de *A. ferrooxidans* é a sua resistência generalizada a altas concentrações de íons metálicos. Esta bactéria apresenta resistência elevada ao alumínio, zinco, cobalto, manganês, cobre, cromo e urânio (HUTCHINS *et al.*, 1986). Esta alta resistência a metais tóxicos provavelmente é condicionada por um sistema genético altamente especializado, característica entre outras, que faz com que esta espécie seja atrativa a nível biotecnológico.

*A. ferrooxidans* é uma das principais bactérias responsáveis pela lixiviação de metais, podendo ser utilizada em processos industriais para obtenção de cobre, urânio, zinco e níquel ou metais preciosos, a partir de minérios de baixos teores e de rejeitos de mineração. As mineradoras tradicionalmente utilizam vários processos de recuperação e extração de metais de interesse econômico que produzem uma grande quantidade de rejeitos ricos em sulfetos. Esses sulfetos através do tempo e por sua degradação intensiva, sobretudo por bactérias oxidantes de enxofre, do íon ferroso e de sulfetos metálicos, geram uma significativa contaminação no solo e água devido à produção de drenagens ácidas. Nestes ambientes comumente é isolado *A. ferrooxidans*



(ROHWERDER *et al.*, 2003).

O primeiro microrganismo envolvido na biolixiviação a ter o genoma sequenciado foi *A. ferrooxidans* (<http://www.tigr.org>), sendo identificados genes associados a rotas metabólicas e/ou funções que são importantes para o processo de biolixiviação (JEREZ, 2008). Alguns destes genes estão envolvidos nos mecanismos de captação, assimilação e metabolismo de enxofre, metabolismo energético da bactéria quando esta cresce na presença de íon ferroso ou enxofre e metabolismo de carbono (VALDÉS *et al.*, 2008).

### **1.3. Mecanismo de adesão**

Em geral, todas as superfícies da natureza podem ser colonizadas por microrganismos. A colonização começa pela adesão de células individuais ou por agregados celulares. Quando as condições são favoráveis ao crescimento de células aderidas, elas passam a se dividir e a desenvolver micro colônias que formam complexas comunidades, conhecidas como biofilmes. Os biofilmes complexos são componentes vitais em todos os ecossistemas e são importantes na compreensão da ecologia microbiana (CHEN e WALKER, 2007).

A adesão de bactérias sobre superfícies é um fenômeno crítico para vários processos biotecnológicos, por exemplo, células imóveis são amplamente utilizadas nos tratamentos de águas residuais. No entanto, em algumas situações as células aderidas são indesejadas já que causam sérios problemas em materiais biológicos, navios, estruturas marinhas, entre outros (HERMANSSON, 1999).

A contribuição que faz o contato direto das células nos minérios no processo de biolixiviação ainda não é clara, comparado com o mecanismo de oxidação química indireta por íons férricos. Porém é de conhecimento a importância que tem a adesão e formação de biofilme sobre os minérios no processo global de biolixiviação, além de se reconhecer que ambos os mecanismos tanto direto como indireto atuam paralelamente na oxidação dos sulfetos (SAND e GEHRKE, 2006).

A primeira fase da adesão é governada por interações físicas ou químicas entre células livres e a superfície do substrato. Quando a bactéria é atraída até a superfície,

uma adesão forte requer várias horas de incubação, tempo no qual possivelmente são sintetizados polímeros celulares (HERMANSSON, 1999).

Os fatores físicos, químicos e biológicos que governam o processo de adesão estão sujeitos ao tipo de célula, à fase de crescimento, à solução química, às interações hidrofóbicas, à carga superficial característica e às macromoléculas da superfície. Esses fatores influenciam as forças de interação que governam a aproximação e a adesão das células na superfície. Tais forças são: eletrostáticas, de van der Waals, hidrofóbicas, hidratação e outras forças específicas (BUSSCHER e WEERKAMP, 1987; KUZNAR e ELLIMELECH, 2004).

Comumente, a adesão é medida como o número de bactérias aderidas depois de uma fase de lavagem, onde as células que não estão aderidas são removidas. Portanto o processo de adesão pode ser medido como uma função do tempo ou como um estado depois de um tempo definido.

A teoria clássica de estabilidade coloidal de *Derjaguin – Landau – Verwey - Overbeek (DLVO)* tem sido utilizada para explicar o fenômeno de adesão bacteriana. Embora esta teoria clássica tenha sido utilizada como um modelo qualitativo, na atualidade está sendo usada para calcular as mudanças na energia livre de adesão de forma quantitativa com objetivo de explicar esse fenômeno (HERMANSSON, 1999).

A teoria de **DLVO** tem sido utilizada para descrever a interação total ( $V_{Tot}$ ) entre a célula e a superfície (substrato) como um balanço entre dois fatores aditivos:  $V_A$  resultado das interações de van der Waals ( $vdW$ ), que são geralmente atraentes e, interações repulsivas ( $V_R$ ) entre a dupla camada elétrica da célula e o substrato, as quais são geralmente repulsivas devido à carga negativa das células e o substrato. Assim sendo:

$$V_{Tot} = V_A + V_R \quad (1)$$

$$V_A = - Ar/6d \quad (2)$$

Onde,  $A$  é a constante de *Hamaker*,  $d$  é a distância que separa a célula do substrato,  $r$  é o raio da célula. Assume-se que as células são sempre esféricas. A interação da dupla camada ( $V_R$ ) origina-se das interações entre moléculas carregadas;

sua força e faixa são fortemente afetadas pela presença de íons ao redor (JUCKER *et al.*, 1998).

Nos sistemas naturais, geralmente todas as superfícies têm uma carga negativa, sendo que normalmente esta é a mesma carga das bactérias, o que pode desfavorecer a adesão. No entanto, na presença de altas forças iônicas ( $I$ ), a interação pode ser de atração devida principalmente a forças atrativas de van der Waals (HERMANSSON, 1999), fenômeno que possivelmente ocorre nos sistemas de biolixiviação. Quando existe uma  $I$  mediana, a adesão pode ser reversível e a atração fraca. Quando  $I$  é baixa ocorre uma repulsão e quando  $I$  é alta ocorre uma atração, sendo que nestes casos a distância entre a célula e o substrato não tem influência.

Estruturas da superfície celular tais como pilus, fímbrias, flagelos, lipopolissacarídeos, material capsular, estão envolvidas no processo de adesão. Flagelos e fímbrias (estruturas de raio pequeno) são mais hidrofóbicas que o resto da superfície celular, fato que pode incrementar a adesão e orientar a célula até zonas de interface (ZITA e HERMANSSON, 1997). Geralmente superfícies negativas e hidrofílicas tais como o vidro, podem ter sítios pequenos com carga positiva. Nesses sítios uma molécula de raio pequeno pode desenvolver “interações microscópicas”, fenômeno que também pode ocorrer nas superfícies dos minerais.

É de conhecimento que qualquer defeito que possa ter um grão de minério (tais como: clivagens, fraturas, porosidades, falhas, exsoluções, deslocamentos, entre outros) convertem-se em zonas de maior susceptibilidade à oxidação e corrosão do sulfeto. Alguns destes defeitos podem ser promovidos pela moagem e preparação do material e outros são próprios de sua gênese (MÁRQUEZ *et al.*, 2006). A orientação da adesão pode ser controlada por fases de alta energia, que fazem com que as células tenham uma resposta quimiotática nestes sistemas. Os defeitos anteriormente mencionados provêm sítios de alta energia e tem se observado uma preferência da adesão celular nestes lugares (EDWARDS *et al.*, 1998).

O mecanismo primário para a adesão de *A. ferrooxidans* sobre os minérios parece ser por forças eletrostáticas. O crescimento desta bactéria em meio com ferro promove a formação de exopolissacarídeos (EPS), que consistem em ácidos graxos, polissacarídeos e ácido glucorônico. Complexos do íon férrico com substituições de

ácido urônico, têm como resultado um EPS carregado positivamente. Por outro lado, sulfetos como a pirita ( $\text{FeS}_2$ ) pode estar carregados negativamente em meios ricos em sulfatos com pH ao redor de 2,0, favorecendo a aderência entre a bactéria e o sulfeto. A célula pode ser atraída até o minério como resposta quimiotáctica e, então, a adesão pode consolidar-se pela contínua produção de EPS (GEHRKE *et al.*, 2001; GHOURI *et al.*, 2007).

#### 1.4. Mecanismo de formação de pilus tipo IV

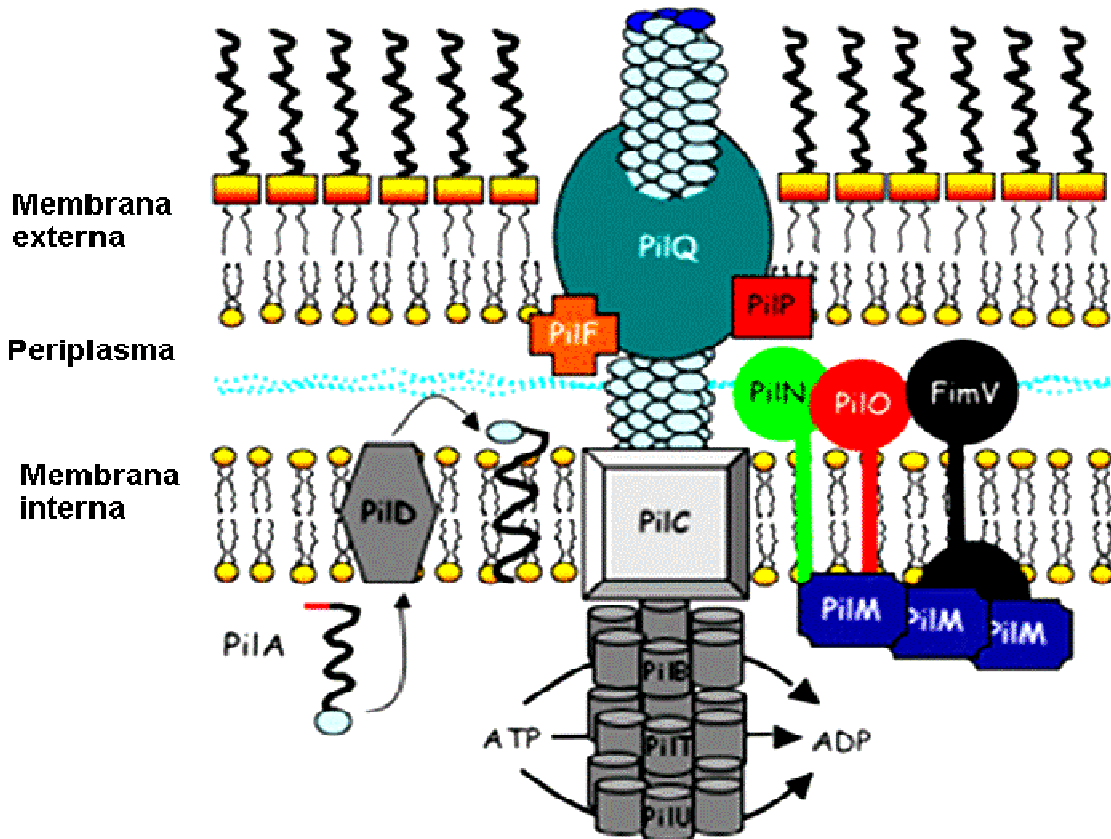
Os pilus tipo IV são estruturas poliméricas que mediam diversas funções celulares, entre elas: adesão; mobilidade na superfície chamada de “*twitching motility*” ou mobilidade por deslizamento; formação de micro colônias e biofilmes; adesão célula - hospedeiro; sinalização celular; absorção de DNA por transformação natural; aderência de fagos; transferência gênica entre outras (CRAIG *et al.*, 2004).

A polimérica fibra do pilus é uma máquina molecular altamente dinâmica alternante entre alongação e retração (CLAUSEN *et al.*, 2009). O processo de adesão através de mecanismos de montagem de pilus não tem sido estudado em *A. ferrooxidans*, apesar de que os genes envolvidos na formação de pilus tipo IV e “*tight adherence*” foram identificados em seu genoma (VALDÉS *et al.*, 2008).

Estruturas da superfície celular tais como pilus tipo IV e fímbrias, podem conferir habilidade para adesão superficial em bactérias Gram negativas, sendo que este fenômeno pode estar associado à mobilidade por deslizamento, a qual resulta de mecanismos alternantes de extensão e retração (CRAIG *et al.*, 2004). Os filamentos dos pilus tipo IV são resistentes a pH ácidos e a condições com alta temperatura. Condições extremas requerem de adaptações fisiológicas e bioquímicas complexas para manter a homeostase celular, as quais possivelmente foram adquiridas na evolução (COHEN-KRAUSZ e TRACHTENBERG, 2008) e que provavelmente permitem que bactérias como *A. ferrooxidans* respondam com êxito a mudanças ambientais.

Os pilus tipo IV e a mobilidade por deslizamento têm sido bem caracterizados em *Pseudomonas aeruginosa*, na qual aproximadamente 40 genes são requeridos para a biogênese e função dos pilus tipo IV, entre eles, genes que codificam subunidades de

pilina, proteínas requeridas para a montagem e retração do pilus, pré pilina peptidases e proteínas reguladoras, ver Figura 4 (MATTICK, 2002).



**Figura-4** Representação do mecanismo de formação de pilus em bactérias Gram negativas. Os genes que codificam as proteínas **PilA**, **PilB** (homóloga de **TadA**), **PilT** e **PilU** (homólogas de **PilT1** e **PilT2**), **PilC** (homóloga de **TadC**), **PilM** e **PilF** (possível homóloga de **TadB**), foram selecionados para avaliar sua expressão gênica em células de *A. ferrooxidans* LR incubadas com calcopirita. Modificado de KAISER, 2007.

**PilT**, é uma ATPase necessária para a retração do pilus, fenômeno no qual ocorre liberação ou rompimento do pilus, envolvendo uma despolimerização desde a base da fibra, e subsequente dissociação das subunidades de pilina (**PilA**), que logo são introduzidas e armazenadas na membrana citoplasmática (MATTICK, 2002). A montagem do pilus requer uma outra ATPase, que em *Mixobacterias* e *P. aeruginosa* é chamada de **PilB** (KAISER, 2007), e é homóloga de **TadA** (BHATTACHARJEE *et al.*, 2000). Esta ATPase fornece energia para que centos de monômeros de subunidades

de pilina, sejam polimerizados formando a extensão da fibra do pilus em hélice (KAISER, 2007). Neste passo, outros fatores envolvidos na montagem, como a proteína **PilM**, a qual se localiza na membrana interna, tem como função o transporte das subunidades de pilina através da membrana, até outra grande proteína transmembranaral, a proteína PilC (homóloga de **TadC**), que serve como suporte na elongação das subunidades de pilina. Uma outra função de TadC, parece estar envolvida na estabilidade de outros membros dos sistema de formação do pilus. Por outro lado, a grande proteína PilQ, localizada na membrana externa, também serve como suporte das subunidades de pilina que vêm sendo ensambladas desde a membrana interna, continuando assim sua elongação ao exterior. Neste processo as proteínas PilF (possível homóloga de **TadB**) e PilP seriam proteína acessórias na estabilização da grande proteína PilQ (KAISER, 2007; CRAIG e LI, 2008).

Os genes que codificam as proteínas mencionadas anteriormente foram selecionados neste estudo, para avaliar a sua expressão gênica, em células de *A. ferrooxidans* LR incubadas com calcopirita.

## 1.5. Genes selecionados envolvidos em adesão

### 1.5.1 Genes *tad*

Os genes *tad* que codificam a maquinaria requerida para formação de pilus e fímbrias de baixo peso molecular estão presentes no genoma de diversos microrganismos. Estes genes são essenciais para formação de biofilme, colonização e patogenicidade em várias espécies de bactérias. Além disso, auxiliam a aderência em diferentes superfícies (TOMICH *et al.*, 2007).

Entre doze e treze genes são requeridos para aderência, incluindo a produção de pilus, morfologia rugosa da colônia, auto-agregação e formação de biofilme. A proteína TadA é homóloga à proteína da subfamília de ATPases GspE requeridas para secreção, sendo que, ela proporciona a energia de hidrólise de ATP para formação de pilus. As proteínas TadB e TadC são homólogas à proteína da família GspF/PilC, que

estão localizadas na membrana interna e participam dos sistemas de secreção. Além disso, elas podem participar da biogênese do pilus. O arranjo em *tandem* da maioria dos genes *tad* sugere que eles formam uma estrutura em operon; ou seja, os genes *tad* de várias bactérias foram descritos como sendo co-transcritos por um mesmo promotor. Em *Pseudomonas aeruginosa* a expressão de vários genes *tad* é induzida por um regulador global de “quorum sensing” (WAGNER *et al.*, 2003; TOMICH *et al.*, 2007). No entanto, em *A. ferrooxidans* a regulação desses genes não tem sido estudada.

### 1.5.2 Genes que codificam Pilinas Tipo IV

Todas as bactérias Gram-negativas possuem na superfície pilus tipo IV, os quais são produtos poliméricos da proteína pilina (CRAIG *et al.*, 2004). Um tipo de adesão que requer pilus é chamado de mobilidade por deslizamento, onde a célula se movimenta sobre uma superfície por um processo ativo que depende de gasto energético. Esta mobilidade por deslizamento não precisa de flagelos e geralmente este movimento segue o eixo longitudinal da célula. Nos microrganismos existem diferentes tipos de estruturas que geram esta mobilidade, onde os pilus tipo IV são comumente requeridos. Ainda não são claros os mecanismos moleculares envolvidos no processo inicial da mobilidade na célula. Os pilus são estruturas de 6 nm de diâmetro e comprimento maior que 4 µm e se encontram geralmente em ambos os pólos da célula. Eles têm um papel importante na adesão sobre superfícies, além de estarem envolvidos em uma variedade de processos como: movimentação, transformação, conjugação, infecção de bacteriófagos, formação de biofilme, ativação de respostas celulares e citotoxicidade (Mc BRIDE, 2001). Em *A. ferrooxidans* são poucos os estudos realizados até o momento com os genes que codificam pilinas.

### 1.5.3 Genes que codificam proteínas ligantes de *Cluster Fe-S*

O *cluster Fe-S* é fundamental na transferência de elétrons, na catálise das reações do metabolismo e tem funções de regulação. Além disso, participa no estoque de Fe/S e na atividade enzimática. Em bactérias os *clusters Fe-S* podem participar na

fotossíntese e fixação de nitrogênio. Em proteínas Fe-S (rubredoxinas) o ferro faz quatro ligações coordenadas com as cisteínas da proteína, que atuam como carreadores de elétrons numa ampla faixa de potenciais de óxido-redução (KILEY e BEINERT, 2003).

Pelo menos 120 tipos diferentes de enzimas e proteínas são conhecidas como contendo *clusters* Fe-S, que formam sítios de união ao substrato numa grande quantidade de enzimas redox e não redox. Em bactérias os *clusters* Fe-S podem participar de fotossíntese e fixação de nitrogênio. Um modo de estoque de Fe tem sido encontrado em algumas bactérias e *archaeas*, no qual poliferredoxinas contendo mais de 12 *clusters* Fe-S são organizados em *tandem*. Genes que codificam poliferredoxinas têm sido encontrados organizados em operon (JOHNSON *et al.*, 2005).

Outras funções atribuídas a proteínas ligantes de *cluster* Fe-S seriam: reorganização de proteínas em resposta a efeitos de solventes, reparação de enzimas de DNA e endonucleases, regulação da transcrição e tradução em bactérias, funcionamento de proteínas que monitoram o estresse oxidativo e regulação da atividade enzimática em resposta a estímulos externos (BEINERT *et al.*, 1997; CASPERSEN *et al.*, 2000).

#### **1.5.4 MsrA, metionina-S-sulfóxido redutase, subunidade A**

As proteínas redutases têm como função principal proteger a célula do estresse oxidativo, no entanto, outras funções também são atribuídas: reparação de proteínas, formação de biofilme e determinação de patogenicidade (BENJAMIN *et al.*, 2005).

Homólogos desses genes têm sido identificados na maioria dos organismos. Em vários procaríotos, incluindo *E. coli*, os genes *msrA* e *msrB* constituem duas unidades de transcrição separadas, porém, em outras espécies como *Bacillus subtilis*, esses genes estão ordenados em operon. O número de cópias desses genes também varia amplamente entre os organismos, sendo que a redundância genética usualmente é interpretada como reflexo da necessidade do organismo de ter alelos expressos em diferentes condições (SINGH e MOSKOVITZ, 2003; BENJAMIN *et al.*, 2005).



**Tabela-1** Principais características dos genes selecionados para análise de expressão por PCR em Tempo Real na presença de calcopirita. As informações para cada gene baseiam-se nos dados disponíveis no site da TIGR ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)).

<b>Locus</b>	<b>Proteína</b>	<b>Função</b>	<b>Tamanho (kDa)</b>
<b>Afe_0403</b>	TadA ( <i>Tight adherence A</i> )	ATPase provendo energia na montagem de pilus.	49
<b>Afe_0404</b>	TadB ( <i>Tight adherence B</i> )	Carregador molecular que transfere energia para formação do pilus.	34,5
<b>Afe_0405</b>	TadC ( <i>Tight adherence C</i> )	Montagem de pilus adesivos, formação de biofilme e colonização.	34,5
<b>Afe_2078</b>	Pilina. PilA	Formação do pilus.	39,75
<b>Afe_2301</b>	Pilus assembly. PilM	Envolvida na constituição do pilus bacteriano.	39,08
<b>Afe_2763</b>	PilT-1- <i>Twitching motility</i>	Contração do pilus.	41,5
<b>Afe_2764</b>	PilT-2- <i>Twitching motility</i>	Contração do pilus.	38,3
<b>Afe_0163</b>	Metionina-S sulfóxido redutase	Reparo de proteínas em estresse oxidativo, adaptação a condições atípicas.	22,7
<b>Afe_0350</b>	Proteína ligante do <i>Cluster Fe-S</i>	Envolvida na captação destes elementos pela bactéria. Candidata para reconhecimento de grupos tiol.	9,1
<b>Afe_0547</b>	Proteína ligante do <i>Cluster Fe-S</i>	Envolvida em reações de oxido-redução.	26,5
<b>Afe_0551</b>	Proteína ligante do <i>Cluster Fe-S</i>	Envolvida em funções de regulação, participa em transferência de elétrons, evitam o acúmulo de Fe e S até níveis tóxicos.	27,5

Tendo em vista a importância do processo de adesão a fim de que a biolixiviação de sulfetos pelo mecanismo direto ocorra, foi proposto neste trabalho o estudo de genes envolvidos em adesão e reconhecimento de grupos tióis na bactéria *A. ferrooxidans* LR (Tabela 1) incubada com calcopirita. Sendo assim, foi avaliada a expressão destes genes tanto em células livres como nas aderidas ao minério

calcopirita, em diferentes tempos de incubação, através de PCR em tempo real. Os tempos de incubação foram selecionados a partir de estudos anteriores (grupo de biologia molecular do centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética CBMEG/UNICAMP em colaboração com o grupo de Biohidrometalurgia/IQ-UNESP), que revelaram diferenças significantes na expressão de outros genes, em células de *A. ferrooxidans* LR na presença de calcopirita. Além disso, a busca de reguladores e domínios conservados das proteínas codificadas por esses genes, que foi realizado por meio de análise de bioinformática, ajudou no entendimento da expressão destes genes.

## **1.6. Proteínas com potencial biotecnológico**

Desde que foram descobertas as enzimas na metade do século XIX, são utilizadas com sucesso em vários processos industriais. Com o avanço da biotecnologia, novas utilizações para enzimas em processos industriais foram observadas (HOONDAL *et al.*, 2002). Assim sendo, como exemplo, podemos citar as pectinases alcalinas que possuem importância na indústria têxtil, indústria do papel, fermentação do café e chá, entre outras (HOONDAL *et al.*, 2002) e, as proteinases e amilases que são utilizadas na fabricação de detergentes.

Microrganismos extremófilos, que vivem em condições inóspitas, vêm despertando interesse cada vez maior por possuírem enzimas de interesse industrial. Essas enzimas funcionam em condições extremas, pois estão envolvidas no metabolismo e processos biológicos específicos desses organismos (NIEHAUS *et al.*, 1999). Enzimas isoladas de microrganismos extremófilos têm apresentado características interessantes como termo-estabilidade, resistência a desnaturantes químicos, solventes orgânicos e pH extremos (LEUSCHNER e ANTRANIKIAN, 1995; FRIEDRICH e ANTRANIKIAN, 1996; JORGENSEN *et al.*, 1997; RUDIGER *et al.*, 1995). As enzimas obtidas de organismos hipertermófilos, por exemplo, apresentam termo-estabilidade suportando assim, altas temperaturas (ATOMI, 2005). Várias enzimas isoladas de extremófilos vêm sendo utilizadas na produção de detergentes, açúcar, óleo, e outros (ATOMI, 2005).

Até o momento, enzimas isoladas de *A. ferrooxidans* não foram exploradas em nível de utilização industrial, seja em biolixiviação ou outros processos. Assim sendo, um dos objetivos deste trabalho é iniciar um tipo de análise com um enfoque na biolixiviação. Portanto, vários cDNAs com expressão diferencial na presença de ferro, bornita ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ) e calcopirita tem sido isolados pelo grupo de biologia molecular do centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética CBMEG/UNICAMP em colaboração com o grupo de Biohidrometalurgia/IQ-UNESP. Entre esses cDNAs vários codificam proteínas envolvidas em metabolismo, transporte, síntese de ácidos nucléicos, adesão e outros. Essas proteínas estão localizadas no citoplasma e membrana. Pretende-se selecionar e caracterizar algumas dessas proteínas com o intuito de encontrar proteínas "*helpers*" da biolixiviação, ou seja, proteínas com potencial de acelerar o processo "*in vitro*". Os genes que codificam essas proteínas são candidatos em potencial para manipulação genética e futura obtenção de linhagens transgênicas de *A. ferrooxidans* que produzam a proteína de interesse em maior quantidade.

Foi identificado no genoma anotado de *A. ferrooxidans* um gene, no locus Afe\_0551, codifica uma proteína ligante do *cluster* Fe-S que pode estar envolvida no reconhecimento de grupo tiol. Recentemente foi estudada a participação de *clusters* Fe-S na redução de pontes S-S e na doação de enxofre, fazendo parte de um ciclo catalítico (JOHNSON *et al.*, 2005). Dada a grande versatilidade funcional das proteínas contendo *clusters* Fe-S foi selecionada a proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551 como candidata com potencial no auxílio da biolixiviação. Assim sendo, um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar esta proteína por métodos biofísicos para determinar possíveis propriedades fisiológicas que ajudem neste processo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o mecanismo de adesão e reconhecimento de grupos tióis em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR, na presença de calcopirita.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**2.2.1. Análise da expressão de genes envolvidos no mecanismo de adesão em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR na presença de calcopirita por PCR em tempo real.**

- Análise de bioinformática dos genes selecionados para determinar o grau de conservação das seqüências das proteínas codificadas pelos genes e a busca de domínios conservados nessas proteínas.
- Análise do padrão de expressão dos genes em células livres e aderidas após diferentes tempos de incubação com calcopirita (2 h, 1 dia e 20 dias) e, com diferentes percentagens de oxidação de Fe<sup>2+</sup> (60% e 80%). Como controle foi utilizado a expressão dos mesmos genes em células crescidas em ferro.

**2.2.2. Caracterização da proteína recombinante pertencente à família de *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 por métodos biofísicos**

- Produzir a proteína recombinante pertencente à família de *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551. Para este fim foi feito: 1) desenho de primers e amplificação do gene por PCR; 2) clonagem no vetor pET28a e seqüenciamento do gene; 3) transformação na linhagem de expressão *E. coli* BL21(DE3); 4) produção da proteína *in vitro*.
- Caracterizar a proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551, pertencente à família de *cluster* Fe-S, com o objetivo de conhecer suas características biofísicas com possível aplicação no melhoramento do processo *in vitro* de biolixiviação.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostra mineral e cultivo da bactéria

Uma amostra de calcopirita natural da mina de Sossego-PA foi fornecida pela Companhia Vale do Rio Doce. O mineral foi moído em um moinho de bolas a 100% < 37 $\mu$ m (400 mesh).

Para avaliar a expressão dos genes envolvidos no processo de adesão em células livres, foram utilizadas suspensões celulares da linhagem de *A. ferrooxidans* LR, obtida a partir de volumes de cultura de 1 L, em meio estritamente mineral T&K: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O (0.4 g/l), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.4 g/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.4 g/l) e sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; (167 g/l)) na proporção de 4:1 (TUOVINEN e KELLY, 1972), sob agitação de 250 rpm a 30° C. Após a cultura atingir 80% de oxidação do Fe<sup>2+</sup>, determinado por titulação com dicromato de potássio (VOGEL, 1960), as células foram filtradas em papel de filtro comum, coletadas através de filtração a *vacuum* em membrana (Millipore 0,22  $\mu$ m), centrifugadas a 12000 rpm por 3 min e lavadas com meio T&K pH 1,8 para obtenção de células livres de ferro. A seguir, as células foram inoculadas em T&K (sem ferro) contendo 2,5% de calcopirita (autoclavada em ciclo aberto por 20 min) e incubadas a 30° C, 250 rpm por um e vinte dias. Após o período de incubação o resíduo mineral foi separado das células por meio de filtração em membrana (Millipore 0,45  $\mu$ m) para obtenção das células livres. Em seguida as células foram lavadas com água dietil pirocarbonato (DEPC), congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -70° C. Como controle, foi utilizado células inoculadas em meio T&K e incubadas a 30° C, 250 rpm até atingir 80% de oxidação do Fe<sup>2+</sup>.

Para avaliar a expressão dos genes em células livres e aderidas, foram feitas algumas modificações na velocidade de agitação e na percentagem de oxidação do Fe<sup>2+</sup>. As suspensões celulares foram obtidas a partir de 1 L de cultura como descrito

acima e após a cultura atingir 60% e 80% de oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$ , respectivamente, as células foram filtradas em papel de filtro comum, coletadas através de filtração a *vacuum* em membrana (Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ ), centrifugadas a 12000 rpm por 3 min e lavadas com meio T&K pH 1,8 para obtenção de células livres de ferro. A seguir, as células foram inoculadas em T&K (sem ferro) contendo 2,5% de calcopirita e incubadas a 30° C, 60 rpm por 2 horas. Após este tempo de incubação, o resíduo mineral foi separado por centrifugação a 700 rpm para obtenção das células livres. O minério foi lavado com meio T&K pH 1,8 e com 10 mL de Triton-X 100 para desprendimento das células aderidas (GARCÍA e JEREZ, 1995). Durante a lavagem com Triton-X 100, o mineral contendo as células aderidas foi submetido à agitação em vortex por 20 minutos. Depois deste tempo, o minério foi distribuído em tubos *ependorf* para sucessivas lavagens. As células foram recuperadas por centrifugação a 12000 rpm, por 10 min. Tanto as células livres como as aderidas foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C.

### 3.2. Análise de bioinformática

Foi feita uma análise de bioinformática dos genes selecionados para determinar: 1) localização dos genes no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, 2) definição da organização dos genes em operons ou *clusters* no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, 3) grau de conservação das seqüências das proteínas codificadas pelos genes e 4) busca de domínios conservados nessas proteínas, sendo que o termo “domínio conservado” designa motivos geralmente funcionais que se repetem numa mesma proteína ou em proteínas diferentes.

Os programas BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) e GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>) foram utilizados para fazer o alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas com diversos organismos. O programa BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.>) e ExPasy foram utilizados na busca dos domínios conservados das proteínas.

### 3.3. Isolamento de RNA e síntese da primeira fita de cDNA

O RNA foi isolado das células obtidas nas condições descritas no item 3.1, segundo o método descrito por Paulino *et al.* (2002). O RNA foi tratado com DNase, e o cDNA foi sintetizado com o *kit ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração de RNA, as células foram lavadas por 10 vezes com TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e 1 vez com água tratada com DEPC. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de extração (EDTA 1 mM; LiCl 0,1 M; Tris 0,1 M;) e em seguida foi adicionado 1 mL de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) contendo 100 µL de SDS 10%. As amostras foram agitadas por 2 minutos em vortex e centrifugadas a 8000 rpm por 3 min a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um tubo *ependorf* novo e todo o processo foi repetido até que não houvesse debris celular na interface. O RNA total foi precipitado por meio da adição de acetato de sódio 40% (1/20 do volume) e etanol absoluto (2 volumes) e, incubação a -20° C por no mínimo 2 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas e o precipitado lavado com etanol 70%. O RNA foi ressuspensado em água DEPC e armazenado a -70° C. A integridade do RNA isolado foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 6% de formaldeído, em tampão MOPS 1X (MOPS 10x: 41,8 g de MOPS, 16,6 mL de acetato de sódio 3 M, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8; água q.s.p. 1000 mL; pH 7).

A seguir, o RNA total isolado foi tratado com DNase, para tal, a cada 8 µl de RNA total foram adicionados 1 µl de tampão para DNase (10x DNase I Reaction buffer, Invitrogen) e 1 µl de DNase (1 U/µl, Invitrogen). As amostras foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 1 µl de EDTA (25 mM EDTA pH 8,0, Invitrogen) e as amostras foram incubadas por 10 min a 65° C. Finalizado o tratamento com DNase, o RNA tratado foi quantificado em espectrofotômetro e guardado a -80° C até o momento de síntese de cDNA.

Para a síntese de cDNA foram utilizados 1 µg de RNA tratado com DNase de cada amostra. A este RNA foram adicionados 1 µl de *Random Hexamers* (50 ng/µl), 2 µl de dNTP mix (10 mM) e água tratada com DEPC em quantidade suficiente para volume final de 12 µl. Esta mistura foi incubada 65° C por 5 minutos. Em seguida,



àquela mistura foram adicionados 4 µl de *cDNA Synthesis Buffer*, 1 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de *RNAse OUT<sup>TM</sup>* (40 U/µl), 1 µl de água tratada com DEPC e 1 µl de *ThermoScript<sup>TM</sup> RT* (15 U/µl). A reação foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 50° C por 50 minutos e 85° C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 1 µl de RNAse H (2 U/µl) e a reação foi incubada por 37° C por 20 minutos. Os cDNAs sintetizados foram quantificados em espectrofotômetro e armazenados a -20° C até sua utilização nos experimentos de PCR em Tempo Real.

### 3.4. Análise da expressão dos genes por PCR em tempo real

A análise da expressão dos genes foi feita por meio de RTq-PCR (*Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*). Os pares de *primers* específicos para cada gene foram desenhados com o programa *Primer3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) utilizando como molde a seqüência genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Tabela 2). As reações foram realizadas no equipamento *Real-Time PCR System 7500 Applied Biosystems* (Applied Biosystems), com o kit *Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Qpcr SuperMix-UDG* (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Para a amplificação do gene constitutivo *alaS*, que codifica a proteína alanil tRNA sintetase, foram utilizados os *primers alaS13* (direto) e *alaS3* (reverso) (YARZÁBAL *et al.*, 2002).

De maneira breve, 100 ng de cDNA foram utilizados nos experimentos de PCR em Tempo Real os quais continham 6,25 µl de *Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green*, 0,25 µl de *Rox Reference Dye*, 0.4 µM de cada primer e água em quantidade suficiente para volume final 12,5 µl. Para amplificação foi feito um pré-tratamento com UDG (Uracil-DNA Glicosilase) por 2 min a 50° C e desnaturaçãõ de 2 min a 95° C, seguido de 45 ciclos de desnaturaçãõ a 95° C por 15 s, anelamento por 15 s de acordo com a T<sub>m</sub> de cada *primer*, e uma extensão a 72° C por 30 s, seguida de uma análise da curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1° C a cada 15 s iniciando-se em 95° C).

**Tabela-2** Pares de primers sintetizados para cada gene selecionado para análise por PCR em Tempo Real com respectivas temperaturas de anelamento e tamanho de produto de PCR. \* F: primer Forward ou Direto, R: primer Reverse ou Reverso.

Primers	Seqüência (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Tamanho do produto (pb)
<b>Afe0163-F*</b>	GCGGAAGACTATCACCAGGA	60.22	92
<b>Afe0163-R</b>	GTGCGCAGTTTTTCCACTTT	60.29	
<b>Afe0350-F</b>	CAACAACGCCATCAGCAT	59.20	92
<b>Afe0350-R</b>	TGCATTGCGGAGTGTCATA	59.80	
<b>Afe0547-F</b>	CAGTTGTTGTGGACGGAAAA	59.58	89
<b>Afe0547-R</b>	GCGGCACAGGTCATACACT	59.72	
<b>Afe0551-F</b>	TTTTAACCCGCGTTACTGGA	60.48	93
<b>Afe0551-R</b>	CACGAAACACACTGCCAGAT	59.75	
<b>Afe2078-F</b>	GGTGCCAACCTTCATCGACTT	60.12	96
<b>Afe2078-R</b>	TAGGTAGAGGGTCGGTGTCG	60.13	
<b>Afe2301-F</b>	CCATCGTCAAGGTCATAGCA	59.67	89
<b>Afe2301-R</b>	GGGAATATACTGGCCGCTTT	60.30	
<b>Afe2763-F</b>	AAAAACGGCTCGGATCTGTA	59.71	96
<b>Afe2763-R</b>	CGGTTTCAGCATTCTGTCC	60.64	
<b>Afe2764-F</b>	CAAACCGTACACAGCATGATT	59.93	97
<b>Afe2764-R</b>	CGGCAGTTCATAGGCAAAGT	60.27	
<b>Afe0403-F</b>	GCCGTCTATCGTTTCGTCTC	59.84	103
<b>Afe0403-R</b>	CGGTGAGCTGGTTGATGA	59.30	
<b>Afe0404-F</b>	GGCCTGCTGATCACTCTGTT	60.42	89
<b>Afe0404-R</b>	CACAGAGCCAATGGATAAAAAGAT	59.51	
<b>Afe0405 F</b>	CAACACGATACGCTTTCTGC	59.49	97
<b>Afe0405-R</b>	CCAGAAGGTGAGTTTGAGCA	59.01	

Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do  $C_t$  (*threshold cycle*) foi usada para avaliação da expressão gênica. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada com o intuito de se verificar a especificidade da reação, ou seja, a possível presença de bandas inespecíficas e/ou dímeros de *primers*. Os genes analisados tiveram sua expressão normalizada de acordo com a expressão do gene constitutivo *alaS*. Foi realizada análise estatística utilizando o teste t-student, para se obter um perfil de indução, repressão ou inalterabilidade de cada gene avaliado por PCR em tempo real em relação ao controle.

### **3.5. Clonagem, expressão e purificação da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551**

#### **3.5.1 Extração de DNA genômico**

A extração de DNA genômico de células de *A. ferrooxidans* linhagem LR e ATCC foi feita a partir de 1 L de cultura desta bactéria contendo meio T&K (TUOVINEN e KELLY, 1972) mantida a 30° C, sob agitação (250 rpm) por 24 horas. A extração de DNA foi feita utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

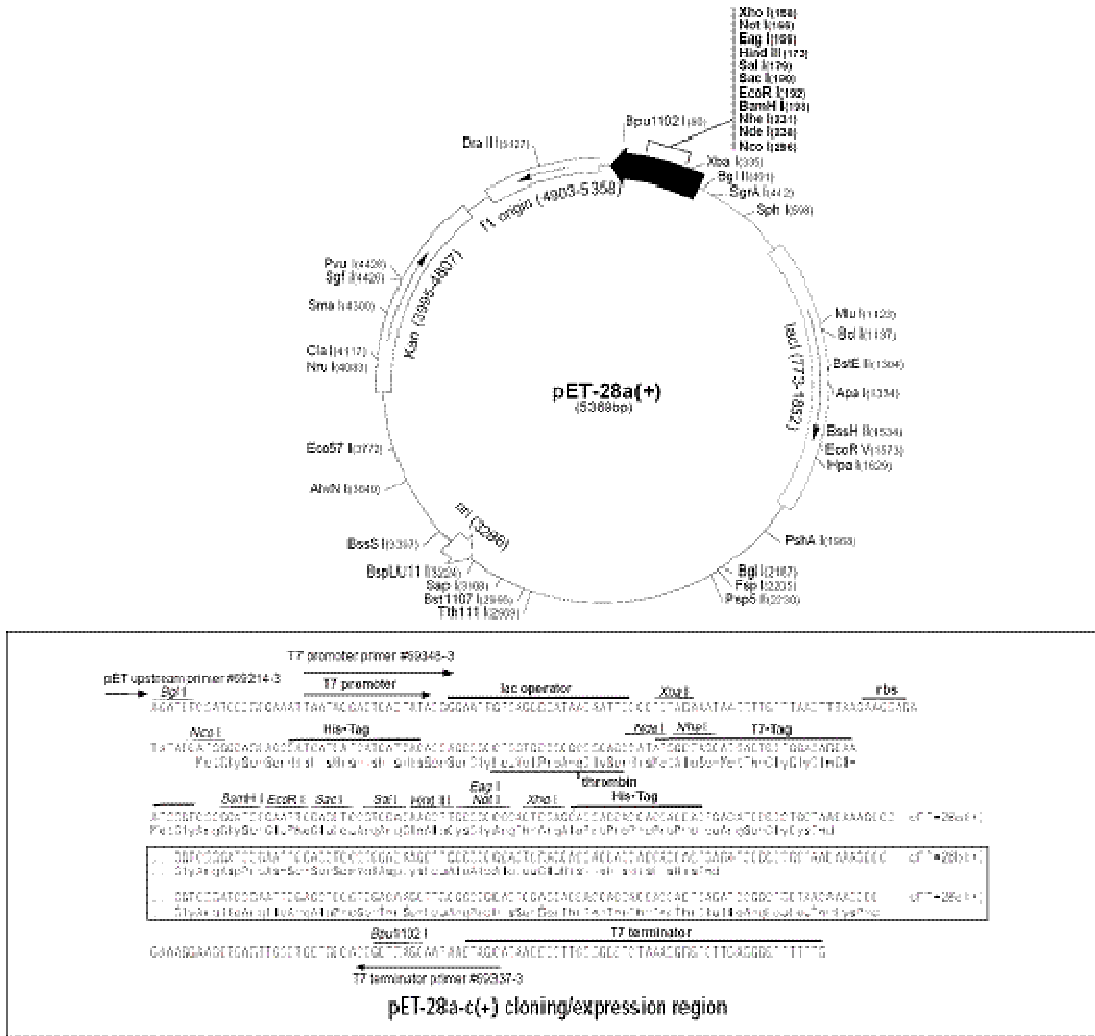
#### **3.5.2 Amplificação do gene de interesse**

Foi amplificado o gene no locus de interesse Afe\_0551 de *A. ferrooxidans* LR e ATCC utilizando um par de *primers* desenhados com base no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 disponibilizado pela TIGR (<http://www.tigr.org>). Com o propósito de se gerar produtos de PCR com extremidades coesivas ao vetor, o *primer sense* apresenta na extremidade 5' um sítio de restrição para a enzima *Nde I* (CATATG) e o *primer antisense* apresenta na extremidade 5' um sítio de restrição para a enzima *Hind III* (AAGCTT). A amplificação dos fragmentos de interesse foi feita como descrito a seguir: 1 µl de DNA genômico, 2,5 µl tampão High Fidelity 10X (Invitrogen),

0,75 µl MgSO<sub>4</sub> 50 Mm, 1,25 µl *primer* F, 1,25 µl *primer* R, 0,5 µl dNTP 10Mm, 0,125 µl Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e 17,625 µl H<sub>2</sub>O. O ciclo de PCR utilizado foi: 94° C – 3 min, 94° C – 1 min-58° C – 45 seg-72° C – 1 min (35 ciclos) e 72° C – 10 min. Após amplificação o produto de PCR foi testado em gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídio. Em seguida, foi purificado do gel utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR clean-up system* (Promega).

### 3.5.3 Clonagem no vetor de expressão pET28a

O vetor de expressão pET28a(+) (Novagen) foi gentilmente cedido pelo LNBio do LNLS, e o mapa do mesmo pode ser observado na Figura 5.



**Figura-5** Mapa do vetor de expressão pET28a. Novagen, pET System Manual, 2005.

O produto de PCR purificado do lócus Afe\_0551 e o vetor pET28a foram digeridos com as enzimas *Nde I* e *Hind III* de acordo com a seguinte reação: Vetor: 2 µl de DNA plasmidial (~1 µg), 2 µl de 10X *FastDigest buffer* (Fermentas), 1 µl de *FastDigest Nde I* (Fermentas), 1 µl de *FastDigest Hind III* (Fermentas) 14 µl H<sub>2</sub>O. A digestão foi mantida a 37° C por 15 minutos e depois inativada por 10 minutos a 80° C. Produto de PCR: 10 µl do produto de PCR, 2 µl de 10X *FastDigest buffer* (Fermentas), 1 µl de *FastDigest Nde I* (Fermentas), 1 µl de *FastDigest Hind III* (Fermentas) e 16 µl H<sub>2</sub>O MilliQ. A digestão do produto de PCR ocorreu por incubação a 37° C por 1 hora e depois inativação por 10 minutos a 80° C.

Após digestão com as respectivas enzimas de restrição tanto o produto de PCR, quanto o vetor foram purificados em gel de agarose 2% utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR clean-up system* (Promega). Após purificação, vetor e inserto foram ligados de acordo com a seguinte reação: Reação de ligação: 3 µl de vetor (~1,5 µg), 3 µl de inserto, 2 µl de tampão (Fermentas), 1 µl de T4 DNA ligase (Fermentas) e 11 µl H<sub>2</sub>O. A reação de ligação foi mantida *overnight* a 4° C.

### 3.5.4 Preparação de células competentes

O produto da reação de ligação foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5α preparadas de acordo com o protocolo a seguir (SAMBROOK *et al.*, 1989): as células *E. coli* DH5α foram crescidas em 5 mL de meio LB sem antibiótico a 37 °C por 18 h; no dia seguinte, foram inoculadas em 500 mL de meio LB e mantidas sob agitação de 250 rpm a 37° C, até alcançar uma OD<sub>590</sub> = 0,4; as células foram transferidas para tubos falcon e deixadas no gelo por 10 min; em seguida, foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 min a 4° C e ressuspensas em 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M gelado, permanecendo no gelo por 30 min; as células foram centrifugadas novamente a 3500 rpm por 15 min a 4° C e ressuspensas em 4 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M/ 10% de glicerol gelado; as células foram divididas em alíquotas de 100 µl em microtubos estéreis gelados, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -70° C.

### 3.5.5 Transformação

As alíquotas de células competentes de DH5 $\alpha$  previamente preparadas foram descongeladas em gelo e suavemente homogeneizadas. Foi adicionada a metade do volume da ligação gelada às células competentes, misturando-se suavemente e incubando-se no gelo por 30 min. Em seguida, aplicou-se nas células um choque térmico de 42 °C por 1 min e 30 seg. Após o choque térmico, as células foram deixadas no gelo por 3 min e adicionou-se 600  $\mu$ l de meio LB sem antibiótico. As células foram incubadas a 37 °C por 1 h; posteriormente, 100  $\mu$ l da suspensão de células foram semeados em placas contendo LB sólido e canamicina (30  $\mu$ g/ml).

### 3.5.6 Confirmação da presença de clones positivos

As colônias resistentes a canamicina foram testadas quanto à presença do plasmídeo recombinante. A confirmação dos clones positivos foi feita tanto através de PCR, utilizando os *primers* T7F e T7R, localizados no plasmídeo pET28a, quanto por mini-preparação de plasmídeo seguida de digestão. A reação de PCR foi feita diretamente das colônias resistentes a canamicina como descrito a seguir: 2,75  $\mu$ l tampão 10X (Invitrogen), 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 50 Mm, 0,5  $\mu$ l *primer* F, 0,5  $\mu$ l *primer* R, 0,275  $\mu$ l dNTP 10Mm, 0,5  $\mu$ l *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 19,475  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. O ciclo de PCR utilizado foi: 94° C – 5 min; 94° C – 1:30 min, 55° C – 1:30 min, 72° C – 2:30 min (30 ciclos) e 72° C – 5 min. Somente as colônias contendo clones recombinantes, ou seja, que continham o inserto do tamanho de interesse foram selecionadas para extração de DNA plasmidial e posterior seqüenciamento.

O isolamento do plasmídeo pET28a contendo o gene de interesse foi feito como descrito no protocolo a seguir:

1. Foi feito um pré-inóculo individual da colônia de interesse contendo 3 mL de meio LB com canamicina (30  $\mu$ g/mL) *overnight* com agitação a 37° C;
2. A solução de bactérias foi transferida para tubo de microcentrífuga e centrifugada por 5 min a 10000 rpm. Ao final da centrifugação a solução sobrenadante foi descartada;

3. O *pellet* foi ressuspendido em 100 µl da Solução I e vortexado;
4. Adicionou-se 200 µl da Solução II. Misturou-se gentilmente por inversão por 5 segundos;
5. Adicionou-se 150 µl da Solução III. Misturou-se gentilmente por inversão por 10 segundos;
6. Centrifugou-se por 5 minutos a 10000 rpm;
7. Coletou-se solução sobrenadante (contendo o DNA plasmidial) para outro microtubo *Eppendorf*;
8. Adicionou-se 700 µl de etanol absoluto (100%) e incubou-se por 5 min;
9. Centrifugou-se por 5 minutos a 10000 rpm;
10. Descartou-se o etanol e adicionou-se 500 µl de etanol 70%. Centrifugou-se por 5 minutos a 10000 rpm. Descartou-se o etanol e deixou-se o *pellet* secando a temperatura ambiente, ou no dessecador sob vácuo;
11. Ressuspendeu-se o *pellet* contendo o DNA plasmidial em 30 µl de TE, contendo 10 mg/ml RNase A.

**Solução I:**

<u>Componente</u>	<u>Concentração Final</u>
Glucose	50 mM glucose
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	25 mM Tris-HCl, pH 8,0
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA

**Solução II:**

<u>Componente</u>	<u>Concentração Final</u>
NaOH 1N	0,2 M NaOH
SDS 10% p/v	1,0% SDS

Fazer essa solução imediatamente antes de uso; não autoclavar

**Solução III:**

3 M KOAc, pH 5,5

### 3.5.7 Seqüenciamento dos clones

Após isolamento, os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados a fim de verificar se a clonagem havia sido direcional ou em *frame* e se as seqüências de nucleotídeos continham algum erro por comparação com a seqüência fornecida pela TIGR. Pelo menos 3 amostras de clones positivos foram amplificadas, utilizando para tal os *primers* do plasmídeo pET28a.

A reação de seqüenciamento foi feita de acordo com o protocolo a seguir: 1,5 µl plasmídeo (~400 ng), 2,5 µl *primer* (2,5 pmol/µl), 2,0 µl BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystem), 2,0 µl 5x *sequencing buffer*, 2,0 µl H<sub>2</sub>O. O ciclo de PCR utilizado foi: 95° C – 2 min; 95° C – 20 seg, 57° C – 10 seg, 72° C – 4 min (35 ciclos).

### 3.5.8 Testes de expressão protéica

Células de *E. coli* para expressão, linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS, foram preparadas para se tornarem competentes e foram transformadas com os plasmídeos recombinantes contendo o gene Afe\_0551. As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo os agentes de seleção canamicina (30 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml), este último apenas no caso da linhagem BL21(DE3) pLysS, sendo deixadas *overnight* em estufa a 37 °C. Uma colônia de cada tipo de célula foi escolhida e adicionada a dois diferentes tubos de cultura contendo 2 mL de meio LB líquido com os mesmos agentes de seleção anteriores. As células foram incubadas em agitador *overnight* a 37° C e 250 rpm. Este meio contendo as bactérias multiplicadas é denominado pré-inóculo.

Em 2 erlenmeyers com 30 mL de meio LB e os respectivos agentes de seleção para cada linhagem foram adicionados os pré-inóculos. A densidade óptica dos dois pré-inóculos foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm (DO<sub>600</sub>). Os novos meios de cultura foram deixados a 37° C sob agitação de 250 rpm até DO<sub>600</sub> 0,6. A seguir, induziu-se a expressão do gene Afe\_0551 adicionando-se IPTG (Isopropil β-D-1-Tiogalactopiranosídeo) para uma concentração final de 1 mM. Os meios de cultura foram deixados a 37° C e agitação de 250 rpm por 4 horas. Em seguida as células



foram coletadas e centrifugadas a 3000 rpm a 4° C por 15 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados bacterianos (*pellets*) foram armazenados a -20° C.

O *pellet* de células foi ressuscitado em 1 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 Mm pH 8, 1 Mm de PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride), 100 µg/ml de lisozima e 5% de glicerol) e transferiu-se a suspensão para um tubo *Eppendorf* de 1,5 mL. A solução foi incubada por 40 min em gelo e, posteriormente, sonicada por 5 ciclos de 30 segundos em potência 13, com intervalo de tempo entre as sonicações suficiente para o resfriamento. A eficiência da sonicação pôde ser constatada pela cor translúcida e menor viscosidade da suspensão. Centrifugou-se a suspensão a 10000 rpm por 10 min a 4° C. Tanto o sobrenadante (fração solúvel) quanto o *pellet* (fração insolúvel) obtidos após a centrifugação foram analisados em gel SDS/PAGE de acordo com LAEMMLI (1970).

### **3.5.9 Análise das amostras em gel de poliacrilamida 15%**

O gel de poliacrilamida é composto por duas partes: o gel de separação (*resolving gel*) que fica na parte inferior e o gel de empacotamento (*stacking gel*) que fica na parte superior. O gel de separação é composto por Tris-HCl 375 mmol/L pH 8,8; acrilamida/bisacrilamida 29:1 15% (v/v); SDS 0,1% (m/v); APS (persulfato de amônio) 0,1% (m/v) e TEMED 0,08% (v/v). O gel de empacotamento Tris-HCl 126 mmol/L pH 6,8; acrilamida/bisacrilamida 29:1 5% (v/v); SDS 0,1% (m/v); APS 0,1% (m/v) e TEMED 0,05% (v/v).

Foi aplicado no gel um volume final de 15 µl (10 µl da amostra mais 5 µl do tampão de amostra 3X - Tris-HCl 50 mmol/L pH 6,8; glicerol 45% e SDS 2%), previamente desnaturados por 5 min. O gel SDS-PAGE foi submetido a eletroforese de 120V por 2 horas e, em seguida foi corado em solução de Comassie Blue (0,25% de Comassie Blue, 10% de ácido acético e 50% de etanol) por 30 minutos e em seguida descorado através de trocas sucessivas da solução descorante (etanol 10% e ácido acético 5%) até visualização e contraste ótimo das bandas no gel.

### 3.5.10 Expressão da proteína em média escala

Para a produção da proteína codificada pelo gene no locus *Afe\_0551* em larga escala foram utilizadas bactérias competentes do tipo *E. coli* BL21(DE3). A transformação e indução das células foram feitas conforme descrito anteriormente, havendo mudanças apenas nas quantidades usadas: foram produzidos 10 mL de pré-inóculo e este foi utilizado na produção de 1 L de cultura bacteriana. Após 4 horas de indução com IPTG, o meio de cultura foi centrifugado em garrafas de polietileno a 4000 rpm a 4° C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* guardado a – 20° C para trabalhos posteriores. A expressão da proteína foi realizada na presença de ferro, sendo que não se observou nenhuma mudança na expressão pela adição deste elemento.

Para todos os experimentos de expressão foi feito um controle constituído por uma alíquota de bactérias crescidas até  $DO_{600}$  0.6, porém não induzidas a super expressão com IPTG. Isto foi feito para que se pudesse fazer uma comparação de bandas obtidas entre as frações expressas induzidas e não-induzidas e também para que se pudessem observar quais bandas correspondiam a proteínas de *E. coli*.

### 3.5.11 Purificação

A purificação da proteína foi realizada por IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) com resina de afinidade Ni-NTA (Quiagen, Alemanha). O *pellet* bacteriano foi ressuscitado em 30 mL de tampão A de afinidade (tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,2; glicerol 5% (v/v); NaCl 100 mmol/L) contendo 80 µg/mL de lisozima para auxiliar na lise das bactérias. O extrato foi deixado a 4° C por 1 hora e então submetido a 8 ciclos de sonicação de 30 s cada em potência 13, em intervalos de descanso de 1 min em gelo. O extrato foi centrifugado a 15.000 rpm a 4° C por 20 min. O sobrenadante (fração solúvel) foi incubado com 1 mL de resina de afinidade por 1 hora a 4° C sob agitação. A resina foi depositada em coluna de vidro e a proteína foi eluída com tampão A contendo concentrações crescentes de imidazol (5, 10, 20, 50,

100 e 200 mmol/L). As frações eluídas foram coletadas e analisadas por eletroforese em SDS-PAGE 15%.

### **3.5.12 Extração de corpos de inclusão**

Devido à proteína permanecer expressa em maior quantidade na fração insolúvel, o *pellet* obtido no passo anterior foi submetido a um protocolo modificado de extração de corpos de inclusão. A extração dos corpos de inclusão foi realizada em 3 etapas, sendo uma primeira sonicação em tampão A (tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 8.0; glicerol 10% (v/v); NaCl 300 mmol/L, 1 mM EDTA, 1 mmol/L PSMF). Uma segunda etapa de lise envolveu a lavagem dos corpos de inclusão em tampão A acrescido de 2 M de uréia e, finalmente a extração total dos corpos de inclusão na presença de tampão A acrescido de 8 M de uréia. O sobrenadante foi incubado com 5 mL de resina de afinidade por 1 hora a 4° C sob agitação. A resina foi depositada em coluna de vidro e a proteína foi eluída com tampão A contendo imidazol 500 mM. As frações eluídas foram coletadas e analisadas por eletroforese em SDS-PAGE 15%, para verificar a pureza da proteína. As frações mais puras foram submetidas a diálises sucessivas para o *refolding* da proteína.

A renaturação foi realizada em tampão A com gradiente decrescente de uréia de 6 a 0 M, com adição de 2 mM de DTT a temperatura de 4° C. Após as sucessivas diálises, a proteína renaturada foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel, em coluna Hiloal 16/60 pg200 para obtenção de proteína extremamente pura e monodispersa. A concentração de proteína foi determinada por espectroscopia de absorção UV-VIS em 280 nm utilizando coeficiente de extinção molar para Afe\_0551, calculado com base na composição de aminoácidos (KUIPERS e GRUPPEN, 2007).

### **3.6. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)**

Após a amostra ser submetida em filtração em gel, a mono-dispersividade foi analisada por Espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando o equipamento DynaPro-

99 Protein Solutions. A concentração da proteína foi 2 mg/ml em buffer Tris-HCl 20 mM e NaCl 100 mM pH 8 a 25° C. Os parâmetros hidrodinâmicos foram obtidos pelo software do equipamento.

### 3.7. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica analítica amplamente utilizada para identificar compostos e determinar seqüências de aminoácidos de peptídeos que podem ser comparados com seqüências depositadas em banco de dados. Esta análise foi utilizada para identificar e confirmar a proteína recombinante expressa e, realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). A confirmação foi alcançada através da seqüência de aminoácidos dos peptídeos gerados pela digestão trípica de amostras e de seus respectivos valores de massas.

As bandas do gel de SDS-PAGE foram incisadas e submetidas à digestão trípica de acordo com HANNA *et al.* (2000). Uma alíquota dessa mistura de peptídeos foi separada por cromatografia em coluna C-18 (100 µm x 100 mm) RP-UPLC (nanoAcquity UPLC, Waters) acoplado com espectrometria de massa nano-electrospray em um espectrômetro Q-ToF Ultima API mass (MicroMass/Waters) com velocidade de fluxo 600 nl/min. O gradiente foi 80% acetonitrila em 0,1% ácido fórmico por 45 minutos. O instrumento foi operado no modo “*top three*”, no qual um espectro MS foi obtido seguido por MS/MS do “*top three*” dos picos detectados com maior intensidade. O espectro resultante foi processado usando software Mascot Distiller 2.2.1.0, 2008, Matrix Science (MassLynx V4.1) e comparado contra banco de dados de proteínas (NCBI) usando o Mascot. Os peptídeos obtidos são apresentados na Tabela 4.

### 3.8. Medidas de UV-Visível

Para observar possíveis diferenças entre a proteína recombinante oxidada e reduzida e caracterizar a presença dos *clusters* Fe-S, foi realizada análise por

espectrofotômetro na faixa do UV visível. As medidas foram feitas a 25° C em espectrofotômetro Tecan Infinite M 200. As amostras de proteína oxidada e reduzida com concentração de 15 µM foram preparadas em buffer 10 mM Tris-HCl contendo 100 mM NaCl, a pH 8. A proteína oxidada foi obtida após incubação com persulfato de amônio (5 mM) por 30 minutos.

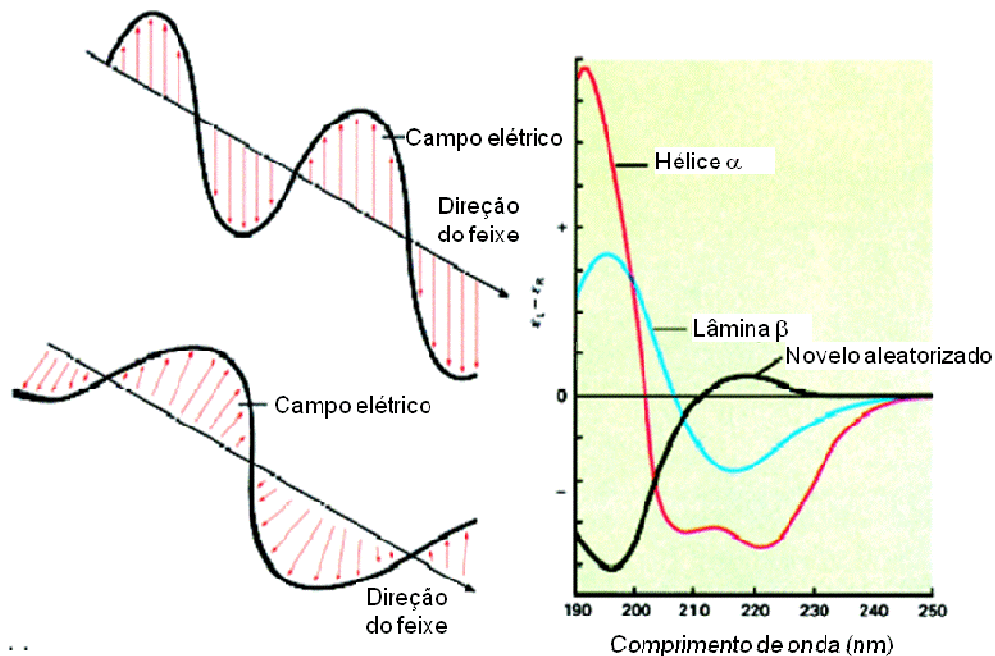
### 3.9. Experimentos de dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (*circular dichroism* CD) mede a propriedade que uma molécula quiral tem de absorver diferentemente a luz circularmente polarizada a direita e a esquerda (Figura 6). Peptídeos e proteínas são amplamente estudados por CD, pois eles possuem grandes quantidades de centros quirais (carbono  $\alpha$ ) distribuídos ao longo da cadeia principal em hélices alfa, folhas beta, estruturas desordenadas e voltas denominadas estruturas secundárias. Portanto, é possível caracterizar a estrutura secundária dessas macromoléculas e quantificá-las por seus espectros de CD. A região do UV-distante nos espectros de CD entre 180 nm e 260 nm fornece informações capazes de caracterizar e discriminar as estruturas presentes nestas moléculas (CAMPBELL e DWEK, 1984; SREERAMA *et al.*, 1999; NELSON e COX, 2003).

A espectroscopia de CD em proteínas é uma ferramenta muito utilizada no estudo de mudanças conformacionais induzidas por interações da proteína com ligantes específicos e solventes, assim como verificar alterações ocorridas em função da temperatura, do pH, da força iônica e monitorar fenômenos de desnaturação e renaturação na interação com ligantes (GREENFIELD, 2006). A estimativa do conteúdo da estrutura secundária de uma proteína é feita com base em um grupo de proteínas de referência que possuem estrutura secundária e espectros de CD conhecidos.

As medidas de CD foram realizadas a temperatura controlada de 25 °C utilizando o espectropolarímetro JASCO J-810 no laboratório de espectroscopia e calorimetria do LNLS, na faixa de 195 nm a 260 nm em cubetas cilíndricas de quartzo de caminho óptico de 1 mm. Para medidas no UV próximo, na faixa de 250 nm a 800 nm foram

utilizadas cubetas cilíndricas de quartzo de caminho óptico de 10 mm (para esta medida a concentração de proteína foi de 57  $\mu\text{M}$ ). Os espectros de CD foram recuperados empregando-se médias de 20 varreduras. As contribuições dos tampões foram subtraídas e os espectros de CD corrigidos a fim de eliminar quaisquer efeitos de ruído.



**Figura-6** (a) princípio da técnica de dicroísmo circular. (b) espectro de CD de vários tipos de estrutura secundária.

A solução protéica proveniente da purificação em coluna de afinidade devidamente dialisada e renovada foi utilizada para analisar a integridade da estrutura secundária nas condições de extração e para monitorar as mudanças conformacionais induzidas por influência do pH através de medidas de CD. A concentração das amostras foi de 9  $\mu\text{M}$  em tampão de Tris-HCl 20 mM contendo NaCl 150 mM. As amostras foram incubadas por 24 h em soluções tamponadas a pH variando de 1 a 13. A elipticidade molar foi calculada de acordo com CORRÊA e RAMOS, 2008.

Análises preditivas do conteúdo de estrutura secundária a partir da seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551 foi realizada pelo programa PHD (Figura 35). As contribuições de estrutura secundária pelos espectros de CD da proteína recombinante, foram calculadas utilizando o programa CDNN (ROST *et al.*, 2004).

### **3.10. Experimentos de desnaturação térmica**

Os estudos de desnaturação térmica foram caracterizados por CD, na faixa do UV distante no laboratório de espectroscopia e calorimetria do LNLS. As medidas de CD foram realizadas em espectropolarímetro Jasco J-810 equipado com sistema controlador de temperatura usando cubeta de 1 mm de caminho óptico (certificadas por Hellma). As amostras incubadas nos diferentes pHs foram utilizadas para medir as mudanças de elipticidade a 208 nm (ou 222 nm quando for necessário) induzidas pelo aumento de temperatura de 10° C a 110° C com taxa de aquecimento de 0,5° C por minuto, obtendo o espectro de CD, média de 20 varreduras a cada 5° C. A concentração de amostra protéica foi mantida a 9 µM.

A temperatura de transição aparente entre o estado enovelado a desenovelado (**T<sub>m</sub>**) em todos os pHs, foi determinada pela análise direta do sinal de elipticidade molar obtido na medida de CD vs temperatura, e a curva resultante ajustada pelo programa Origin® usando equação de ajuste sigmoideal.

### **3.11. Experimentos de desnaturação química**

Os estudos de desnaturação química foram caracterizados por CD, na faixa do UV distante no laboratório de espectroscopia e calorimetria do LNLS. As medidas de CD foram realizadas em espectropolarímetro Jasco J-810 usando cubeta de 1 mm de caminho óptico (certificadas por Hellma). As amostras incubadas em pH 2, 8 e 12 foram utilizadas para medir as mudanças de elipticidade a 222 nm induzidas pelo aumento de guanidina-HCl de 1 M a 7 M, obtendo o espectro de CD, média de 20 varreduras. A concentração de amostra protéica foi mantida ao redor de 9 µM. As amostras com concentrações crescentes de guanidina-HCl foram incubadas por 30 minutos antes da medida de CD. Os controles foram realizados com tampão, adicionando cada concentração de guanidina-HCl utilizada para as amostras, com o objetivo de subtraí-los dos espectros obtidos nas correspondentes amostras com proteína.

### 3.12. Experimentos de Fluorescência

A espectroscopia de emissão de fluorescência é largamente utilizada para caracterizar macromoléculas biológicas e verificar mudanças conformacionais discretas no microambiente dos grupos fluorescentes naturais (fluoróforos) como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). A fluorescência destes resíduos é altamente sensível ao ambiente em que se encontram, por tanto, é possível monitorar suas alterações por parâmetros como posição do máximo de emissão ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e rendimento quântico ( $\phi_F$ ) devido à ação de solventes, ligantes, supressores, íons ou agentes solubilizantes (LAKOWICZ *et al.*, 1999).

As medidas de emissão de fluorescência da proteína recombinante, codificada pelo gene no locus Afe\_0551, foram realizadas no modo estático utilizando-se o espectrofluorímetro K2 (ISS Multifrequency Phase Fluorometer), com o objetivo de analisar possíveis mudanças conformacionais induzidas por influência do pH e pela adição de ferro. Os espectros de fluorescência foram obtidos a temperatura controlada de 25 °C. As amostras foram excitadas a 295 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm. A concentração das amostras foi de 5  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM. Nas medidas foram utilizadas cubetas retangulares de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A fim de minimizar o efeito de espalhamento de luz, os espectros de emissão de fluorescência dos tampões foram subtraídos dos espectros das correspondentes amostras.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise de Bioinformática

Os alinhamentos foram realizados com ajuda dos programas BLASTP e ExpaSy, sendo que as espécies selecionadas, alinhadas com o programa BioEdit, apresentaram a maior porcentagem de identidade para cada proteína codificada pelos genes em estudo.

Identidade é a extensão em que duas seqüências (seja de nucleotídeos ou aminoácidos) são invariantes, enquanto que a similaridade é a escala em que as seqüências de proteínas são relacionadas e, esta é baseada tanto na identidade como na conservação. Por último, conservação se refere à mudança na seqüência de aminoácidos que preservam as propriedades físicoquímicas do resíduo original.

#### 4.1.1 Genes *tad A, B e C*

Em geral, as proteínas codificadas por estes genes têm vários domínios conservados. A proteína codificada pelo gene *tad A* (Figura 7) apresentou sítio ativo entre os aminoácidos 200 e 375, aproximadamente. As porcentagens de identidade e similaridade foram de 58,5% a 59,7% e de 71,2% a 73,5% respectivamente. As proteínas codificadas por *tad B* (Figura 8) e *tad C* (Figura 9) apresentaram domínios conservados pelas funções de “*pilus assembly*” entre os aminoácidos 115 e 290 aproximadamente para a Tad B e entre os aminoácidos 70 e 305 aproximadamente para a Tad C. As porcentagens de identidade e similaridade encontradas foram entre 34,5%-36% e 51%-56% e 35%-39,5% e 51%-55%, respectivamente.

```

AFE_0403      : MIDDSEFGAQPFDMAIKALNQDQAYQQFRGYLELLLRVBEIAGAPAEIISRGAVYRFVSLLEDRMAERPEYENBQTEVLINCLTDELKMGSELETALRDEFEVEDILLVNSPREILG : 120
Rmet_3656    : MTDALRFSNN----AAAPFVSCFFPMIRELAHEHLLRIBELGAEFGFRMSRAAQRVLDLESESTRIRRIEINBAELRQISALTLRELACGGTEEDLLNDEFAVEDILLVNGHMVVVS : 115
BPSL1893     : NAHDIQPAD-----GAPFSQTCQFDIRNAHEHLLRIBELGAEFGFRMSRCAINCFVDLEIDSEVRIIRIIPDNEMEVRAIASALTLRELACGGTEEDLLADEPHVEDILLVNGHMVVVS : 114
Bcep18194_A4663 : NAHDIQPAD-----GAPFSQTCQFDIRNAHEHLLRIBELGAEFGFRMSRCAINCFVDLEIDSEVRIIRIIPDNEMEVRAIASALTLRELACGGTEEDLLADEPHVEDILLVNGHMVVVS : 114
Reut_B5411   : MTDALRFSNN----AAAPFVSCFFPMIRELAHEHLLRIBELGAEFGFRMSRAAQRVLDLESESTRIRRIEINBAELRQISALTLRELACGGTEEDLLNDEFAVEDILLVNGHMVVVS : 115

                                     + ****                               Dominio ATPase ->
AFE_0403      : RKCTLEHSDLVFQDEAHIMRITIVRLLGATGRVDESESPVDARLSNVGRINVVIEPLALNGPVIISIRRFPAHPTRAEOLLEKATLNAPELQFLRPAVRAARCNIIVSGGTS3GKTSLLNVI : 240
Rmet_3656    : RHGVLERIIVRPAAGCHLLRIVRRLAPIGRRIDESNEMVDARLPDGGGRINVIIEPLALNSPVVSIKRFKDDPLTEDDLQTLGSMSEPEITBHDAAVRAARCNIIVSGGTS3GKTSLLNVI : 235
BPSL1893     : KHCHLTKLIVRFTONAHLLRIVRRLAPIGRRIDESNEMVDARLPDGGGRVWVVIIEPLSISDPVVSIRKFRKDKPKADOLLANGCFNDEISGALRDAVRAARCNIIVSGGTS3GKTSLLNVI : 234
Bcep18194_A4663 : RHCHLSRLIVRFTONAHLLRIVRRLAPIGRRIDESNEMVDARLPDGGGRVWVVIIEPLSISDPVVSIRKFRKDKPKADOLLANGCFNDEISGALRDAVRAARCNIIVSGGTS3GKTSLLNVI : 234
Reut_B5411   : RHGVLERIIVRPAAGCHLLRIVRRLAPIGRRIDESNEMVDARLPDGGGRINVIIEPLALNSPVVSIKRFKDDPLTEDDLQTLGSMSEPEITBHDAAVRAARCNIIVSGGTS3GKTSLLNVI : 235

                                     <-----ATPase----->
AFE_0403      : ASPTSDPERVVTIEDTAELEIQSRHVVRLESRPGGHDGAGVNVNDRLLRNLFRMRPDRIVGVEVRGGELEMMQANMTCGHDGSMGTTHASPRECDLREMLAGFAGFGGSECSIRRQIA : 360
Rmet_3656    : ATPISDERVVTIEDTAELELNHHPVVRLESRPGGDECTGVNTRDLLRNLFRMRPDRIVGVEVRGGELEMMQANMTCGHDGSMGTTHASPRECDLREMLAGFAGFGGSECSIRRQIA : 355
BPSL1893     : AFHLSGERVVTIEDTAELELNHHPVVRLESRPGGDECTGVNTRDLLRNLFRMRPDRIVGVEVRGGELEMMQANMTCGHDGSMGTTHASPRECDLREMLAGFAGFGGSECSIRRQIA : 354
Bcep18194_A4663 : AFHLSGERVVTIEDTAELELNHHPVVRLESRPGGDECTGVNTRDLLRNLFRMRPDRIVGVEVRGGELEMMQANMTCGHDGSMGTTHASPRECDLREMLAGFAGFGGSECSIRRQIA : 354
Reut_B5411   : ATPVLSGERVVTIEDTAELELNHHPVVRLESRPGGDECTGVNTRDLLRNLFRMRPDRIVGVEVRGGELEMMQANMTCGHDGSMGTTHASPRECDLREMLAGFAGFGGSECSIRRQIA : 355

AFE_0403      : SAIDLIVQIQRSLNCGRRRIISVFEVTCGDNIILATQELYRHEEVRVNDCTNSDMMCSIGLHPH3PKLARFR-----EBSSEKDFQWLE- : 444
Rmet_3656    : NAIDLIVQIQRSLNCGRRRIISVFEVTCGDNIILATQELYRHEEVRVNDCTNSDMMCSIGLHPH3PKLARFR-----EAN--E3LDDRIDL : 438
BPSL1893     : NAIDLIVQIQRSLNCGRRRIISVFEVTCGDNIILATQELYRHEEVRVNDCTNSDMMCSIGLHPH3PKLARFRQALS--GGFGGGEPYGRGGGNV : 447
Bcep18194_A4663 : NAIDLIVQIQRSLNCGRRRIISVFEVTCGDNIIVTQELYRHEEVRVNDCTNSDMMCSIGLHPH3PKLARFRNTLVSSGGGFGGN--FGRGGGNV : 447
Reut_B5411   : NAIDLIVQIQRSLNCGRRRIISVFEVTCGDNIIVTQELYRHEEFTPQDCTNSDMMCSIGLHPH3PKLARFR-----EPGGGEMMDRDIDV : 440

```

**Figura-7** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0403 com proteínas Tad de *Ralstonia metallidurans* (Rmet\_3656), *Burkholderia pseudomallei* (BPSL1893), *Burkholderia* sp. (Bcep18194) e *Ralstonia eutropha* (Reut\_B5411). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (2,6e – 9,6e).

Os gêneros de bactérias mais comuns que alinharam com os genes *tad* de *A. ferrooxidans* foram: *Ralstonia* e *Burkholderia*. Essas bactérias se caracterizam por sua adaptação e sobrevivência em ambientes que contêm metais pesados. *Ralstonia* tem sido utilizada na biorremediação de sítios contaminados com resíduos industriais (NIES, 2000). Por outro lado, espécies de *Burkholderia* poderiam ser utilizadas na degradação de compostos xenobióticos.

```

afe404      : -MMALGLIVSALLLGLIAAGVMTSFRQREAFPDALRERLRAFDHTGKAG-----DTESAQDLDLHAAARYKES---FLLQAEWIRACITREKSYLPKAAIVGLLITLILL : 106
NT04BC1134 : -----MIALMPALITCAAAGLIMWGSQVREGRHAQRFFD8RVGQGARPAASAGDTRTRARAPAAAGTANPQEPPEQGFARWRASAFNAITVLSDRAGLDEVNAGLVL8LAIVVLLATWGM : 114
NT01REA2286 : -MSSATLLLAAMAVGVTSLGGLMLANAQARARKEQADAFVRAQTEQ-VR-----LRYAAGQDPQLQPARDLKRR-----EDFIRPADIVENRRTYVKGWGPCVLLTALIA : 101
NT01RMA0052 : M1SSASLFIAMAMIMVGLLMLAAARS8RAEDARAHLTAQTEQ-VR-----ARYATVSDPTPQSATRDLRRR-----DDLMRPADIKETERTYLVVGVEMLAVVGGAI : 102
NT01BB1809 : -MSLMAMLLCATALLAAAAMLRQARDGARRQASEAFLEKQELR-----PGQPEASQAPAARRRLEISNG-----ARQLLLRAGVETPRFLAASVGAHGVLPALMVL : 101

```

```

afe404      : VSDMLALMFTLIFYPALMGHIRYRIGLRSAAILALECFLLDANVRASRVGASLPAALLSATKDAHCEVVEVFNQIMRRQSGTPIDCAMITVVKRYQMCRJAIITATVRLIMRNGGRTD : 226
NT04BC1134 : AGCVLAAAMAVAGSVIIVMITSRISRRRLKIVROLESFLLDGIIVRLVILGNSVBAAPQSAIQTAEMPTPRCDDVSRMLRSGVDIDRAMIHIAHYRIRREFELVGAIVL8VVRGGRTD : 234
NT01REA2286 : SGCVLGAAAMAVVCAAVSAFVLNVRIRIQKMLLQLECFLLDGVVRMIMIGSSVBAAPQNSIANTDAPRQCLVQAVHLQKACKELDCAVIQMGRYIHLQELVLLASVRL8VVRGGRTD : 221
NT01RMA0052 : AGGIGAGMIMVMTLLCFVWLIRIRIKERMLROLECFLLDGVVRMIMIGSSVBAAPQNSVANTEPEPRQCLVQVHILQKACKELDCAVIQMGRAYDDPEVIV8SVRL8VVRGGRTD : 222
NT01BB1809 : FCGWISAAAMLLVVALWYFHLKADRRRRMWHQETPELDAIVRLIILGNSVBAAPQNALG8VCEPELEVIQRAD8QVRSCKDDAALHQVSRQYQELRFLV8AVIALALR8GRTD : 221

```

```

afe404      : VVIERIDMIRGRVMAQAFEMASAEIRLIGALITSLMIPGLALYIVLIMHSLQGMMAVSTERMILVAGGTLVTEVVLINRMKLR : 313
NT04BC1134 : VMLDRMSTFMRLEQCAERELSAMSAEIRLIGAVIALDEIIVAVG8FVIATSPRMFTAMMDACRQIVYL8FVQAI8GFMFRDARLR : 321
NT01REA2286 : VMERTDAFMRDR8CAQREIMASAEIRLSAMIL8LELVVGGGLPVLAGVLMMDPE8CKMILTAL8EIA8AFML8YR8ARSI : 308
NT01RMA0052 : VMERTDAFMRDR8CAQREIMASAEIRLSAMIL8LELVVGGGMFV8AGVLLMMDPE8GRAMILTAC8EV8A8FL8YR8ARSI : 309
NT01BB1809 : QVLERMAAFMRLEQCAERELTASAEVRL8AMIL8LEI8GL8L8IIF8NOL8FM8G8H8EM8CF8RL8V8F8MIL8Q8G88Y8L8YR8AR8V : 308

```

**Figura-8** Alinhamento múltiplo da sequência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0404 com proteínas Tad de *Ralstonia eutropha* (Reut\_B5412), *Ralstonia metallidurans* (Rmet\_3657), *Burkholderia cenocepacia* (Bcen\_1044) e *Bordetella bronchiseptica* (BB1829). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (1,2e – 5,6e).

```

AFE_0405    : -----MLNLHALITADAVASTALAVLLGVFFWYAYRLVMI8RARSAMD8V8P-----KLE8G8SE8P8E8VA8AQ8MER8GPL8AN8VR8W8D8L8DR8W8---- : 78
NT01RSA108 : M1D8S8LL8T8L8S8T8A8M8A8GL8LV8F8G8T8A8V8H8A8V8M8H8R8S8V8R8K8D8T8A8I8S8V8R8A8A8G8T8Q8A8V8P8-----AG8V8S8A8E8K8P8I8P8Q8A8Q8T8Q8Q8A8V8R8V8Q8R8M8I8D8I8G8T8C8H8R8I8 : 92
BTH_12538  : M1D8S8RL8G8A8I8A8LV8G8A8I8G8V8M8L8A8A8I8M8Q8A8V8I8A8R8T8G8R8T8L8A8I8--D8C8R8A8A8E8A8A8A8R8A8T8G8A8A8S8A8A8S8A8A8P8A8A8E8A8A8H8A8R8R8S8R8F8A8T8L8D8R8A8G8F8G8M8I8L8D8T8R8L8K8Q8I8 : 107
BMA_1286   : M1D8P8R8L8G8A8I8A8LV8G8A8I8G8V8M8L8A8A8I8M8Q8A8V8I8A8R8T8G8R8T8L8A8I8--D8C8R8A8A8E8A8A8A8R8V8A8A8G8A8A8A8A8A8R8--A8G8A8A8R8--A8G8M8P8A8A8E8A8A8R8R8P8F8A8L8L8D8R8A8G8F8G8M8I8L8D8T8R8L8K8Q8I8 : 104
ntbp1867   : M1D8P8R8L8G8A8I8A8LV8G8A8I8G8V8M8L8A8A8I8M8Q8A8V8I8A8R8T8G8R8T8L8A8I8--D8C8R8A8A8E8A8A8A8R8V8A8A8G8A8A8G8A8A8A8R8--A8G8M8P8A8A8E8A8A8R8R8P8F8A8L8L8D8R8A8G8F8G8M8I8L8D8T8R8L8K8Q8I8 : 106

```

```

AFE_0405    : -SGEDARITLLRAGYRRPAAP8T8F8N8T8R8F8L8P8V8V8V8V8T8E8H8L8L8A8P8H8M8I8L8T8F8W8S8L8A8V8A8V8Y8L8P8F8I8E8S8F8K8S8R8G8D8A8W8A8E8I8F8F8V8D8M8I8L8L8Q8V8G8L8S8L8Q8S8 : 185
NT01RSA108 : V8E8E8D8R8K8L8E8C8G8Y8G8E8Q8A8R8V8E8G8T8R8L8L8P8--F8L8C8V8G8V8Y8----A8A8S8P8R8E8A8--L8N8G8F8A8L8G8Y8L8A8P8M8L8A8R8K8E8S8R8R8R8D8E8L8P8W8V8D8M8I8L8L8Q8V8G8L8S8L8D8Q8S8 : 194
BTH_12538  : V8A8E8D8R8M8L8E8C8G8Y8D8A8H8T8R8G8I8F8S8A8R8I8A8C8S8A8E8A8A8A8V8L8G8----S8A8T8V8R8T8H8I8G8A8V8A8L8S8V8T8A8G8F8M8I8P8R8I8Y8V8R8R8A8A8A8R8Q8S8V8V8E8M8P8L8I8V8D8M8I8L8L8Q8V8G8L8S8L8D8Q8S8 : 211
BMA_1286   : V8A8E8D8R8M8L8E8C8G8Y8D8A8H8T8R8G8I8F8S8A8R8I8A8C8A8L8E8A8A8A8V8L8G8----G8E8P8V8R8T8H8I8G8A8V8A8L8S8V8T8A8G8F8M8I8P8R8I8Y8V8R8R8A8A8A8R8Q8S8V8V8E8M8P8L8I8V8D8M8I8L8L8Q8V8G8L8S8L8D8Q8S8 : 208
ntbp1867   : V8A8E8D8R8M8L8E8C8G8Y8D8A8H8T8R8G8I8F8S8A8R8I8A8C8A8L8E8A8A8A8V8L8G8----G8E8T8V8R8T8H8I8G8A8V8A8L8S8V8T8A8G8F8M8I8P8R8I8Y8V8R8R8A8A8A8R8Q8S8V8V8E8M8P8L8I8V8D8M8I8L8L8Q8V8G8L8S8L8D8Q8S8 : 210

```

```

AFE_0405    : L8A8S8A8C8T8S8E8A8G8I8P8L8L8A8G8E8N8R8E8M8G8H8I8A8G8R8P8R8E8A8M8O8K8L8A8E8Q8L8G8E8D8F8E8L8V8M8L8R8Q8I8E8R8F8G8D8V8A8Q8L8R8D8F8A8G8R8D8E8R8R8Q8M8A8L8R8E8R8V8K8L8N8V8R8M8T8A8W8M8I8T8L8P8A8L8 : 293
NT01RSA108 : L8Q8V8T8A8N8E8H8E8M8L8P8V8L8A8E8F8E8R8A8N8Q8P8A8S8R8S8R8E8Q8I8L8R8I8A8R8L8F8D8N8E8L8K8L8I8L8L8Q8V8D8R8F8G8A8V8O8E8P8L8R8Q8F8L8R8L8Q8E8N8R8S8R8K8E8R8V8G8K8L8V8K8M8T8V8M8I8T8L8P8A8L8 : 302
BTH_12538  : I8Q8V8T8N8D8R8E8M8L8P8V8L8S8E8I8G8I8A8Q8R8Q8V8A8G8R8T8R8E8Q8L8Q8L8A8T8S8F8D8N8E8L8R8A8I8V8R8L8L8Q8V8D8K8G8G8A8V8O8E8P8L8R8Q8F8D8R8L8E8V8R8R8A8M8L8R8E8R8I8G8R8L8V8K8M8T8V8M8I8T8L8P8A8L8 : 319
BMA_1286   : I8Q8V8T8N8D8R8E8M8L8P8V8L8S8E8I8G8I8A8Q8R8Q8V8A8G8R8T8R8E8Q8L8Q8L8A8T8S8F8D8N8E8L8R8A8I8V8R8L8L8Q8V8D8K8G8G8A8V8O8E8P8L8R8Q8F8D8R8L8E8V8R8R8A8M8L8R8E8R8I8G8R8L8V8K8M8T8V8M8I8T8L8P8A8L8 : 316
ntbp1867   : I8Q8V8T8N8D8R8E8M8L8P8V8L8S8E8I8G8I8A8Q8R8Q8V8A8G8R8T8R8E8Q8L8Q8L8A8T8S8F8D8N8E8L8R8A8I8V8R8L8L8Q8V8D8K8G8G8A8V8O8E8P8L8R8Q8F8D8R8L8E8V8R8R8A8M8L8R8E8R8I8G8R8L8V8K8M8T8V8M8I8T8L8P8A8L8 : 318

```

```

AFE_0405    : I8T8A8G8P8A8V8L8L8L8R8F8D8K8M8G8---- : 312
NT01RSA108 : I8T8A8G8P8F8M8S8V8T8R8S8H8H8Q8P8G8G8R8 : 326
BTH_12538  : I8V8T8A8G8P8E8M8L8A8V8H8A8L8T8A8A8R8---- : 339
BMA_1286   : I8V8T8A8G8P8E8M8L8A8V8H8A8L8T8A8A8R8---- : 336
ntbp1867   : I8V8T8A8G8P8E8M8L8A8V8H8A8L8T8A8A8R8---- : 338

```

**Figura-9** Alinhamento múltiplo da sequência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0405 com proteínas Tad de *Ralstonia solanacearum* (RSp\_183), *Burkholderia thailandensis* (BTH\_12538), *Burkholderia mallei* (BMA\_1286) e *Burkholderia pseudomallei* (BPSL1891). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons na cor cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (1,3e – 9,5e).

## 4.1.2 Genes Pilinas e Pilus tipo IV

### 4.1.2.1 Locus Afe\_2078

Como pode ser observado na Figura 10, o gene no locus Afe\_2078, que codifica uma pilina tipo IV, apresenta um grau de conservação muito baixo, sendo que a porcentagem de identidade ficou entre 25,7%-33,7% e a porcentagem de similaridade entre 42,3%-48,9%. Entre as espécies que apresentaram similaridade com a proteína de *A. ferrooxidans* está *Pelobacter carbinolicus* que é um microrganismo redutor de metal capaz de oxidar enxofre elementar tendo o íon férrico como o único elemento acceptor de elétrons (LOVELEY *et al.*, 1995). Provavelmente, a baixa identidade encontrada para esta proteína, seja devida a que as Pilinas estão relacionadas com cada grupo de bactérias, de acordo, com o ambiente e as propriedades fisiológicas, como patogenicidade, que compartilham (LU *et al.*, 1997). Assim sendo, *A. ferrooxidans* seria uma espécie pouco relacionada com as outras espécies no alinhamento.

```

Afe2078 : -MRHADGSE---TGGTTEELLVALVICTLLATAVFTFLNSSQITINQSSSTDMQORGNLALVRQAVESAGFGLPQLSDCPNGIAAYNSQNTAS-----PFSL : 96
Daro : MGLHKRSVKLDKQKPGVVEMLVALVVLVLTSLAIMBVGVEFGQKRTTAGADACTNGTVLYSITRDLMAGYG-----LIPKDSPLKCN----- : 87
Pcar : -MPIGFTITGNRSRSTSLIDNMLMLLMLLGGVYRIISTTTSTVRFEEELSNIJENGFPMFELTRDTRQTEY----RG@AGSGVSVVNTLNAG-----AGAL : 94
Gmet : -----MGGYTLVBLVVLVIVLAVISAGLSTVITGQREYGVREATIRMQQARQMNEMERELKNTGYG-----LMDMGDLTVKVKYKSSG-----A : 81
Lphi : -MNIKYRLQ---CGSSVVEMLITLVLLITYSILQIYLAQTLQYKASNSQDLICSTENAI SNLLIFMIRSAQF-----AGCG-SITTAVSSLNAGGPRPLGILNTPPTIL : 101

Afe2078 : TAITASVQSSGTYDPTNTSNIINTYSLMTVA@GASFGNAP-AAQISSIPSMASQRVFLTATAFINSGDMFIVQIPGQACLMAQVTNLLTQNGIGVHNSGLSN--YNESSG : 204
Daro : -----PVPTLDGINLLPVRIANGSSGAG@SIAIRFGRSPMAGVPTTVVG-----VTVATNLTVDNNLGCGVGDAAALPINGAVCKMAHVIG-----VSLAAPT : 175
Pcar : PFDRAVEGYDDVADPNAADFVAMGITPTIISDVLILRKMDSVMVVEIVEQMP-----DTSADIKITGGINPAPIADFDIVMVSDCAAAVFQVINYTDGGGSIKAD : 196
Gmet : IFSWQVVEASDGGTEPDSIKVLYSGAESDVEYDYIVSVVDHPTSSALMLVSAVG-----SVPPSRTLNDDFIKGDLFLVYDPSDP@KPTRFQATN-----VTAPDK : 177
Lphi : MGYNGSGASFTTITQSNPANSTNASHMSPALDSTLVGNAQCGSDVLVVLGSDTSYPTGITAIIDPGSNTPVVOGTSGMSLTSGMFGAVSDCGKTVLPIQIT-----GVAGTT : 206

Afe2078 : PQTLAGAIYEGLSSTAFVGNPFDLGSNNFTINQPTI@DSGGTATPTLYLQYANTQ-TTSTROALAREVVDLQLE@GLGING--AITQWVLPANYTPSATQOILAVRIA : 312
Daro : FTGVTLDVAVAATDVGSKLSCLGPMQCFAYDVTAGNLRVNADPRVSGIFSIQAQYG-----ISNASSDNQACWTDVAVGGCGG---ADMNSLASLAPTVNRIRKAVRIA : 276
Pcar : VVHNS@VGS@GNATKDLGHSFGPGAELAKMTTYVYFIS@TNADGEPGLYKVS@G-----VA@ELV@G@I@S@M@Q@I@Y@G@I@D@S@D@R@D@I@S@Y@V@T@A@--G@V@D@W@T@V@L@A@R@V@G@ : 297
Gmet : IHHNPGYNESSGGTLDVAYGVGSKVLNLRMQAKSVSYSDARONLIKTVEDLSLIDPPANQRTKIVAS@VEDLQIRYQFKDGT-----MKNAGD-P@F@V@A@K@L@R@I@Q@V@S@ : 281
Lphi : ITHDA@AGVLQNASASSAFPVNFQTSQIFPIQQTAFV@G@G@G@S@Q@S@L@M@R@S@L@V@G@N@----N@W@T@Q@L@V@E@V@E@I@M@K@V@Q@G@I@G@N@G@--V@I@T@R@Y@S@N@--A@V@T@D@W@A@Q@V@Y@I@R@L@G@ : 308

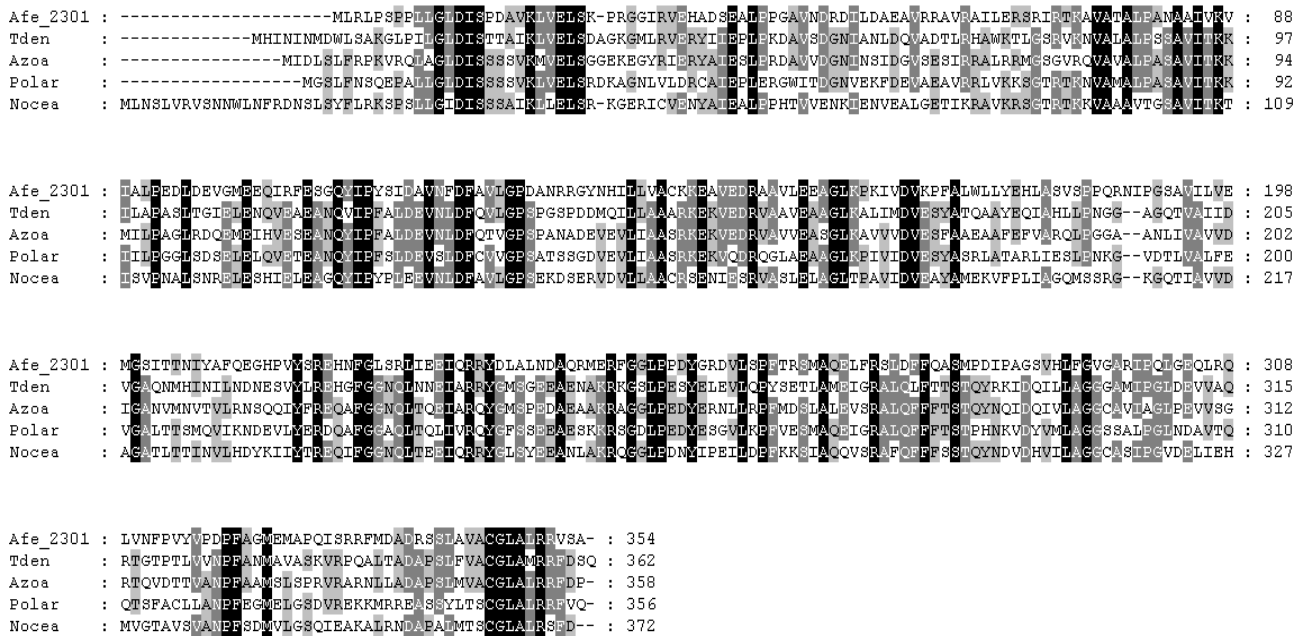
Afe2078 : M@ARSTRYMPNETSPASFIMLPHQ@LSYTVPT@NGF@G@C@L@Q@D@C@R@H@Y@A@H@L@E@S@V@V@P@V@R@N@I@W@G@G@P@-- : 377
Daro : I@ARSEL@R@R@D@V@S@G@D@P@M@T@G@G@P@A@V@T@I@A@G@E@D@R@-----F@Y@R@Y@V@E@E@I@L@P@R@N@T@V@M@A@K@E@T@L@ : 332
Pcar : L@L@V@S@M@D@E@V@L@R@G@E@V@D@A@A@Y@T@L@N@G@T@N@I@A@A@N@D@R@-----L@R@Q@V@T@T@V@A@L@R@N@R@L@P@----- : 346
Gmet : I@I@V@R@T@E@K@P@D@P@R@Y@P@G@S@L@Q@L@T@G@S@Y@G@N@G@V@K@N@S@A@G@-----Y@R@M@M@S@T@I@Y@V@R@N@L@G@F@R@D@--- : 333
Lphi : P@I@I@A@G@--Q@L@G@S@S@L@T@R@Q@Y@N@V@L@D@T@Q@V@T@P@A@D@N@R@-----L@R@H@E@L@T@I@N@R@N@S@T@S@----- : 355

```

**Figura-10** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2078 com pilinas tipo IV de *Dechloromonas aromática* (Daro\_3038), *Pelobacter carbinolicus* (Pcar\_2380), *Geobacter metallireducens* (Gmet\_0760), *Legionella philadelphia* (Lphi\_0663). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O e-value foi (0,5e – 4,1e).

#### 4.1.2.2 Locus Afe\_2301

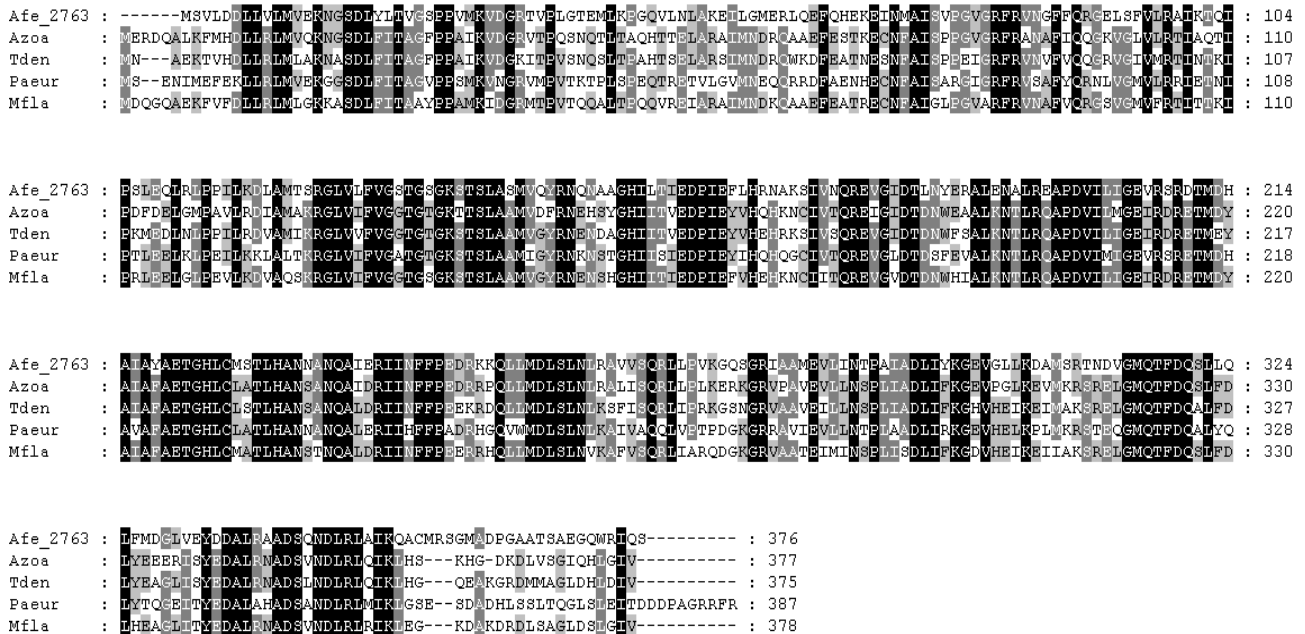
O gene no locus Afe\_2301 também codifica uma pilina tipo IV. Todas as espécies relacionadas, incluindo *A. ferrooxidans*, compartilharam a função atribuída no *blast* como proteína PilM (Figura 11) envolvida na formação de pilus. A percentagem de identidade e similaridade ficou ao redor de 40% e entre 56% e 58%, respectivamente. Entre as espécies incluídas no alinhamento de proteínas, *Polaromonas* é a mais próxima de *A. ferrooxidans* por sua capacidade de oxidar compostos inorgânicos de enxofre, acoplado este metabolismo ao processo de remoção de nitrogênio, podendo ter como substrato sulfetos como a pirita (BELLER *et al.*, 2006). Espécies do gênero *Azoarcus* são capazes de degradar compostos aromáticos, benzeno e tolueno (RABUS *et al.*, 2005), podendo remediar sítios contaminados por gasolina.



**Figura-11** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2301 com pilinas tipo IV de *Thiobacillus denitrificans* (Tden\_0202), *Azoarcus* sp. (Azoa\_2266), *Polaromonas* sp. (Polar\_0781) e *Nitrosococcus oceanii* (Noc\_0247). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons cinza claro entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (1,3e – 9,3e).

#### 4.1.2.3 Genes PilT 1-2, loci Afe\_2763 e Afe\_2764

O loci Afe\_2763 e Afe\_2764 se encontram em *cluster*. As proteínas codificadas por estes genes são identificadas como PilT1 e PilT2, respectivamente, tendo como função um tipo de mobilidade especial por deslizamento, na qual as bactérias podem se deslocar sobre a superfície de um substrato sólido. O locus Afe\_2763 apresentou percentagens de identidade entre 59%-60,5% e similaridade entre 77%-80%, sendo que todas as espécies relacionadas coincidiram em ter mobilidade por deslizamento, função altamente conservada (Figura 12).



**Figura-12** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2763 com proteínas PilT de *Azoarcus* sp. (Azoa\_1772), *Thiobacillus denitrificans* (Tden\_2420), *Pseudomonas aeruginosa* (Paeur\_396) e *Methylobacillus flagellatus* (Mfla\_2106). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons cinza claro entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (1,2e – 5,9e).

```

Afe_2764 : -----MDISELLAFVAVKNNASDLHHSAGLEPMTRVNGDIRPLNVEAQDSKTVHSMIVYDIMNDRQRRGVEENLELDPAVSELEGVARFR : 82
Tden    : -----MAFLIGQNPTPLHEARVDISELLAFVAVKNNASDLHHSAGLEPMTRVNGDIRPLNVEAQDSKTVHSMIVYDIMNDRQRRVVEEPLDFSEFESEGLARFR : 99
Azoa    : MDQASEYSIATGTPAPQSPRSTSSDNFMDITSELLAFVAVKNNASDLHHSAGLEPMTRVNGDIRPLNVEAQDSKTVHSMIVYDIMNDRQRRQVEEPLDFSEFESEGLARFR : 110
Daro    : -----MDITSELLAFVAVKNNASDLHHSAGLEPMTRVNGDIRPLNVEAQDSKTVHSMIVYDIMNDRQRRVVEEPLDFSEFESEGLARFR : 82
Noc     : -----MDIAELLAFVAVKNNASDLHHSAGLEPMTRVNGDIRPLNVEAQDSKTVHSMIVYDIMNDRQRRVVEEPLDFSEFESEGLARFR : 82

Afe_2764 : VNAFNCQRCGAAAFRTTIEASVLLLELDLNAFGSSFKETIINVERGIVLVGTGPTGSGKSTTLAAMVDHINANRADHITTEDEPTEFVHBEKRLINQREVGASTHGFENALRSA : 192
Tden    : VNAFNCQYAGAVFRTTIEASVLLLELDLNAFGSSFKETIINVERGIVLVGTGPTGSGKSTTLAAMVDYVNEQYSHIITVEDPIEFVHBEKRLINQREVGPHLTFNNALRSA : 209
Azoa    : VNAFNCQRCGAAAFRTTIEASVLLLELDLNAFGSSFKETIINVERGIVLVGTGPTGSGKSTTLAAMVDYVNEQYSHIITVEDPIEFVHBEKRLINQREVGPHLTFNNALRSA : 220
Daro    : VNAFNCQRCGAAAFRTTIEASVLLLELDLNAFGSSFKETIINVERGIVLVGTGPTGSGKSTTLAAMVDYVNEQYSHIITVEDPIEFVHBEKRLINQREVGPHLTFNNALRSA : 192
Noc     : VNAFNCQRCGAAAFRTTIEASVLLLELDLNAFGSSFKETIINVERGIVLVGTGPTGSGKSTTLAAMVDYVNEQYSHIITVEDPIEFVHBEKRLINQREVGPHLTFNNALRSA : 192

Afe_2764 : LREDPDVLLVGEIRDLETIRLALTAETGHI VFGTLHTSSAAKTDRIIVDFPAAEKRMVRSMLSESLRAVISQTLKTKDGGGRVAAHEIMIGTPAIRNLIREDKIEPOM : 302
Tden    : LREDPDVLLVGEIRDLETIRLALTAETGHI VFGTLHTSSAAKTDRIIVDFPAAEKRMVRSMLSESLRAVISQTLKTKDGGGRVAAHEIMIGTPAIRNLIREDKIEPOM : 319
Azoa    : LREDPDVLLVGEIRDLETIRLALTAETGHI VFGTLHTSSAAKTDRIIVDFPAAEKRMVRSMLSESLRAVISQTLKTKDGGGRVAAHEIMIGTPAIRNLIREDKIEPOM : 330
Daro    : LREDPDVLLVGEIRDLETIRLALTAETGHI VFGTLHTSSAAKTDRIIVDFPAAEKRMVRSMLSESLRAVISQTLKTKDGGGRVAAHEIMIGTPAIRNLIREDKIEPOM : 302
Noc     : LREDPDVLLVGEIRDLETIRLALTAETGHI VFGTLHTSSAAKTDRIIVDFPAAEKRMVRSMLSESLRAVISQTLKTKDGGGRVAAHEIMIGTPAIRNLIREDKIEPOM : 301

Afe_2764 : YSAIQTGQNGMOTLDCCLADLVRAHKVTHEDALRRVQNKDSEFMNVA : 349
Tden    : YSAIQTGGNLMOTLDCCLADLVRRNVIASNVARSAQNKDFAFML-- : 364
Azoa    : YSAIQTGCAVGMOTLDCCLADLVRRNVVSVGEARLRQNKDVFAG-- : 375
Daro    : YSAIQTGQNGMOTLDCCLADLVRRNVVSSNEARYKQANKDAFPA-- : 347
Noc     : YSAIQTGCAVGMOTLDCCLADLVRRNVVTKQBAAKKAVSRETFQ--- : 345

```

**Figura-13** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2764 com proteínas PiIT de *Thiobacillus denitrificans* (Tden\_2419), *Azoarcus* sp. (Azoa\_1770), *Dechloromonas aromática* (Daro\_3883) e *Nitrosococcus oceani* (Noc\_3004). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons cinza claro entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (3e – 4,8e).

A proteína codificada pelo gene no locus Afe\_2764 apresentou percentagens de identidade e similaridade maiores que a anterior. Isto é, 72%-74% de identidade e 83,5%-84,5% de similaridade. O sítio ativo da proteína está localizado entre os aminoácidos 120 e 320, aproximadamente (Figura 13).

#### 4.1.2.4 Gene *msrA*, locus Afe\_0163

O gene (*msrA*), locus Afe\_0163 codifica uma metionina-S-sulfóxido redutase. Esta enzima catalisa a redução irreversível da proteína metionina sulfóxido, a qual tem como função principal proteger a célula do estresse oxidativo restaurando as propriedades biológicas das proteínas alvo. Além desta função, a MsrA parece estar envolvida no reconhecimento de átomos de enxofre no substrato e na quebra de pontes tiol-dissulfeto, sendo que nestas reações é liberada uma molécula de metionina

(BOSCHI-MULLER *et al.*, 2001). A proteína apresentou percentagens de identidade e similaridade entre 58%-61% e 71%-75,5%, respectivamente (Figura 14).

Entre as espécies relacionadas se encontram *Thiobacillus denitrificans* e os gêneros *Alcanivorax* e *Rhodopseudomonas*. No gênero *Alcanivorax*, *A. borkumensis* tem sido a espécie mais estudada por sua capacidade de transformar uma ampla variedade de hidrocarbonetos sendo, provavelmente, a bactéria mais importante na degradação de petróleo (SCHNEIKER *et al.*, 2006). As bactérias do gênero *Rhodopseudomonas* são fototróficas e vivem em diversos solos e ambientes marinhos. A espécie mais representativa, *R. palustris*, se caracteriza por degradar diferentes compostos aromáticos para formar lignina e, além disso, transforma nitrogênio em amônio e hidrogênio (YASUHIRO *et al.*, 2003).



**Figura-14** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0163 com proteínas MsrA de *Alcanivorax borkumensis* (ABO\_1530), *Rhodopseudomonas palustris* (RPB\_1517), *Rhodopseudomonas palustris* (RPA\_4070) e *Thiobacillus denitrificans* (Tbd\_2632). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (3,2e – 9,5e).



### 4.1.3 Genes *cluster Fe-S*

#### 4.1.3.1 Locus *Afe\_0350*

O gene no locus *Afe\_0350* codifica uma proteína ligante de *cluster Fe-S*, tendo como função principal o metabolismo energético. Os *clusters Fe-S* são encontrados em uma variedade de proteínas tais como ferredoxinas, hidrogenases, nitrogenase, entre outras. Os *clusters Fe-S* também são conhecidos por participar em reações de óxido-redução (JOHNSON *et al.*, 2005). A proteína codificada pelo locus *Afe\_0350* apresentou percentagens de identidade entre 69%-71% e de similaridade entre 77,5%-83%. Nesta análise, as proteínas das espécies selecionadas que alinharam com maior porcentagem de identidade tiveram função de ferredoxina, apresentando sítio ativo entre os aminoácidos cisteínas, sendo que são requeridas 8 cys para ligar 8 átomos de Fe (Figura 15). As ferredoxinas são proteínas ácidas, solúveis e de baixo peso molecular, que transportam elétrons em vários sistemas redox, condições interessantes para futuras pesquisas em biolixiviação. As espécies bacterianas relacionadas foram: *Nitrosomonas europaea*, *Burkholderia cenocepacia*, *Chromobacterium violaceum*. *Nitrosomonas europaea* é uma bactéria que oxida amônio a nitrato. *Chromobacterium violaceum* é uma espécie que tem um metabolismo versátil, sendo capaz de produzir biosurfactantes. Além disso, possui várias proteínas envolvidas no metabolismo de ferro (HUNGRIA *et al.*, 2004).

```
Afe_0350 : MSLLINDQCINCDVCEPEPCPNNAISMGARTYVIDEGLCTEFCVGHYDTPQCKEVCVPVDCIVSDEEDHAESEPEALQOKFLRLTGQC----- : 83
Neur    : MALIITDEECINCDVCEPEPCPNRAISQGEETIYEIDSDLCTEFCVGHYNTPQCVVEVCPVSCIVGDEDRVENREOLMEKIQFLTGTGANRVPQG : 89
Bcen    : MALMIITDEECINCDVCEPEPCPNNAISMGPDIIYVIDENKCTEFCVGHYDEPQCCQVCPVECTPRDEPOHDESHAOLMEKMHALLIAVKGDDAS- : 88
Cviol   : MSLLMIITDEECINCDVCEPEPCPNNAISQGEETIYQIDENLCTEFCVGHYDEPQCCQVCPVDCIPLDEAHEETQBELHQKYLKISGQA----- : 83
Psyn    : MSLLIITDDCINCDVCEPEPCPNNAISQGEETIYMINENLCTEFCVGHYDEPQCCQVCPVDCIPLDENHVESKEQLMDKMYRIITSNV----- : 83
```

**Figura-15** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus *Afe\_0350* com proteínas pertencentes ao *cluster Fe-S* de *Nitrosomonas europaea* (*Neur\_0967*), *Burkholderia cenocepacia* (*Bcen\_2192*), *Chromobacterium violaceum* (*CViol\_4201*) e *Pseudomonas syringae* (*Psyr\_0416*). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os tons cinza claro entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (2,4e – 7,1e).

#### 4.1.3.2 Locus Afe\_0547

O gene no locus Afe\_0547 codifica uma proteína ligante de *cluster* Fe-S. As percentagens de identidade e similaridade foram entre 33,5%-43% e 47,5%-68% respectivamente (Figura 16). Esta proteína tem funções atribuídas de ferredoxina e hetero-dissulfeto redutase, apresentando sítio de ligação aos clusters com as cisteínas, sendo que são requeridas 8 cisteínas para ligar 8 átomos de Fe. A enzima hetero-dissulfeto redutase pertence à família das oxidoreduções que especificamente utilizam o enxofre como doador de elétrons, com o NAD ou NADP como aceptores. Os microrganismos relacionados foram: *Methanosarcina barkeri*, *Methanospirillum hungatei*, *Carboxydothemus hydrogenoformans* e *Moorella thermoacetica*.

```
Afe_0547 : -----MATYAEMREMFDEIRADFRY-----DHEINGCLNCGICTATCEBSAQFYDYSPREIVQLLWTVENVEQIYDAMQEKMTACAOQMT : 78
Mbar : MIPVYNEYDTPCKTLAETAKKSIRTP-----ASLGLDRCLCCGACTASCCEAARFTDYSPROIVKVKVLE-NDRSVLIES--EMTWSCFYCY : 83
Moth : ----MELAG-SLRRNQALKSQVEAES-----GVVLSDCYCCGKCSACCFVAANMDYTERQVIRLLQLGLVEEAKS--HTPWLQACQQA : 77
Mhun : --MAAKSYNIPELDKKLADRRYHLSDTNPEFTQKILKTSRTIANMCMYCCGCTCTGSCSAPRSYRIRLEFMRRCVLGLENEAATD--PDLMLCTT : 93
Chy : ----MNVLYTKLRDEKFI BEVEKES-----GQHLDRCYCCGKCTACCFVAYAMDYTENQIMHLSKIGIGEEVLR--RTIWI CASNT : 78

Afe_0547 : CAARCFEKNSFGGLVMIMREVSIRHMQSAKDVLRFGRVMLKLITTCNQLSPDMIQDPDFPDMCPNIQKVEGDLRIIRKAI PVRTLQTVETAW : 175
Mbar : CNLRCPRNNSFVTIVQVLRQMAINEC--IGVEKLAYFLEIGEYLAENGASKIPGPGAKNMERDLGERWISPKKLESIRDELGLSKD--IRNTHGE : 176
Moth : CYTRCPREVNLPRLMVEVVRQBARRRC-LINEKKVDIEERAPLGTVERYGRAHEMGLIVQYNLQSCQPFKDAMLAPPLLKLGK-----ISPFDMK : 165
Mhun : CTRCPRDIAETDVMAMRNLAFKRD----IVPKNPLQTVQLIYNSGHGVNNDVNRAARTKLCLEADPPTT-----HSYDFEF : 167
Chy : CTRCPEKNIDIARVMSLRRIIRKRCYTANSRNVAAENRIFLDMIRKYGKLYELGLIILNFNLKTQPFKDA SLGPKMLALGK-----LTFEFSK : 167

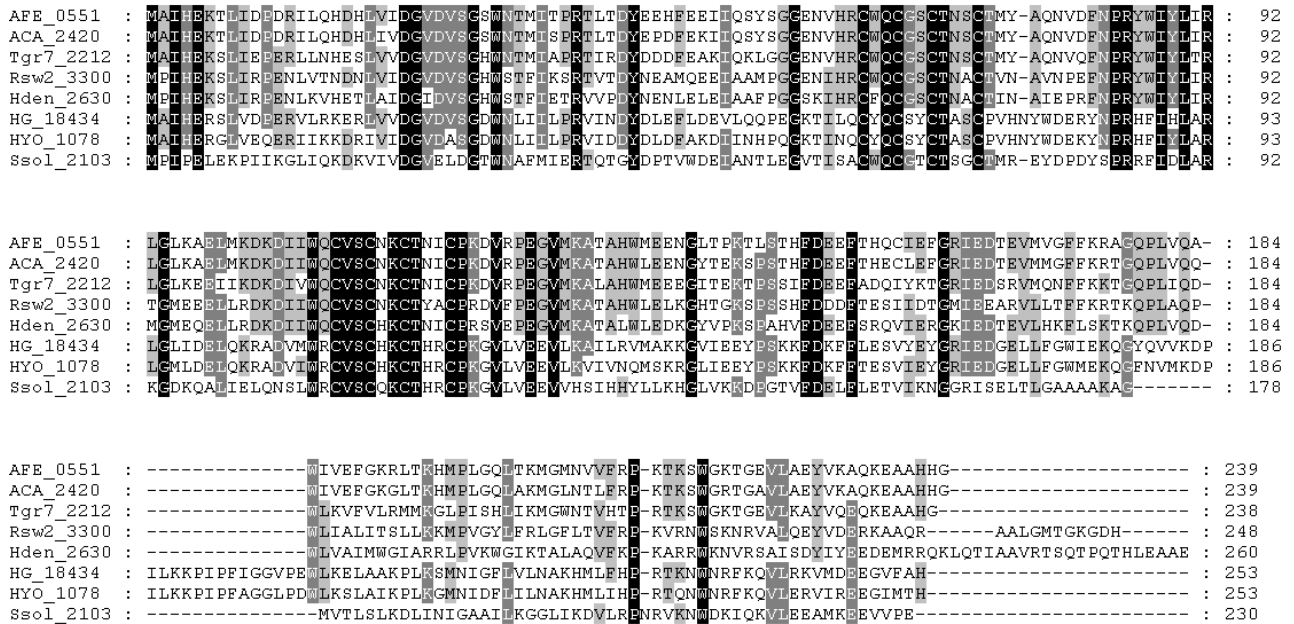
Afe_0547 : LKTSVEMYTIWMTGVLKSLETMDENLFDVIEDFIDEKREDYEDWLESQNDKD----- : 228
Mbar : VQALLETATGYFEREKWKAKIQEKLHQLLENQYIKRENRSQDGFENDRRYPGQPAFII : 236
Moth : IKDVAGIKDIE TRVRARGGDRS----- : 187
Mhun : VKGIQKIIDHYELKENADRILKGD----- : 191
Chy : VKNSGEIKKIEPETIEKLEVQTAEPNNVK----- : 195
```

**Figura-16** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0547 com proteínas pertencentes ao *cluster* Fe-S de *Methanosarcina barkeri* (Mbar\_A1953), *Moorella thermoacetica* (Moth\_0809), *Methanospirillum hungatei* (Mhun\_1836) e *Carboxydothemus hydrogenoformans* (Chy\_0927). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (1,e – 8,6e).

#### 4.1.3.3 Locus Afe\_0551

A proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551 ligante de *cluster* Fe-S. Com uma percentagem de identidade entre 34,5%-90% (Figura 17), a proteína apresentou

motivos altamente conservados para a função de hetero-dissulfeto redutase, sendo que as cisteínas requeridas na ligação dos *clusters* de Fe-S também foram totalmente conservadas (MANDER *et al.*, 2004).



**Figura-17** Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551 com proteínas pertencentes ao *cluster* Fe-S de *Acidithiobacillus caldus* (ACA\_2420), *Thioalkalivibrio* sp. (Tgr7\_2212), *Rhodobacter* sp. (Rsw2\_3300), *Hyphomicrobium denitrificans* (Hden\_2630), *Hydrogenivirga* sp. (HG\_18434), *Hydrogenobaculum* sp. (HYO\_1078) e *Sulfolobus solfataricus* (Ssol\_2103). Os blocos pretos representam resíduos com identidade entre 80% e 99%, os cinza escuros entre 40% e 60% e os cinza claros entre 20% e 40%. O alinhamento dos aminoácidos foi realizado com o programa GeneRun e editado pelo programa BioEdit. O *e-value* foi (3e – 7,5e).

O resultado do alinhamento mostrou proteínas ortólogas de vários microrganismos, os quais compartilharam o mesmo substrato energético, ou o mesmo ambiente de *A. ferrooxidans*. As espécies relacionadas foram: *A. caldus* e *Sulfolobus solfataricus*, que habitam ambientes acidófilos e utilizam compostos reduzidos de enxofre como fonte energética (OKABAYASHI *et al.*, 2005). Microrganismos termófilos da ordem *Aquificales*, que podem oxidar hidrogênio e enxofre, entre eles a espécie termo acidófila *Hydrogenobaculum* (REYSENBACH *et al.*, 2009). *Rhodobacter* sp. que oxida íons ferrosos e pode utilizar hidrogênio, acetato e piruvato como substratos para o crescimento (EHRENREICH e WIDDEL, 1994). *Thioalkalivibrio* que é uma alcalófila

facultativa, extremadamente tolerante a sal e que utiliza compostos reduzidos de enxofre (tiosulfato, tetrionato) como fonte de energia (BANCIU *et al.*, 2004). *Hyphomicrobium* que utiliza metanol e formato para o crescimento; esta espécie também é eficiente em denitrificação e metanogênese (HOLM *et al.*, 1996).

Apesar de que em todas as espécies antes citadas, o alinhamento baseado na seqüência da proteína atribuí à função de hetero-dissulfeto redutase, esta função não tem sido descrita nesses microrganismos. Além disso, estudos funcionais e estruturais dessa proteína não têm sido reportados. Porém, caracterizações enzimáticas de hetero-dissulfeto redutases e vias metabólicas envolvendo hidrogênio, dióxido de carbono, formato, metanol e acetato, têm sido estudadas em microrganismos metanogênicos (SIMIANU *et al.*, 1998; ABKEN *et al.*, 1998).

A enzima hetero-dissulfeto redutase (HDR) foi inicialmente isolada e analisada a partir de metano archaeas crescendo em ambientes enriquecidos com H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Nessas condições, a reação de HDR é conectada a geração de gradientes iônicos eletroquímicos essenciais para conservação de energia em metanogênese (SIMIANU *et al.*, 1998). A deslocação de prótons é acoplada a via de transporte de elétrons e síntese de ATP envolvendo a ação de HDR. Esta reação foi demonstrada quando o doador de elétrons é hidrogênio (DEPPENMEIER *et al.*, 1991) ou dióxido de carbono (DEPPENMEIER *et al.*, 1996).

Em microrganismos acidófilos, o  $\Delta$ pH através da membrana citoplasmática é ligado a bioenergética celular, já que é o principal contribuinte da força próton motora (PMF). A PMF é uma medida do estado energético da membrana celular, que resulta de uma separação de cargas entre o citoplasma e o meio externo, e que é criado pelo potencial de membrana e o gradiente de pH através da membrana (BAKER-AUSTIN e DOPSON, 2007). Quando o hidrogênio molecular está presente no meio, a proteína de membrana “hidrogenase F420” forma canais para transferir elétrons desde citocromos tipo-*b* até hetero dissulfeto redutases, as quais reduzem o último acceptor de elétrons. Este sistema de transporte de elétrons é chamado de “H<sub>2</sub>: hetero dissulfeto oxidoreductase”, e é acoplado a movimento de prótons através da membrana citoplasmática. Finalmente, as reações que conectam a deslocação de prótons,

resultam em um gradiente eletroquímico que é utilizado para síntese de ATP (IDE *et al.*, 1999).

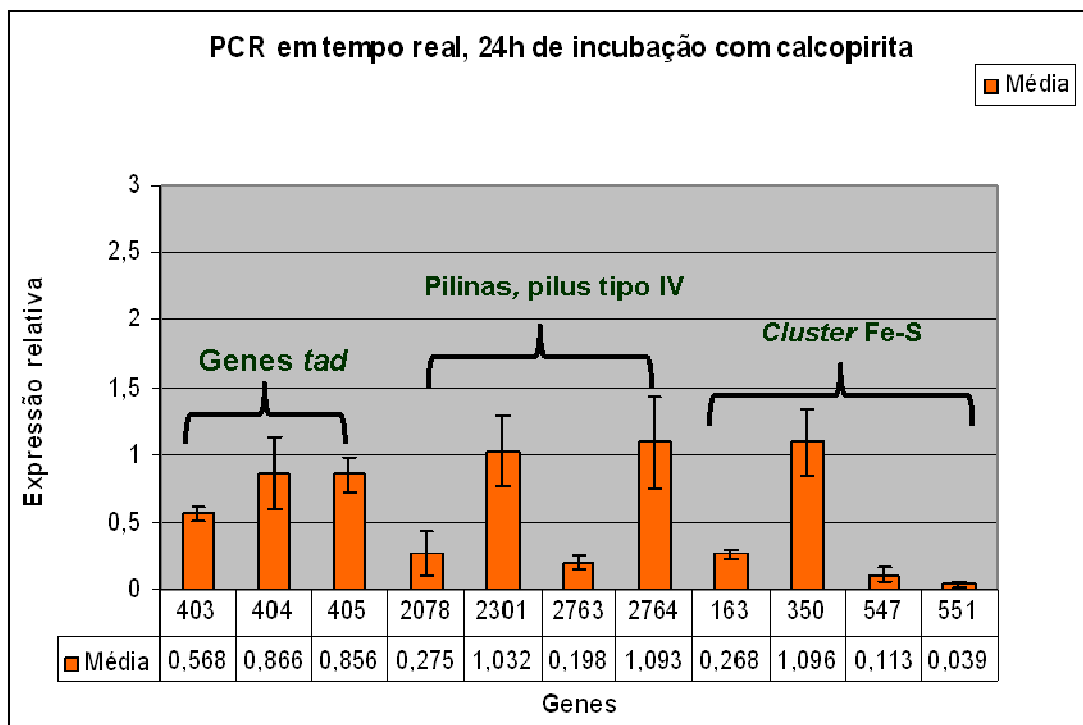
De acordo com BRASSEUR *et al.* (2002) e VALDÉS *et al.* (2008), o fluxo reverso de elétrons para produção de NADH pela via de oxidação de íons ferrosos em *A. ferrooxidans*, é conduzido pela força próton motora (PMF) através da membrana, a qual deriva da acidez do ambiente. Portanto, *A. ferrooxidans* pode explorar a PMF do seu ambiente para gerar forças redutoras e acoplá-las em reações redox. Apesar deste sistema de transporte de elétrons não ter sido amplamente descrito nesta bactéria, este provavelmente ocorre em microrganismos acidófilos.

Em resumo, a análise de bioinformática revelou diferenças nos graus de conservação das proteínas codificadas pelos genes avaliados. Em geral, as espécies de microrganismos cujas proteínas alinharam com as de *A. ferrooxidans*, estão envolvidas na remediação de sítios contaminados por compostos xenobióticos.

## **4.2. Análise da expressão dos genes por PCR em tempo real**

### **4.2.1 Células livres após 1 e 20 dias de incubação com calcopirita**

Foi analisada a expressão por PCR em tempo real, dos genes envolvidos em adesão e reconhecimento de grupos tióis em células de *A. ferrooxidans* LR mantidas por 1 e 20 dias na presença de calcopirita. Após o tratamento dos dados obtidos por PCR em tempo real, foram conseguidas as médias e os desvios padrão para cada um dos genes avaliados (Figura 18). A partir desses dados foi realizada uma análise estatística utilizando o estatístico t-student, obtendo-se um perfil de indução, repressão ou inalterabilidade de cada gene em relação ao controle. Sendo assim, com uma confiança de 95%, valor  $P < 0,05$  indica indução ou repressão do gene e valor  $P > 0,05$  indica que a expressão está inalterada.

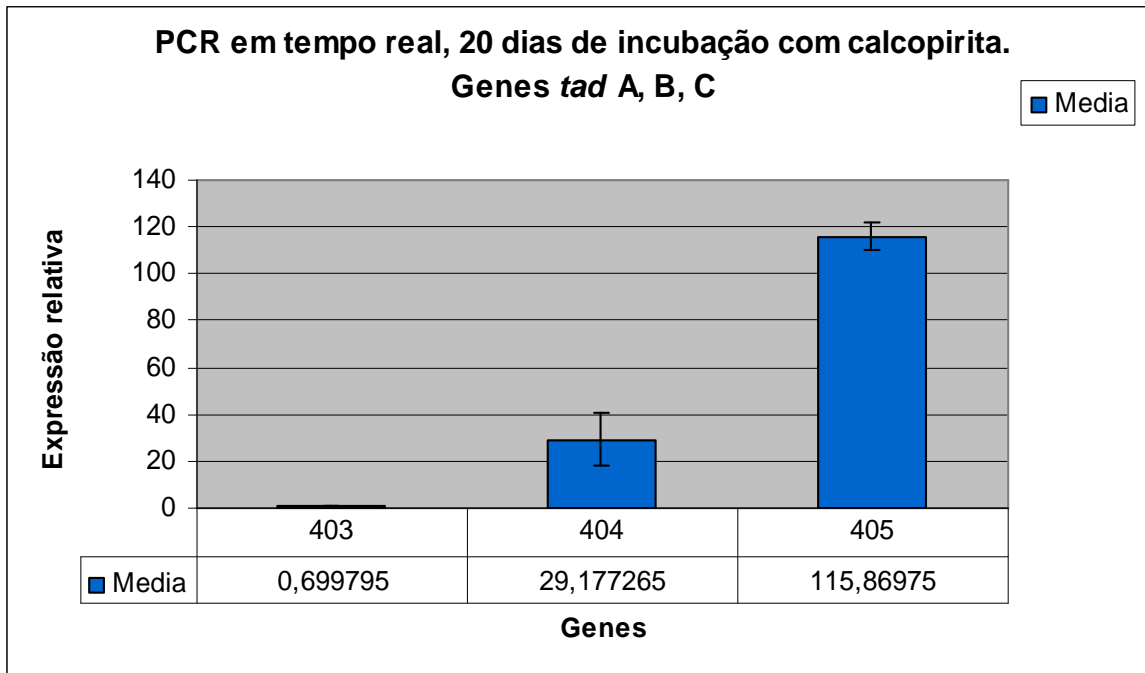


**Figura-18** Padrão de expressão gênica por PCR em tempo real, quando *A. ferrooxidans* LR foi colocado em contato com calcopirita por 1 dia. Os dados representam à média (três replicas) da expressão gênica em relação à condição controle (células crescidas em sulfato ferroso e ausência de sulfeto). A expressão do ferro no controle foi considerada 1.

As análises de expressão gênica com 20 dias de incubação na presença de calcopirita revelaram diferenças mais significativas quando comparadas com 1 dia de incubação e, além disso, os níveis de expressão entre os genes foram bem diferentes. Como pode ser observado na Figura 14, a expressão dos genes *tad* A, B e C foi inalterada. Por outro lado, entre os genes que codificam pilus tipo IV, o gene Afe\_2078 foi reprimido e o gene Afe\_2301 foi inalterado. Entre os genes que codificam as proteínas PilT, Afe\_2763 foi reprimido e Afe\_2764 foi inalterado. O gene *msrA* ficou reprimido e entre os genes que codificam proteínas do *cluster* Fe-S, Afe\_0350 ficou inalterado e Afe\_0547 e Afe\_0551 ficaram reprimidos.

A Figura 19 mostra os resultados da expressão dos genes *tad*, na qual *tad* A ficou inalterado e *tad* B e C foram induzidos sendo que o *tad* C foi o mais expresso. Estes resultados podem indicar que depois de 20 dias, as células estão sintetizando pilus com o possível objetivo de aderir ao substrato ou de se adaptar a uma nova

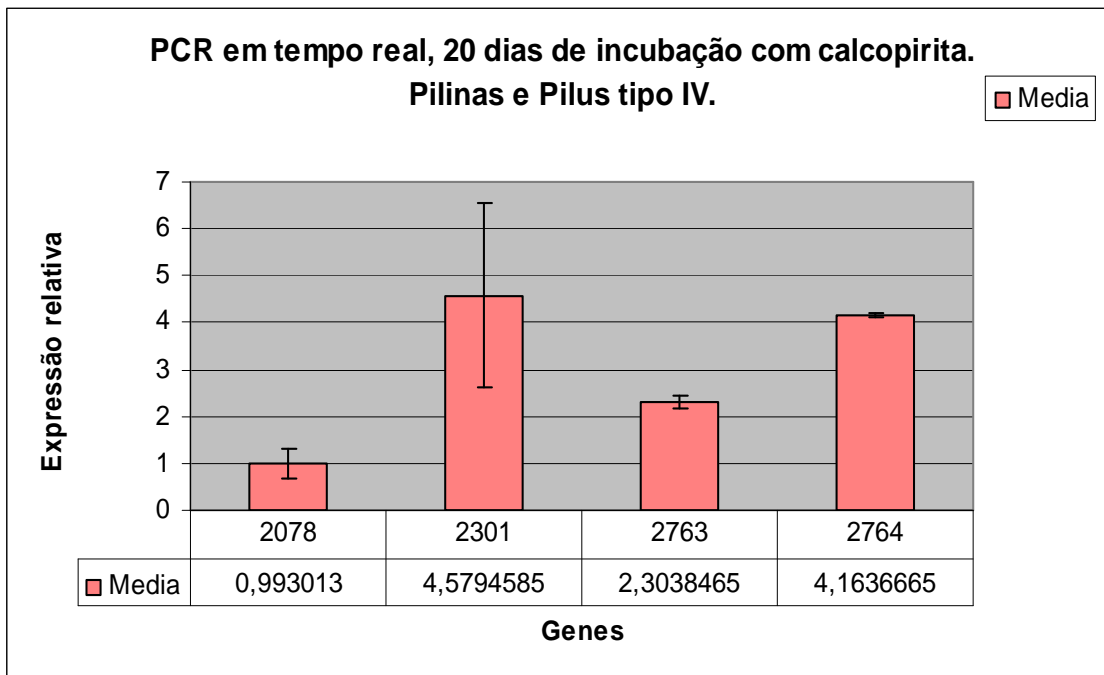
condição. Contudo, a expressão inalterada do gene (*tad A*) que codifica a proteína que fornece a energia para a formação dos pilus (ATPase) sugere que esta função é inibida ou não pode ser cumprida neste momento. As diferenças de expressão entre os genes *tad B* e *C* poderia sugerir que a proteína Tad C é mais importante já que ela estabiliza outras proteínas do sistema Tad e da formação de pilus, além disso, provavelmente sua alta expressão está relacionada com condições de estresse por agitação.



**Figura-19** Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes *tad*, quando *A. ferrooxidans* LR foi colocado em contato com calcopirita por 20 dias. Os dados representam à média (duas réplicas) da expressão gênica em relação à condição controle (células crescidas em sulfato ferroso e ausência de sulfeto). A expressão do ferro no controle foi considerada 1.

Os genes que codificam as proteínas pilus tipo IV e PilT também revelaram diferenças de expressão. A Figura 18 mostra que entre os genes que codificam pilus tipo IV, Afe\_2078 ficou inalterado enquanto Afe\_2301 foi induzido. Entre os genes que codificam pilinas PilT, Afe\_2763 ficou inalterado e Afe\_2764 foi induzido. Os genes que foram induzidos podem ser importantes no processo de adesão ou na formação de estruturas para aderir *A. ferrooxidans* ao substrato. Estes genes apresentaram valores de expressão menores quando comparados com os *tad B* e *C*, (Figuras 19 e 20). Estes resultados poderiam estar indicando que nas condições avaliadas, as células estão

procurando sintetizar pilus para tentar aderir ou se movimentar até o minério; no entanto, a velocidade de agitação (250 rpm) pode estar dificultando o processo.



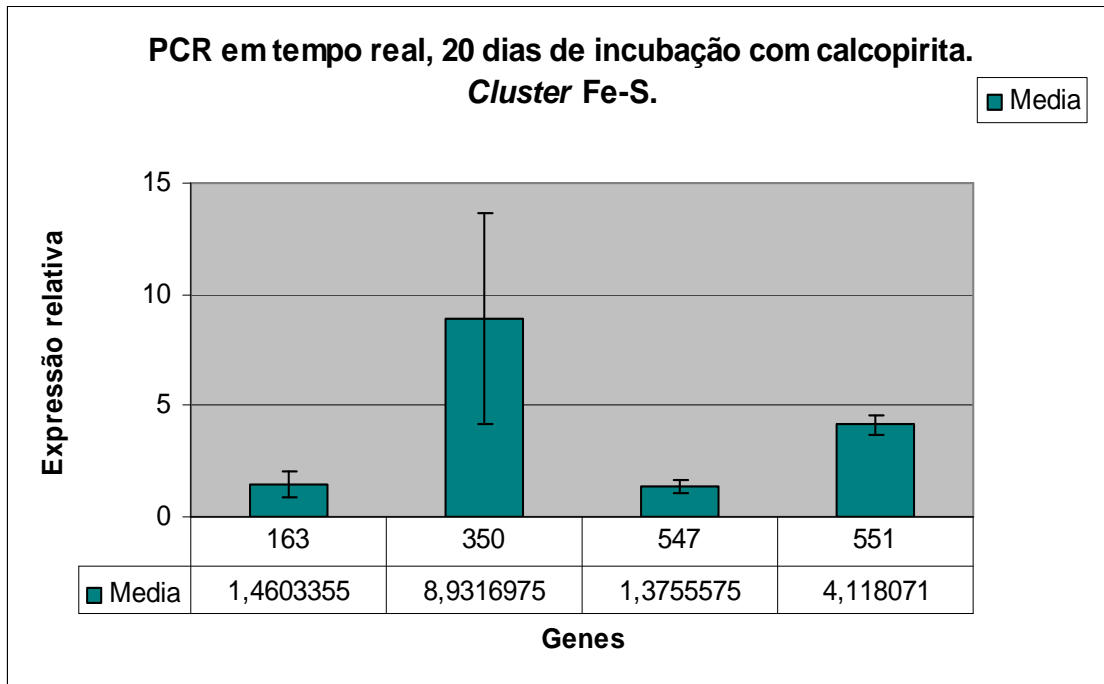
**Figura-20** Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes que codificam pilinas e pilus tipo IV, quando *A. ferrooxidans* LR foi colocado em contato com calcopirita por 20 dias. Os dados representam à média (duas réplicas) da expressão gênica em relação à condição controle (células crescidas em sulfato ferroso e ausência de sulfeto). A expressão do ferro no controle foi considerada 1.

Os valores de expressão do gene *msrA* e *cluster Fe-S* são mostrados na Figura 21. O gene *msrA* ficou inalterado, Afe\_0350 foi induzido, Afe\_0547 ficou inalterado e Afe\_0551 foi induzido. Possíveis explicações para estes resultados seriam: de um lado, as células com 20 dias de incubação com calcopirita se encontram estressadas e os genes que ficaram induzidos poderiam estar exercendo o papel de proteção contra o estresse oxidativo.

Por outro lado, esses mesmos genes também têm funções de transferência de elétrons no metabolismo de Fe e S. Assim, a indução pode indicar um possível metabolismo destes elementos. Por último, alguns trabalhos mostram que possivelmente estes genes têm funções de reconhecimento de grupos tióis (BHAYA *et al.*, 2000; LEITE *et al.*, 2002; KILLEY e BEINERT, 2003) e assim sendo, eles poderiam



estar desempenhando este papel, ajudando as células na identificação de grupos –SH na superfície do substrato.

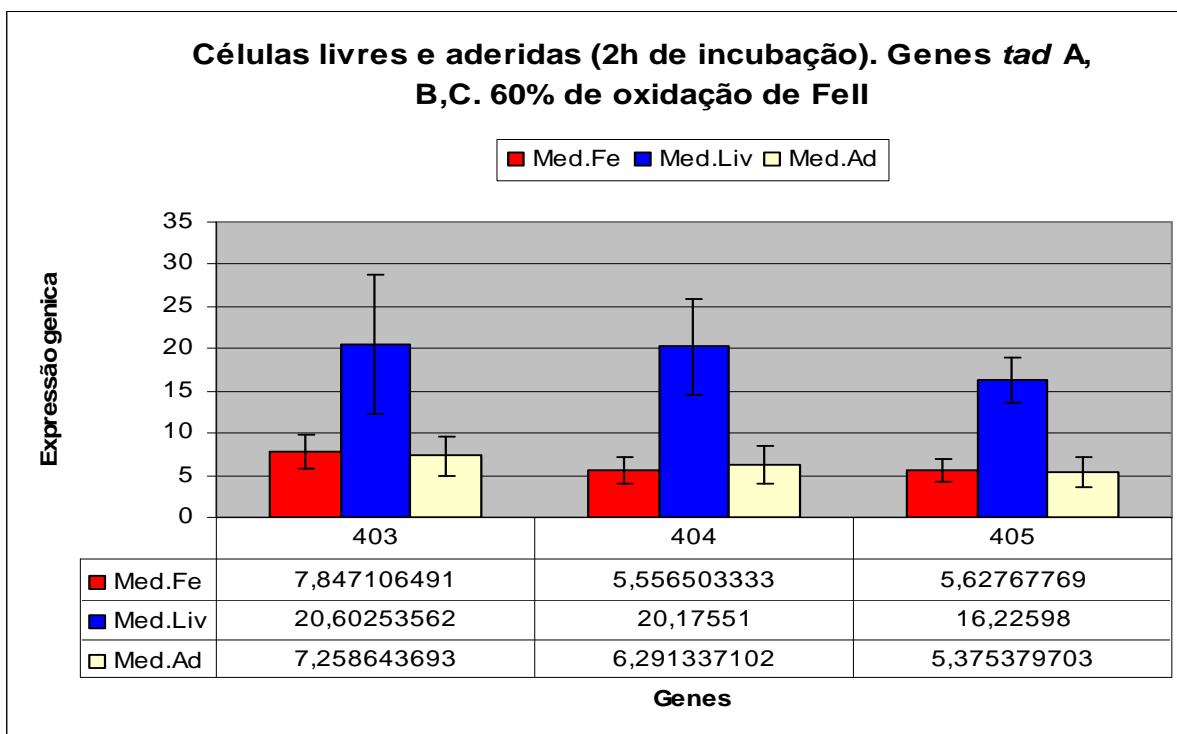


**Figura-21** Padrão de expressão por PCR em tempo real do gene *msrA* e dos genes que codificam proteínas do *cluster* Fe-S, quando *A. ferrooxidans* LR foi colocado em contato com calcopirita por 20 dias. Os dados representam à média (duas réplicas) da expressão gênica em relação à condição controle (células crescidas em sulfato ferroso e ausência de sulfeto). A expressão do ferro no controle foi considerada 1.

#### 4.2.2 Células livres e aderidas após 2 h de incubação com calcopirita (inóculo obtido com 60% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>)

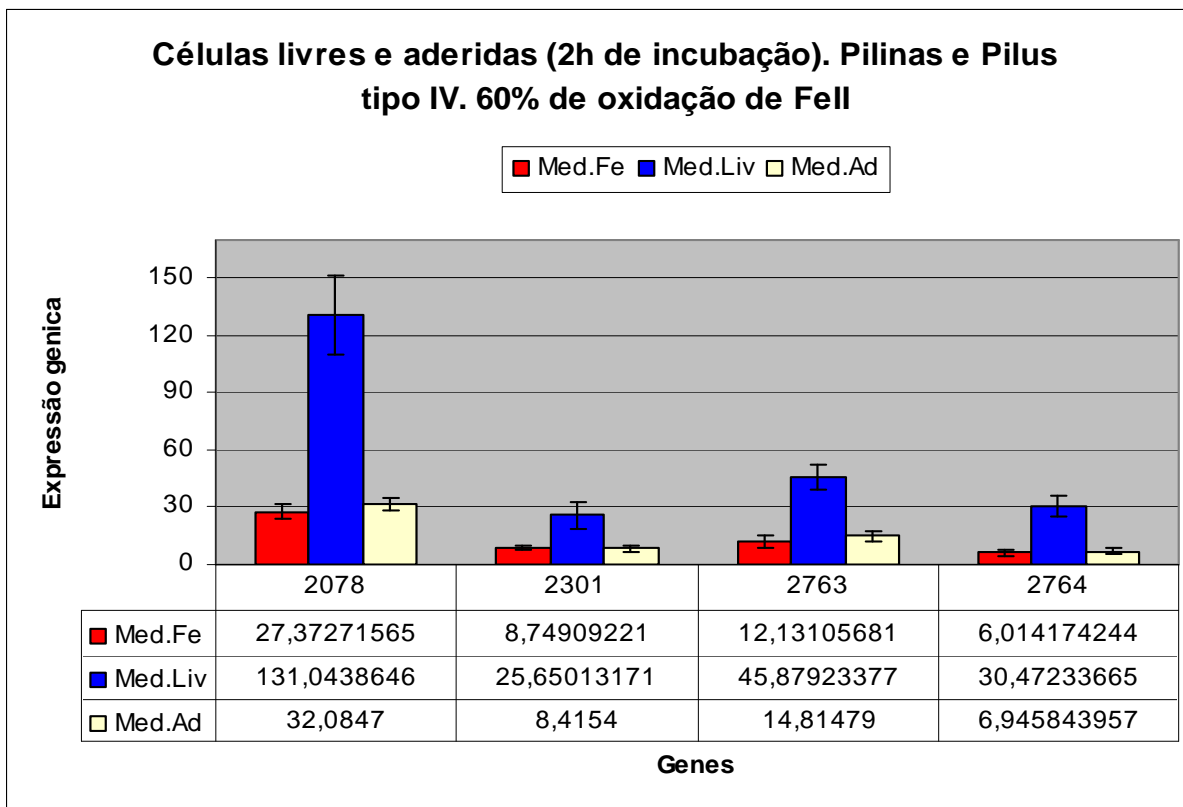
A expressão dos genes foi analisada por PCR em Tempo Real, em células crescidas em ferro (controle) e em células livres e aderidas após 2 h de incubação com calcopirita. O inóculo utilizado para este experimento foi obtido após 60% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>.

A Figura 22 mostra os resultados de expressão dos genes *tad* em células livres e aderidas. Como pode ser visto a expressão foi maior nas células livres. A menor expressão nas células aderidas pode indicar que as células não estão sintetizando pilus, uma vez que elas já se encontram aderidas.



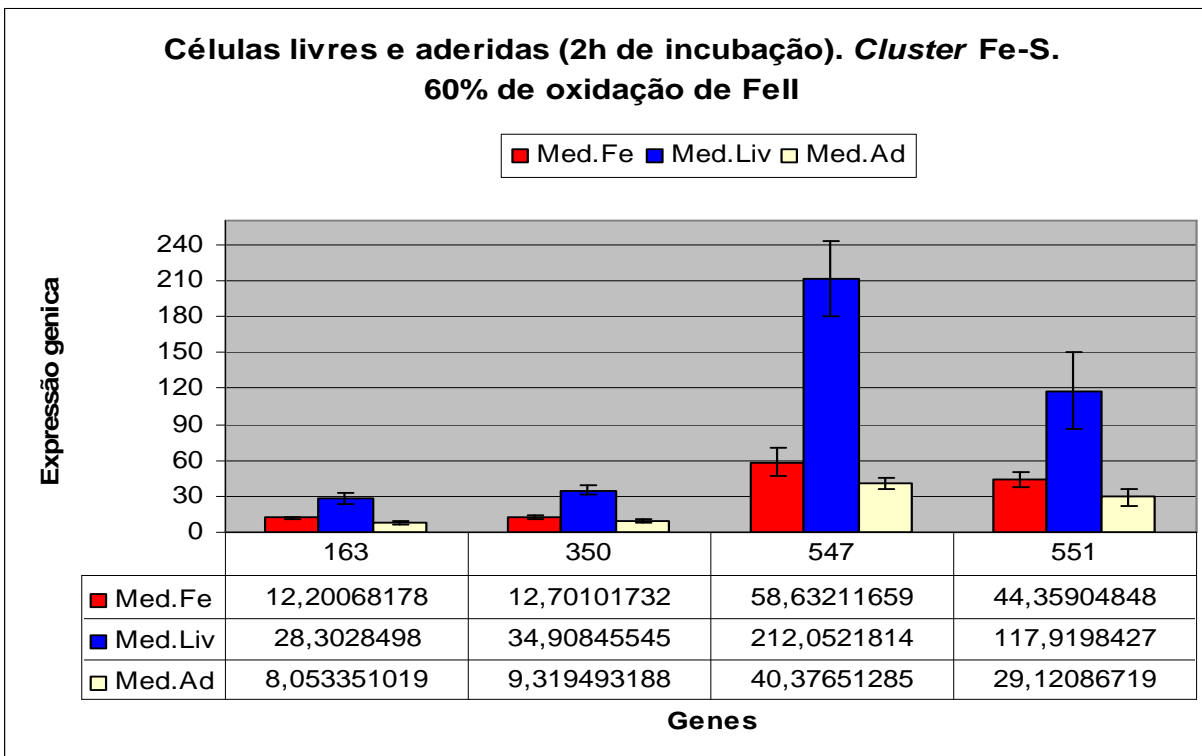
**Figura-22** Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes *tad*, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de *A. ferrooxidans* LR (inóculo obtido com 60% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.

A Figura 23 mostra os resultados obtidos dos genes *Afe\_2078*, *Afe\_2301*, *Afe\_2763* e *Afe\_2764*. Como observado para os genes *tad*, os níveis de expressão em células livres foram significativamente maiores do que em células aderidas. Estes resultados estão apoiados pelo teste estatístico, que mostra diferenças significativas entre as células livres e aderidas (Tabela 3). O alto nível de expressão do gene *Afe\_2078*, em comparação com os outros genes, pode sugerir que esse pilus tipo IV, codifica para uma subunidade de pilina, que tem que estar muito expressa para preparar a célula na montagem do pilus.



**Figura-23** Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes que codificam pilinas e pilus tipo IV, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de *A. ferrooxidans* LR (inóculo obtido com 60% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.

A Figura 24 mostra os resultados de expressão do gene *msrA* e dos genes que codificam proteínas do *cluster* Fe-S em células livres e aderidas. Novamente, a expressão em células livres foi muito maior do que em células aderidas. Por outro lado, foram observadas diferenças significativas de expressão entre os genes, sendo que os genes Afe\_0547 e Afe\_0551 apresentaram os maiores níveis de expressão. A alta expressão destes genes sugere a importância deles para a célula, provavelmente no processo de adesão e mais ainda no reconhecimento de grupos tióis ou na identificação de grupos –SH na superfície do substrato. O papel que estes genes desempenham na proteção da célula ao estresse oxidativo pode estar menos ativo nesta condição, uma vez que com 2 horas de incubação com calcopirita, o estresse deve ser muito menor quando comparado com 20 dias de incubação.



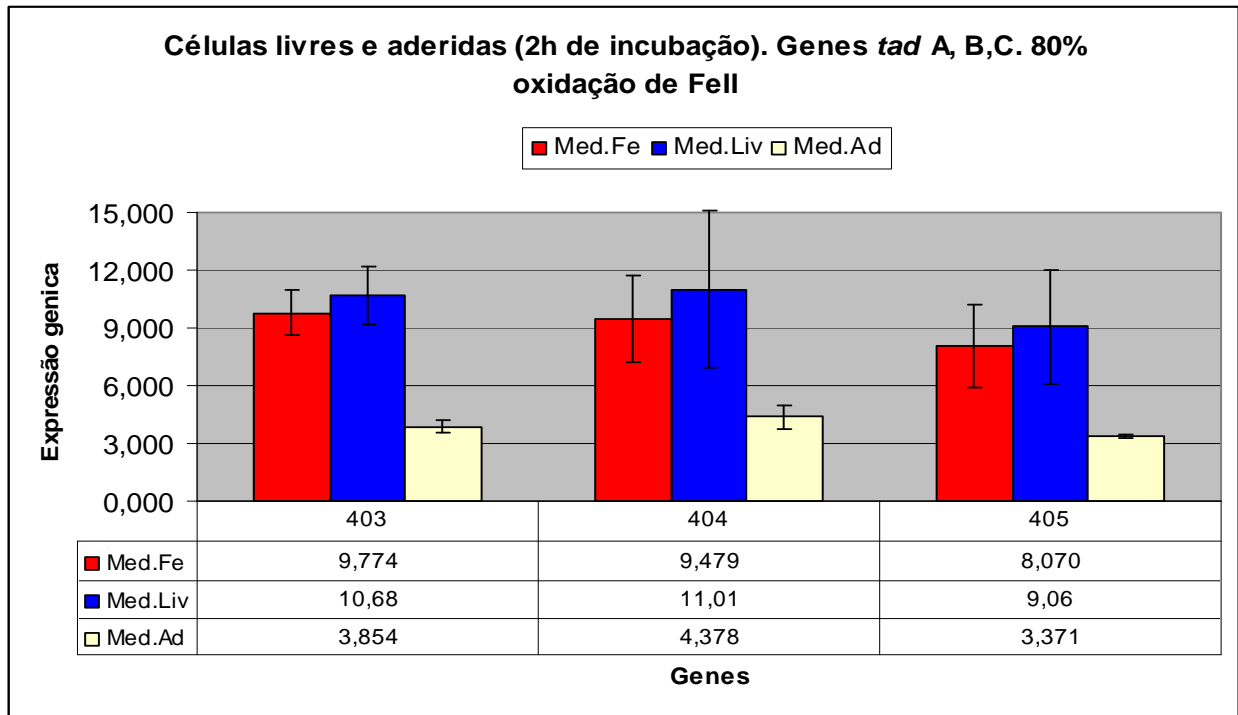
**Figura-24** Padrão de expressão por PCR em tempo real do gene *msrA* e dos genes que codificam proteínas pertencentes ao *cluster* Fe-S, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de *A. ferrooxidans* LR (inóculo obtido com 60% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.

De forma geral, parece que o processo de adesão e reconhecimento de grupos tióis é favorecido nas primeiras horas de incubação com calcopirita, tempo no qual, provavelmente, as células estão mais aptas para aderir ao minério.

#### 4.2.3 Células livres e aderidas após 2 h de incubação com calcopirita (inóculo obtido com 80% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>)

Com o objetivo de se comparar a expressão dos genes com inóculo obtido após diferentes tempos de fase logarítmica de crescimento (60% e 80% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>) foi realizada análise por PCR em Tempo Real, em células crescidas em ferro (controle) e em células livres e aderidas após 2 h de incubação com calcopirita. O inóculo utilizado para este experimento foi obtido após 80% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>.

A partir destes dados foi realizada uma análise estatística (Tabela 3) utilizando o Tukey test, determinando-se a existência de diferenças significativas entre as células (crescidas em ferro, livres e aderidas) e entre as percentagens de oxidação de  $Fe^{2+}$ : 60% e 80%.



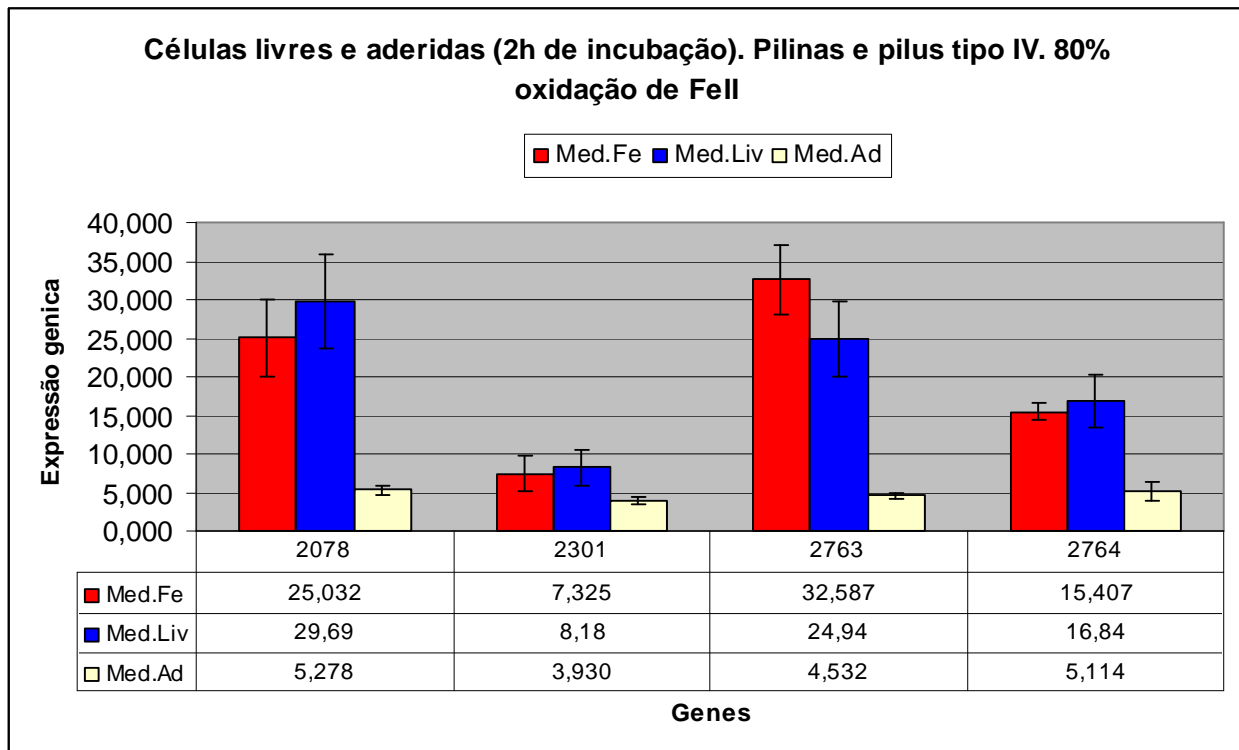
**Figura-25** Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes *tad*, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de *A. ferrooxidans* LR (inóculo obtido com 80% de oxidação de  $Fe^{2+}$ ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.

Como pode ser observado na Figura 25, os resultados de expressão em células livres e aderidas dos genes *tad*, revelou um comportamento diferente quando comparado com o experimento de inóculo obtido após 60% de oxidação de  $Fe^{2+}$ . Neste caso, com o inóculo obtido após 80% de oxidação de  $Fe^{2+}$ , as células livres e as células crescidas em ferro (controle), tiveram os níveis de expressão similares, em tanto que nas células aderidas a expressão foi menor. Estes resultados estão apoiados pelo teste estatístico, que mostra diferenças significativas entre as células livres e aderidas (Tabela 3).

**Tabela 3-** Média da expressão gênica de cada cultivo: células crescidas em ferro (Fe), células livres (Lv) e células aderidas (Ad) nos experimentos de 60% e 80% oxidação de Fe<sup>2+</sup>. Com uma confiança de 95%, a designação de uma mesma letra não difere estatisticamente entre si. \*teste F:diferenças significativas a 5%.

Gene	60% oxid. Fe <sup>2+</sup>						80% oxid. Fe <sup>2+</sup>					
	Fe	T.tk	Lv	T.tk	Ad	T. tk	Fe	T.tk	Lv	T.tk	Ad	T.tk
<b>Afe_0403</b>	7,85	<b>AB</b>	20,6	<b>A</b>	7,26	<b>B</b>	9,77	<b>A</b>	10,68	<b>A</b>	3,85	<b>B</b>
<b>Afe_0404</b>	5,56	<b>B</b>	20,18	<b>A</b>	6,29	<b>B</b>	9,45	<b>A</b>	11,01	<b>A</b>	4,38	<b>B</b>
<b>Afe_0405</b>	5,63	<b>B</b>	16,23	<b>A</b>	5,37	<b>B</b>	8,07	<b>A</b>	9,06	<b>A</b>	3,37	<b>B</b>
<b>Afe_2078</b>	27,37	<b>B</b>	131	<b>A</b>	32,08	<b>B</b>	25	<b>A</b>	29,7	<b>A</b>	5,28	<b>B</b>
<b>Afe_2301</b>	8,75	<b>B</b>	25,65	<b>A</b>	8,41	<b>B</b>	7,32	<b>A</b>	8,2	<b>A</b>	3,93	<b>B</b>
<b>Afe_2763</b>	12,13	<b>B</b>	45,88	<b>A</b>	14,81	<b>B</b>	32,6	<b>A</b>	25	<b>A</b>	4,5	<b>B</b>
<b>Afe_2764</b>	6,01	<b>B</b>	30,47	<b>A</b>	6,95	<b>B</b>	15,4	<b>A</b>	16,8	<b>A</b>	5,11	<b>B</b>
<b>Afe_0163</b>	12,2	<b>B</b>	28,3	<b>A</b>	8,05	<b>B</b>	26,4	<b>A</b>	19,2	<b>A</b>	4,4	<b>B</b>
<b>Afe_0350</b>	12,7	<b>B</b>	34,91	<b>A</b>	9,32	<b>B</b>	8,9	<b>A</b>	9,2	<b>A</b>	3,2	<b>B</b>
<b>Afe_0547</b>	58,63	<b>B</b>	212	<b>A</b>	40,38	<b>B</b>	42,9	<b>A</b>	48	<b>A</b>	5,1	<b>B</b>
<b>Afe_0551</b>	44,36	<b>B</b>	117,9	<b>A</b>	29,12	<b>B</b>	60,6	<b>A</b>	49	<b>A</b>	3,8	<b>B</b>

A Figura 26 mostra os resultados obtidos dos genes pilinas e pilus tipo IV. Novamente, como o observado para os genes *tad*, o nível de expressão das células controle (crescidas em ferro) e as células livres foi alto, enquanto que nas células aderidas foi menor. Porém, o gene *Afe\_2078* apresentou uma expressão muito menor quando comparado com a condição de 60% de oxidação de Fe<sup>2+</sup>.

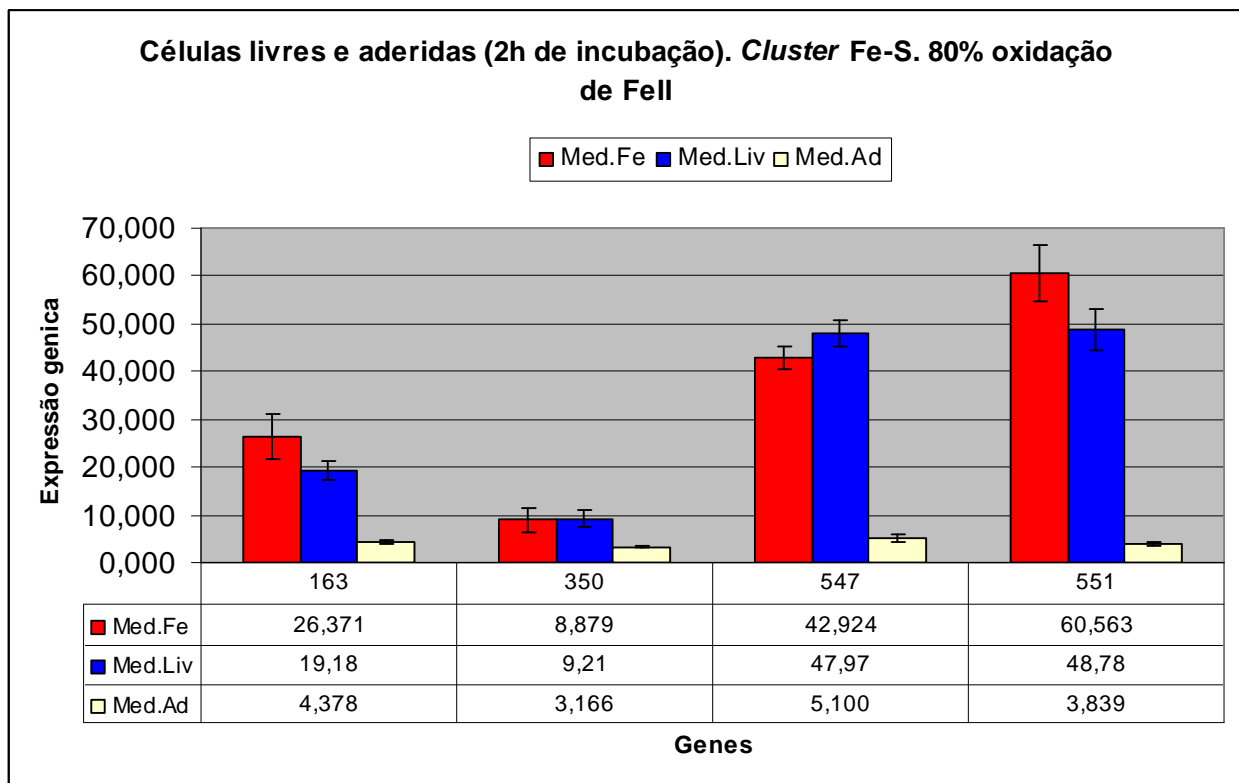


**Figura-26** Padrão de expressão por PCR em tempo real dos genes que codificam pilinas e pilus tipo IV, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de *A. ferrooxidans* LR (inóculo obtido com 80% de oxidação de  $Fe^{2+}$ ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.

Os resultados obtidos para os genes pertencentes ao *cluster* Fe-S são apresentados na Figura 27. Para estes genes, foi observado o mesmo comportamento anteriormente descrito para os outros genes, sendo que o nível de expressão das células controle (crescidas em ferro) e as células livres foi alto, entanto que nas células aderidas foi menor. Os genes Afe\_0547 e Afe\_0551 apresentaram elevados valores de expressão. No entanto, estes valores foram menores quando comparados com a condição de 60% de oxidação de  $Fe^{2+}$ . Este resultado confirma a importância destes genes no processo de adesão.

Em geral, os valores de expressão de todos os genes, tanto em células livres como aderidas, foi menor na condição de inóculo obtido após 80% de oxidação de  $Fe^{2+}$ , comparado com a condição de 60% de oxidação de  $Fe^{2+}$ . O menor nível de expressão dos genes poderia estar relacionado com a fase de crescimento, já que em condições de cultura mais “velhas”, há um incremento de estresse por metabólitos secundários, como o íon férrico, por diminuição de nutrientes, por competição, por diminuição de

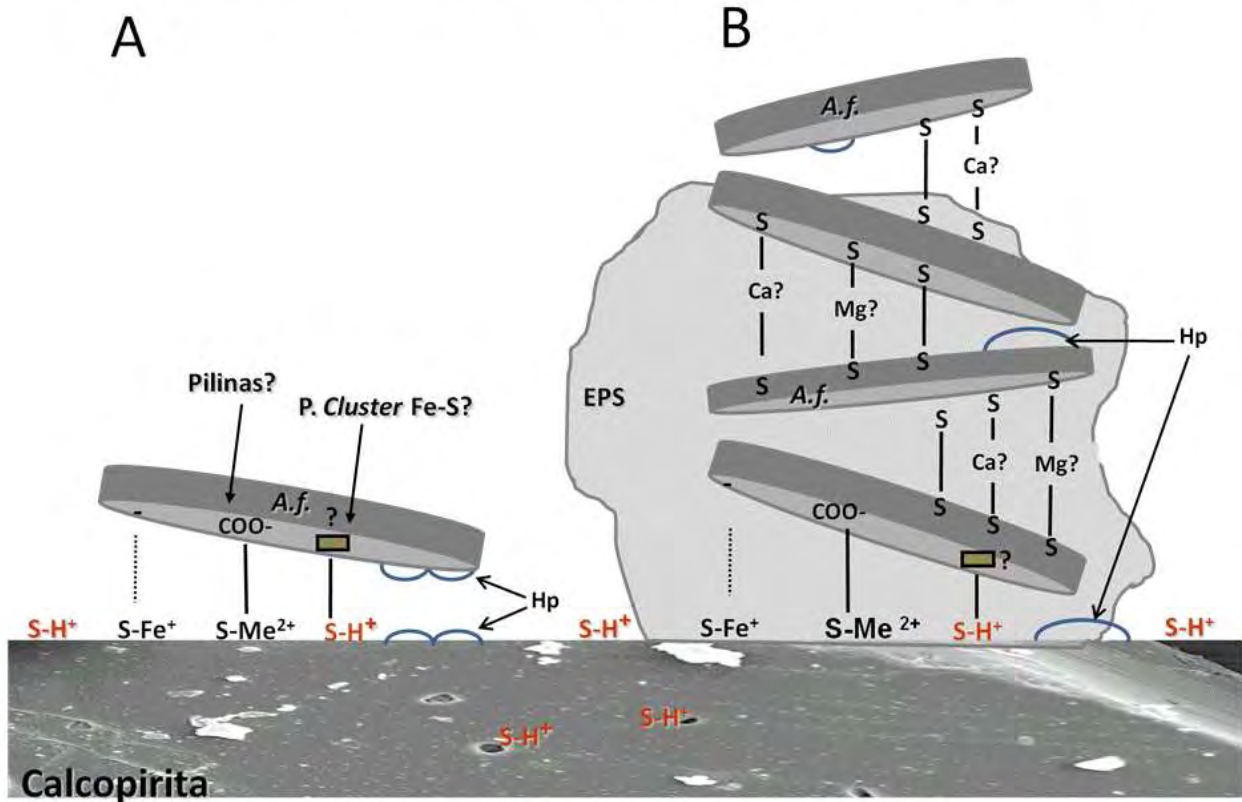
espaço, entre outros. Os resultados sugerem também, que o inóculo mais “jovem”, ou seja, no começo da fase de crescimento logarítmica (60% de oxidação de  $Fe^{2+}$ ), é mais apto para aderir ao minério, indicado pela maior expressão dos genes envolvidos em adesão.



**Figura-27** Padrão de expressão por PCR em tempo real do gene *msrA* e dos genes que codificam proteínas pertencentes ao *cluster* Fe-S, em células livres e aderidas após 2 h de incubação de *A. ferrooxidans* LR (inóculo obtido com 80% de oxidação de  $Fe^{2+}$ ) com calcopirita. Os dados representam o resultado de três réplicas.



## POSSÍVEL MECANISMO DE RECONHECIMENTO DE GRUPOS TIÓIS



**Figura-28** Possível mecanismo de reconhecimento de grupos tiol em calcopirita. Hp: pontes de hidrogênio. Modificado de LEITE *et al.* 2002.

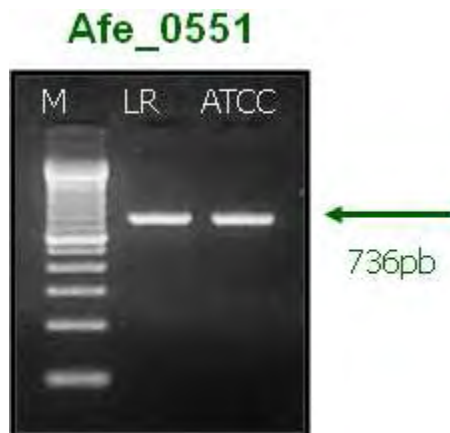
Na Figura 28 é representada a hipótese do possível mecanismo de reconhecimento de grupos tióis ou grupos carregados positivamente, por proteínas de *A. ferrooxidans* sobre a superfície de calcopirita. Considerando que em meio ácido a calcopirita possa expor grupos tiol (S-H<sup>+</sup>) e/ou (S-Fe<sup>+</sup>), apesar da sua refratariedade e insolubilidade (BEBIE *et al.*, 1998), bactérias do tipo *A. ferrooxidans* poderiam ter estratégias tanto para auxiliar a adesão como para ganhar elétrons. Dentre essas proteínas, as pilinas seriam candidatas para auxiliar a adesão, e as de *cluster* Fe-S poderiam ajudar tanto no reconhecimento desses grupos carregados positivamente, como na transferência de elétrons desde o sulfeto. Uma vez as células aderidas, a produção de EPS e conseqüente formação de biofilme seriam consolidadas, sendo que alguns cátions como Ca e Mg poderiam estar envolvidos na ligação entre as células (LEITE *et al.*, 2002).

### 4.3. Resultados Expressão, purificação e caracterização da proteína *cluster Fe-S* codificada pelo gene no locus *Afe\_0551* de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

#### 4.3.1 Expressão

Devido aos resultados de expressão gênica apresentados, nos quais vários genes mostraram uma indução significativa na presença de calcopirita, foi escolhido o gene no locus *Afe\_0551* para a expressão e purificação da proteína codificada por este gene, em uma série de estudos futuros que visam o possível melhoramento do processo de biolixiviação.

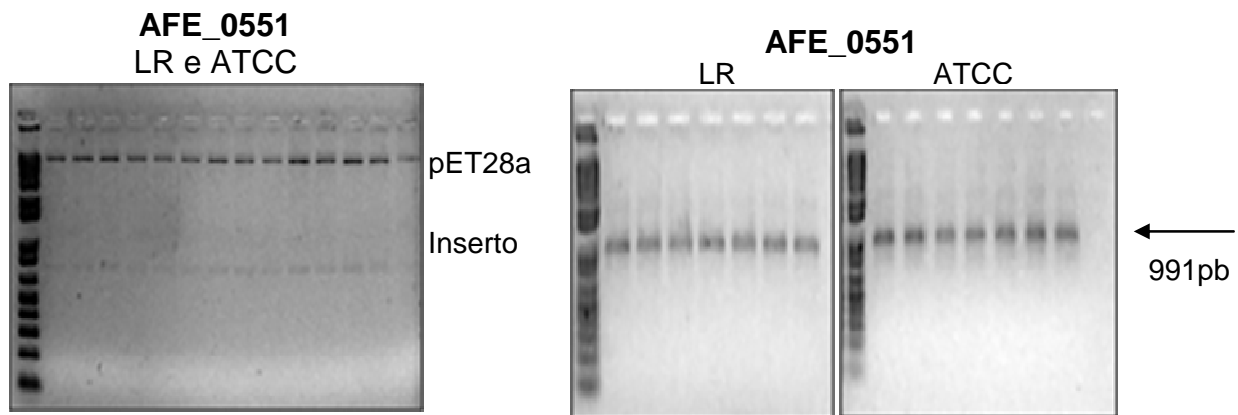
O gene de interesse *Afe\_0551* foi amplificado a partir de DNA genômico de *A. ferrooxidans* LR e ATCC e em seguida purificado em gel de agarose 1,5 % como pode ser observado na Figura 29.



**Figura- 29** Amplificação e purificação do gene em gel de agarose 1,5%, em tampão 1X TAE, pH 8,3. A primeira coluna é o padrão de massa molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder da Gibco BRL. A voltagem aplicada na separação foi de 100 V por 30 minutos. Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV a 365 nm.

O produto de PCR do gene alvo e o vetor de expressão pET28a, uma vez purificados, foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Nde I* e *Hind III* para produção de extremidades coesivas. Após digestão, tanto os produtos de PCR quanto o vetor foram mais uma vez purificados e sua pureza verificada em gel de agarose 1,5%.

Em seguida os produtos de PCR digeridos foram submetidos à clonagem em vetor pET28a e células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Como resultado obteve-se colônias resistentes a canamicina, ou seja, que continham o vetor, para o gene clonado. A presença do inserto desejado foi verificada por PCR das colônias resistentes a canamicina e posterior digestão e isolamento de DNA plasmidial. Como pode ser observado na Figura 30, tanto pelo tamanho do produto de PCR, como pelo resultado da miniprep seguida de digestão do plasmídeo, o gene foi clonado com sucesso.

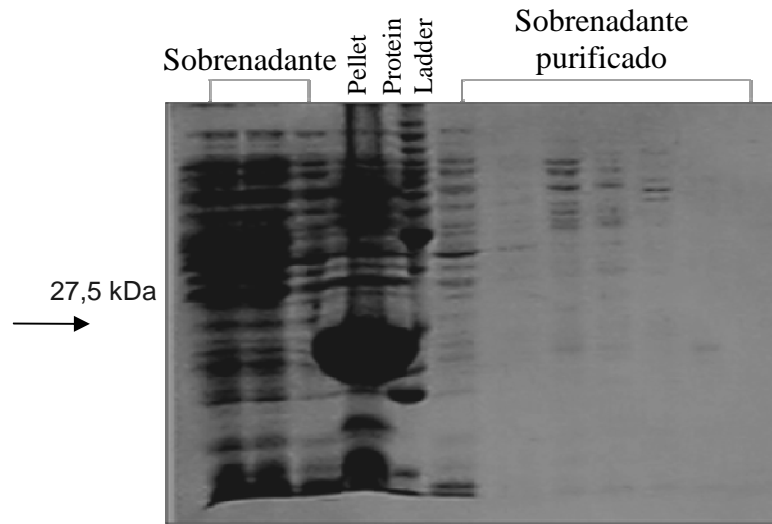


**Figura-30** Resultados do PCR e miniprep das colônias do gene clonado. Gel de agarose 1,5% em tampão 1X TAE, pH 8,3. A primeira coluna é o padrão de massa molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder da Gibco BRL. A voltagem aplicada na separação foi de 100 V por 30 minutos. Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV a 365 nm.

Foram seqüenciados 3 clones positivos do gene de interesse de *A. ferrooxidans* (Afe\_0551) tanto da linhagem LR quanto ATCC, confirmando que o inserto correspondente foi clonado corretamente, não sendo detectadas deleções, adições de bases ou quaisquer outras alterações na seqüência a ser expressa. Pelo seqüenciamento foi possível verificar que a seqüência deste gene nas diferentes linhagens de *A. ferrooxidans* LR e ATCC é idêntica.

O gene no locus Afe\_0551 de *A. ferrooxidans* LR clonado em pET28a teve sua expressão induzida por 1 mM de IPTG por 4 horas a 37° C nas linhagens de *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS. Como pode ser observado em gel SDS-PAGE a 15% da Figura 31, a proteína de interesse possui um tamanho aproximado de 27,5 kDa. A

linhagem que melhor super expressou a proteína foi a BL21(DE3), sendo esta muito mais expressa na fração insolúvel do que na solúvel do extrato protéico.



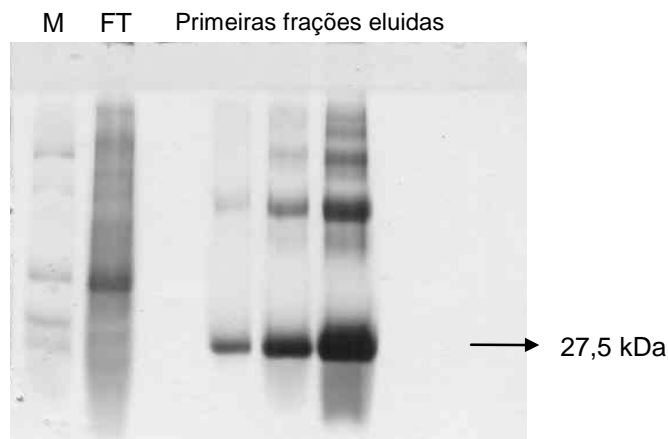
**Figura-31** SDS-PAGE a 15% da porção solúvel da proteína codificada pelo gene no lócus Afe\_0551.

A expressão em média escala da proteína foi feita a partir de um inóculo de 500 mL somente na linhagem BL21(DE3). Foi feito o mesmo procedimento descrito acima, sendo que após a sonicação e centrifugação, as células do sobrenadante (fração solúvel do extrato protéico) foram purificadas em coluna de purificação IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) contendo 1 mL de resina de afinidade Ni-NTA (Qiagen) e tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM com diferentes concentrações de imidazol (5, 10, 20, 50, 100 e 200 mmol/L). O sobrenadante que passou pela coluna foi coletado e posteriormente analisado em gel SDS-PAGE. A concentração de imidazol ideal para a purificação da proteína de interesse foi de 100 mM. Mas, ainda assim, a quantidade de proteína purificada obtida a partir da fração solúvel do lisado foi insuficiente para o prosseguimento das etapas de purificação (Figura 31). Portanto, foi realizada a purificação da fração insolúvel do lisado.

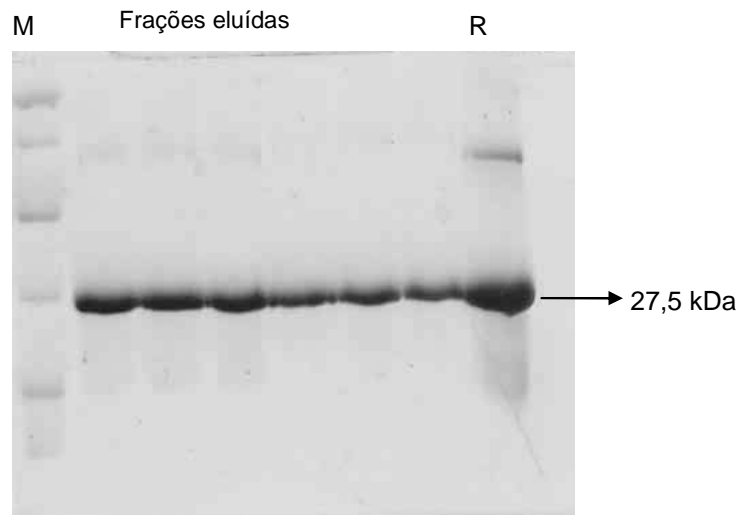
#### 4.3.2 Purificação

Os resultados da padronização da purificação são mostrados em géis de acrilamida nas Figuras 32 a 34.

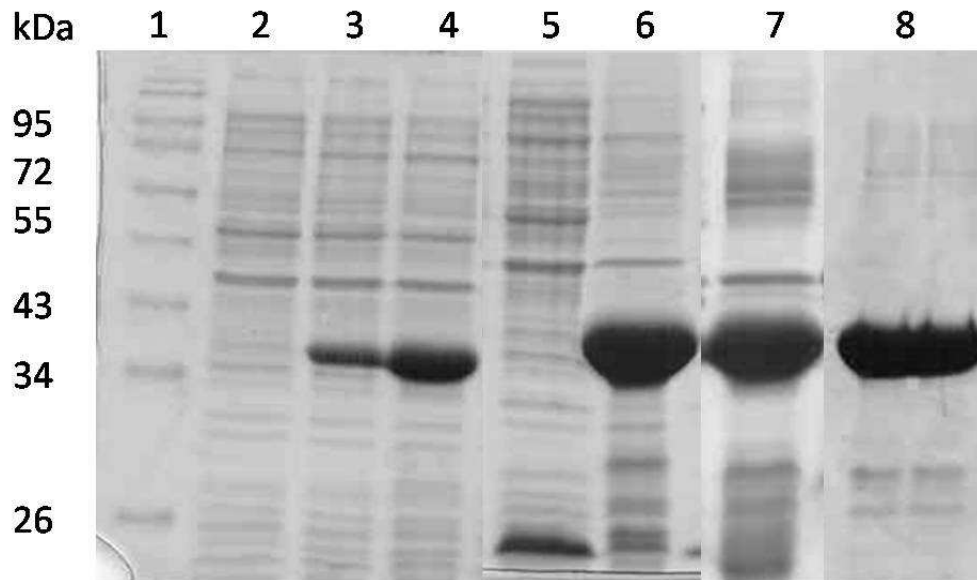
Na Figura 32 observa-se que nas primeiras frações de eluição da proteína aparecem outras bandas que podem ser ou proteínas contaminantes, ou podem ser agregados. No entanto, estas bandas desaparecem à medida que avança a eluição e as frações intermediárias e finais mostraram-se totalmente puras, ver Figura 33. As frações puras foram utilizadas para os experimentos de espectroscopia.



**Figura-32** Gel de SDS\_PAGE a 15%. Resultado da purificação em coluna de afinidade Ni-NTA. M: marcador de peso molecular. FT: lavagem coluna.



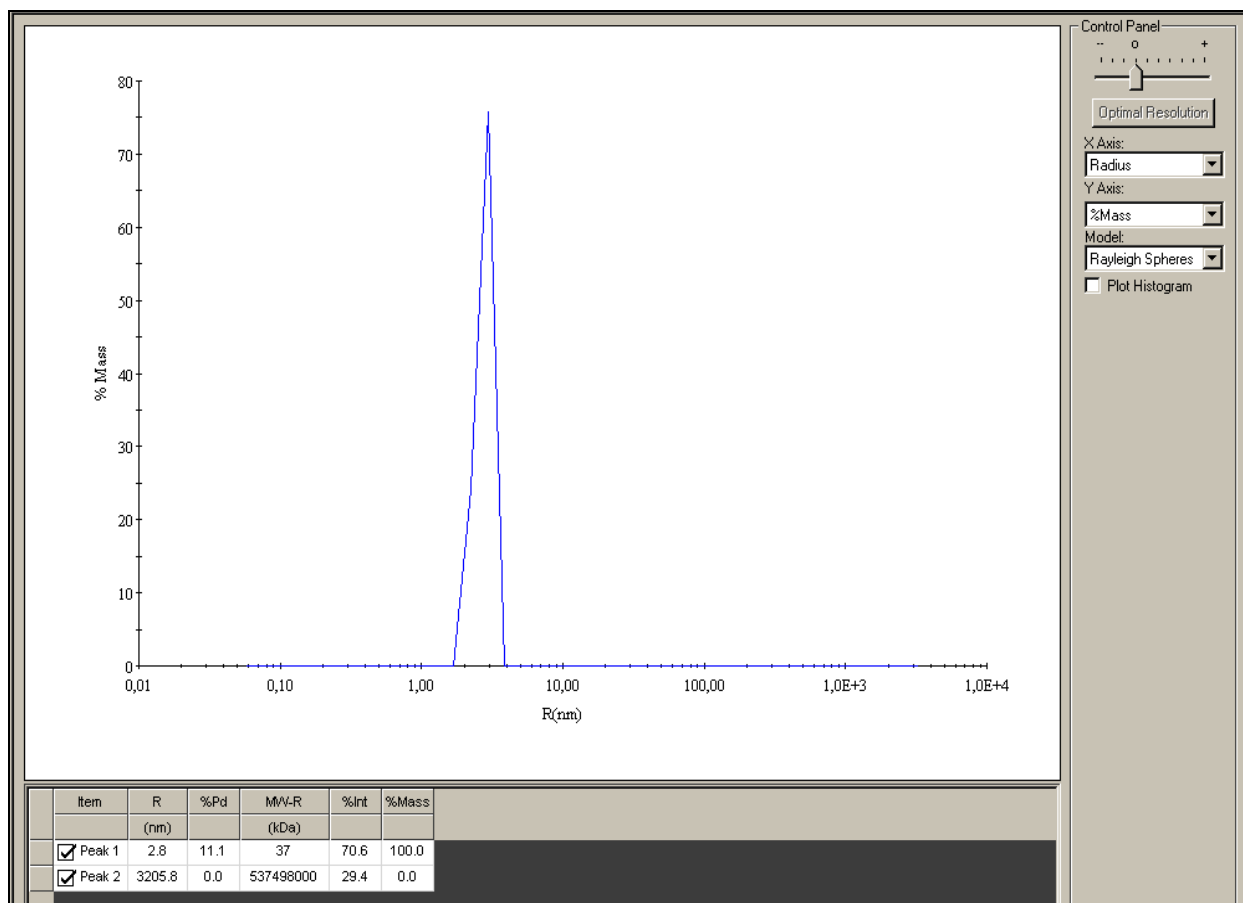
**Figura-33** Gel de SDS\_PAGE a 15%. Resultado da purificação em coluna de afinidade Ni-NTA. M: marcador de peso molecular. R: resina.



**Figura-34** Resumo de padronização da purificação da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551. Gel de SDS-PAGE a 15%. Linha (1): marcador de peso molecular. Linha (2): fração não induzida. Linha (3): fração induzida (IPTG) por 2 h. Linha (4): fração induzida (IPTG) *overnight*. Linha (5): fração solúvel após indução (IPTG). Linha (6): fração insolúvel após indução (IPTG). Linha (7): fração lisada com 8 M de uréia. Linha (8): frações eluídas com 300 mM de imidazol.

#### 4.3.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As medidas de DLS foram realizadas com o objetivo de conhecer a mono-dispersividade da amostra e a presença de agregados. O valor do radio hidrodinâmico obtido foi de 2,8 nm, resultado que foi coerente com a banda purificada da proteína, a qual se esperava que apresentasse um estado de oligomerização monomérico. A mono-dispersividade obtida foi de 11%, sendo que valores abaixo de 20% fazem possível o uso de amostras protéicas para caracterização por métodos biofísicos (Figura 35).



**Figura-35** Resultado de DLS após purificação e renaturação da proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551.

#### 4.3.4 Espectrometria de massa

O resultado de espectrometria de massa é apresentado na Tabela 4. A massa molecular da proteína obtida por esta medida foi de 29 kDa em contraste com a massa molecular teórica que é de 27,5 kDa. Este incremento na massa da proteína provavelmente é devido à adição da cauda de histidina (inserida na transformação) e a presença dos *clusters* Fe-S (ZENG *et al.*, 2007). Foi observada uma correspondência total da seqüência da proteína recombinante com a seqüência de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 anotada no TIGR como proteína ligante de *cluster* Fe-S.

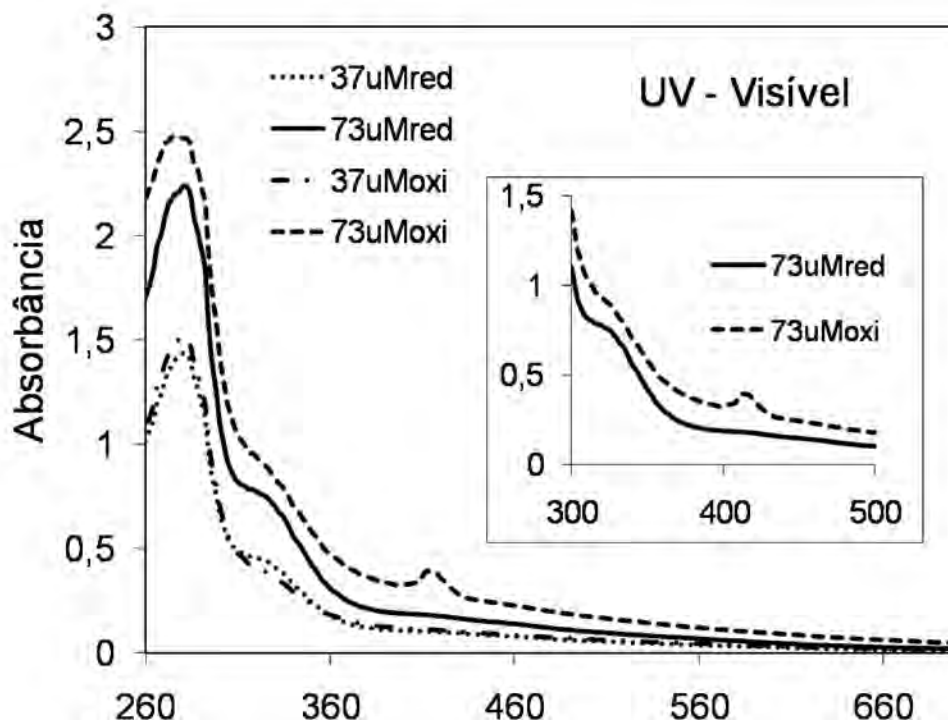
**Tabela 4-** Identificação da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 por LC/MS/MS.

Amostra	Clase de proteína	Numero de acesso	Seqüência dos peptídeos, m/z, z
Proteína	Ligante de cluster Fe-S	gi 218666436	TLIDPDR, 830.4012, +2 LGLKAELMK + Oxidação (M), 1020.68, +3 YWIYLIR, 1027.56, +2 DVRPEGVMK, 1032.52, +3 TGEVLAEYVK, 1109.54, +2 MGMNVVFRPK, 1195.59, +2 QMTSKICNISSPYL, 829.3574, +2 IEDTEVMVGFFK, 1415.67, +2 DIIWQCVSCNK, 1423.66, +2 SWGKTGEVLAEYVK, 1568.86, +3 IEDTEVMVGFFKR, 1572.77, +3 ATAHWMEENGLTPK, 1592.68, +2 AGQPLVQAWIVEFGK, 1643.84, +2 DKDIIWQCVSCNK, 1666.74, +2 AGQPLVQAWIVEFGKR, 1799.98, +2 RAGQPLVQAWIVEFGK, 1801.05, +3 TLSTHFDEEFTHQCIEFGR, 2356.02, +3 AGQPLVQAWIVEFGKR, 1801.05, +3 TLSTHFDEEFTHQCIEFGR, 2357.2,+4 LQHDHLVIDGVDVSGSWNTMITPR, 2822.51, +4 TLTDYEEHFEEIIQSYSGGENVHR, 2853.29, +4 ILQHDHLVIDGVDVSGSWNTMITPR, 2806.52, +4



### 4.3.5 Medidas no UV visível

O resultado da medida de absorbância no UV visível na faixa entre 250 e 700 nm da proteína oxidada, com 5 mM de persulfato de amônio, e reduzida, com 2 mM de DTT, é mostrado na Figura 36. De acordo com vários autores (GOMES *et al.*, 1998; ZENG *et al.*, 2007ab) o espectro obtido foi similar a espectros previamente reportados, no qual é observado um aumento de absorção na faixa entre 300 e 500 nm aproximadamente, o que é próprio de proteínas pertencentes à família de *cluster* Fe-S. Nesta região, a proteína oxidada exibiu um incremento na absorção comparada com a proteína reduzida, indicando provavelmente, que a proteína oxidada expõe os *clusters*, e o espectro reflete a presença e inserção adequada deles na proteína recombinante.

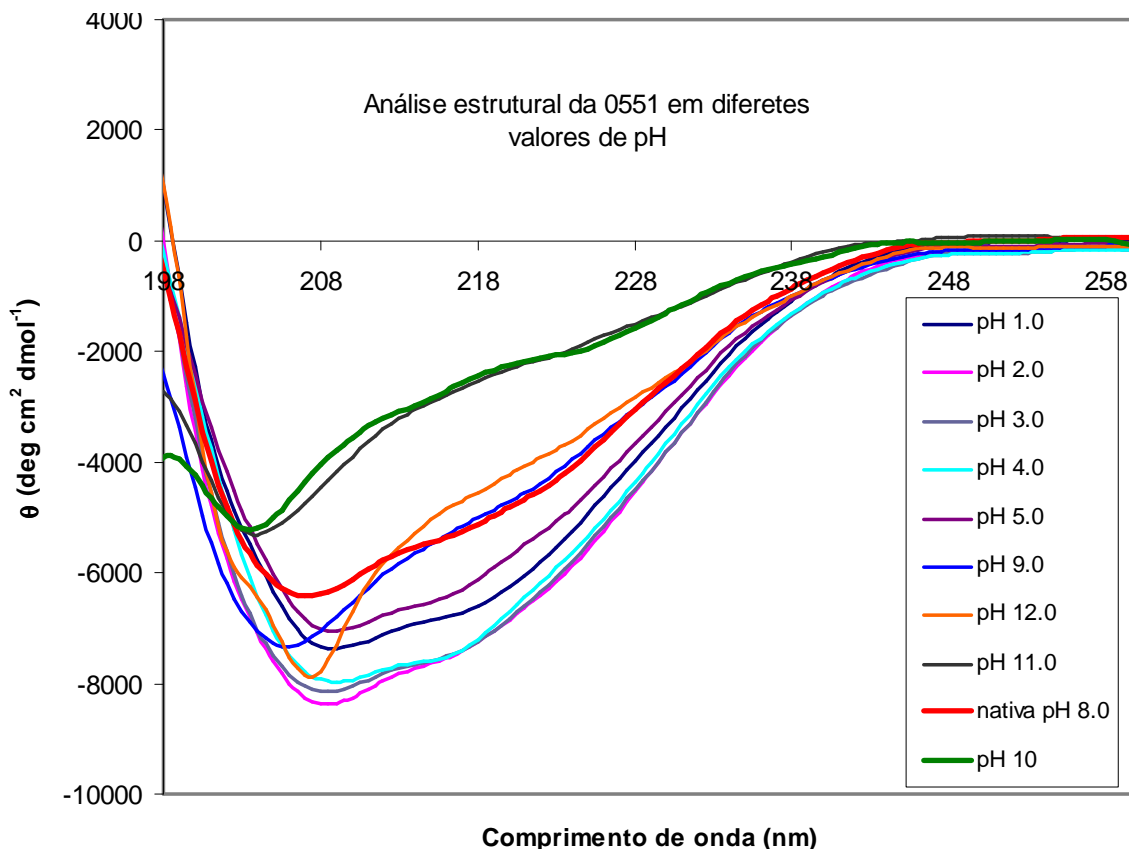


**Figura-36** Espectro no UV-visível da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene no locus *Afe\_0551*. A linha tracejada indica a proteína oxidada com 5 mM de persulfato de amônio e a linha contínua indica a proteína reduzida com 2 mM de DTT. O aumento na absorção na faixa entre 300 a 500 nm é mostrado.

### 4.3.6 Medidas de dicroísmo circular em diferentes pHs

#### 4.3.6.1 Medidas de CD no UV distante

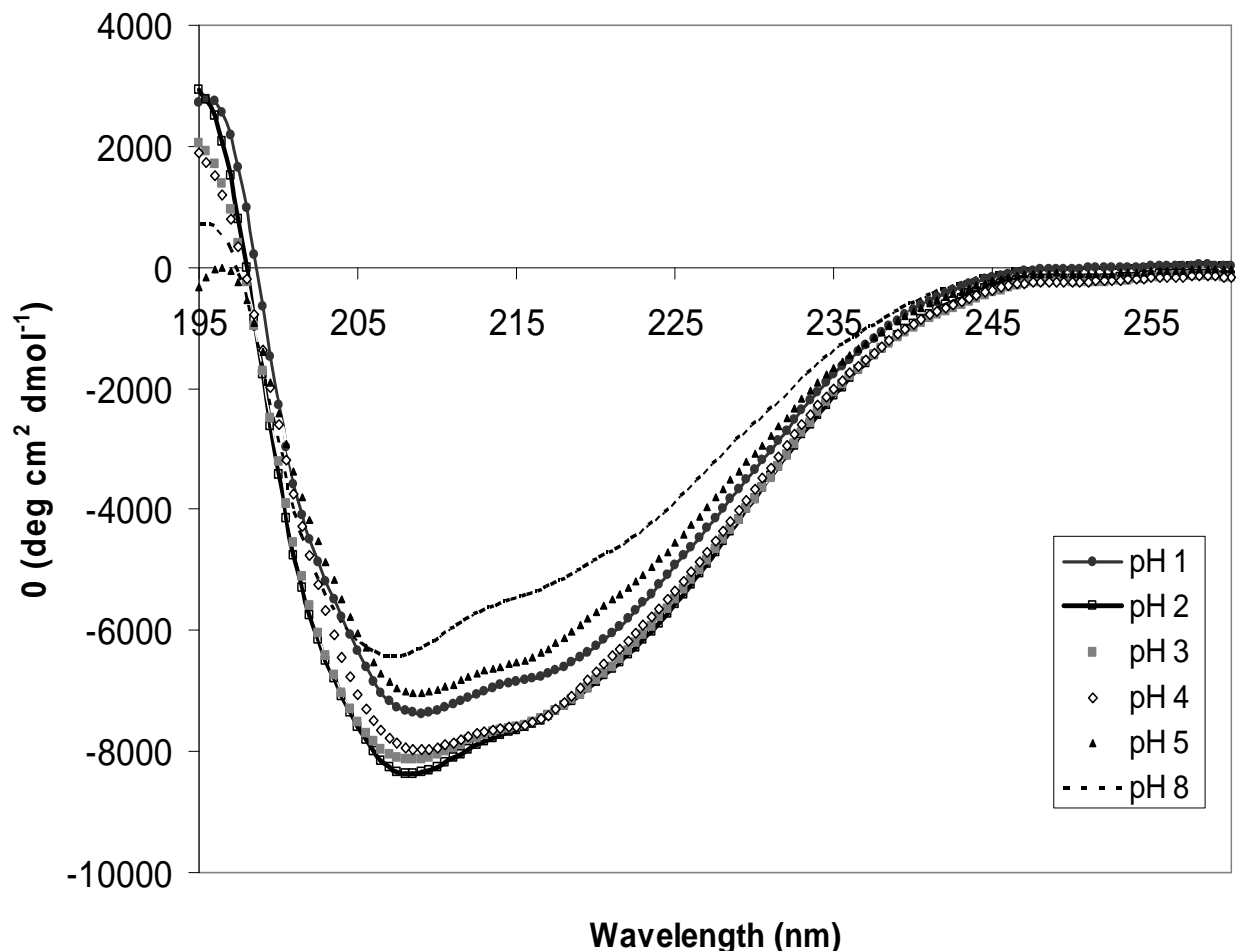
A Figura 37 mostra os espectros de CD obtidos nos diferentes pHs avaliados. Este experimento evidenciou que no pH 2 a proteína se encontra na condição de maior estruturação, com um espectro típico de alfa hélice no qual foram observados dois mínimos em 208 nm e 222 nm e um máximo em 195 nm (comparar com a Figura 6). Nos pHs 3 e 4 o espectro é muito similar ao pH 2, enquanto que nos pHs 1 e 5 a proteína perde um pouco de estrutura, porém conserva o espectro de alfa hélice. No pH 8 a proteína preserva um formato de alfa hélice, mas é muito menos estruturada comparada com os pHs 1 e 5, ver Figura 38.



**Figura-37** Espectros de CD, no UV distante, da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no lócus Afe\_0551 incubada em pHs entre 1 e 12 (amostras 9  $\mu$ M em tampão Tris-HCl). Média de 20 acumulações.

Os resultados se ajustam com a predição da estrutura secundária obtida a partir da seqüência de aminoácidos da proteína e realizada pelo programa PHD (Figura 40). Segundo esta predição a proteína é estruturada principalmente com alfa hélice.

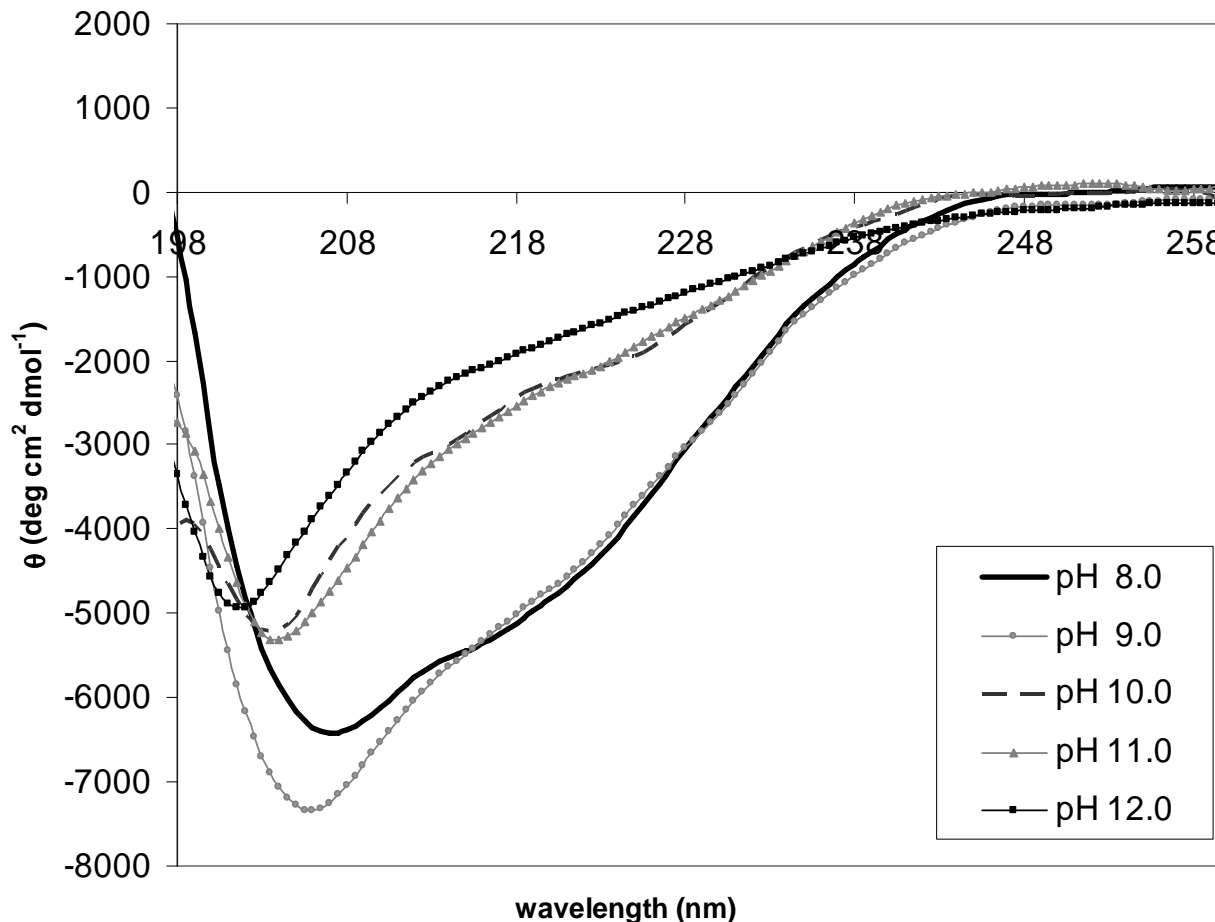
Nos pHs 6 e 7 a proteína precipita, sendo que seu espectro de CD é típico de uma proteína desnaturada. Este fenômeno pode ser explicado porque o ponto isoelétrico teórico desta proteína é 6.3, portanto, nesta faixa de pH ela apresenta uma carga total de zero que favorece sua precipitação devido à inibição de qualquer interação entre seus resíduos, causando desestabilidade estrutural.



**Figura-38** Espectros de CD, no UV distante, da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 incubada em pHs entre 1 e 5 (amostras 9  $\mu$ M em tampão Tris-HCl), comparada com pH 8 nativa (condições de purificação). Média de 20 acumulações.

A Figura 39 mostra os espectros de CD entre os pHs básicos desde 8 a 12. Em contradição aos espectros obtidos em pH ácido, a proteína incubada em pH básico

apresenta uma estrutura misturada entre folha beta e desordenada (comparar com a Figura 6). Em pH 8 a proteína alcança uma conformação nativa, devido possivelmente a que neste pH é realizada a purificação e *refolding* da proteína.



**Figura-39** Espectros de CD, no UV distante, da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no lócus *Afe\_0551* incubada em pHs entre 9 e 12 (amostras 9  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl), comparada com pH 8 nativa (condições de purificação). Média de 20 acumulações.

Em pH 9 a proteína perde seu máximo de alfa hélice em 195 nm e ganha estrutura randômica observando-se um mínimo perto de 205 nm, porém, ela parece conservar seu mínimo de alfa hélice em 222 nm. Já em pH 10 e 11 a estrutura muda completamente, sendo mais evidente a mistura entre folha beta e desordenada (mínimo em 204 nm). Em pH 12 a proteína parece ter uma estrutura mais randômica apresentando um evidente mínimo perto de 200 nm, ver Figura 39.

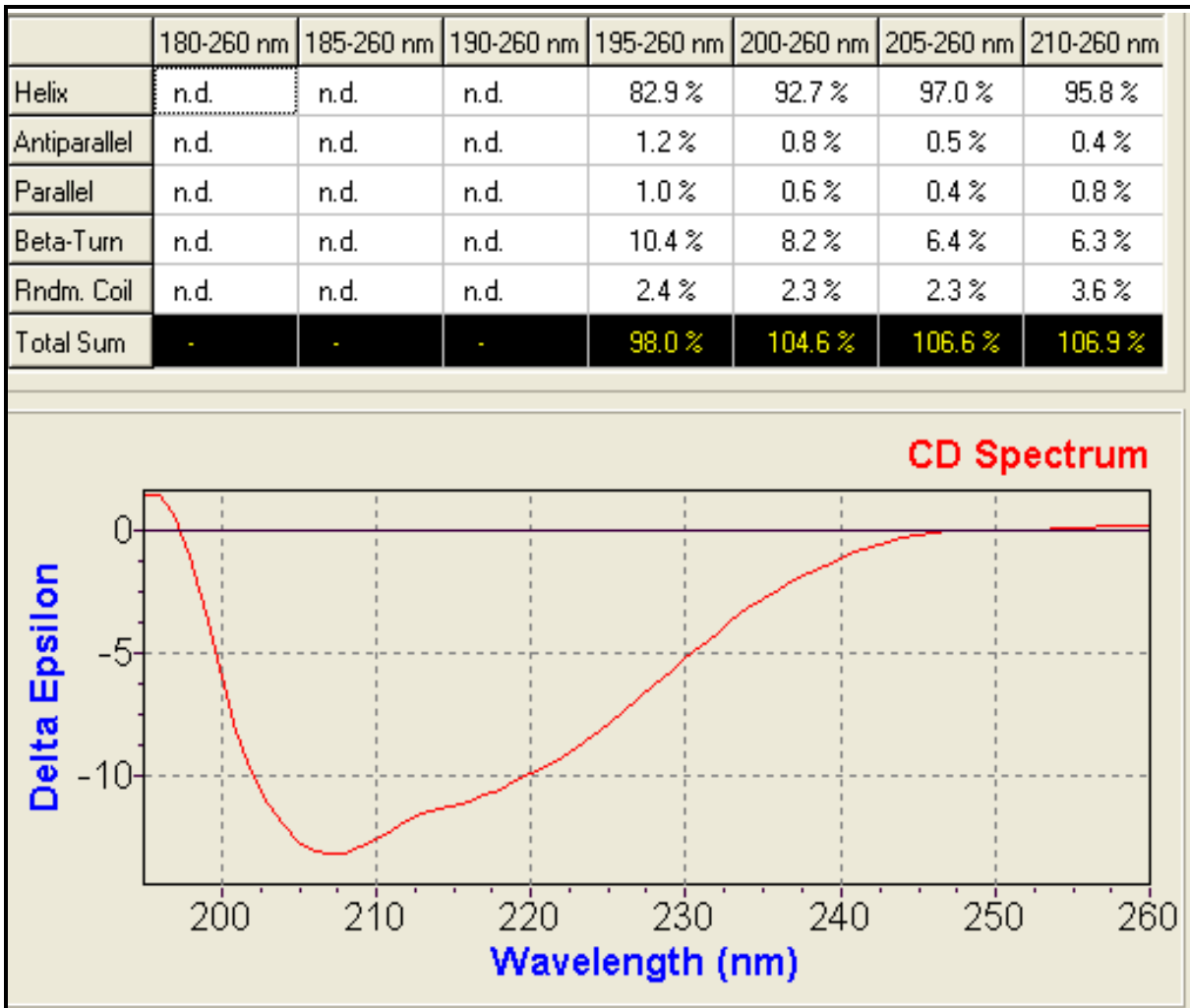
Em resumo, a proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551 pertencente à família de *cluster* Fe-S, evidenciou alta resistência e estabilidade em uma ampla faixa de pHs. Além disso, em pH ácido esta proteína apresenta o espectro de CD mais estruturado de alfa hélice sem sofrer mudanças drásticas de conformação e em pH básico sua estrutura sofre rearranjos e combinações entre folha beta e desordenada, no entanto, ela não desnatura completamente.

O conteúdo de estrutura secundária estimada a partir dos dados de CD no UV distante da proteína incubada nos diferentes pHs foi realizado utilizando o programa CDNN (ver Figuras 41 a 44).

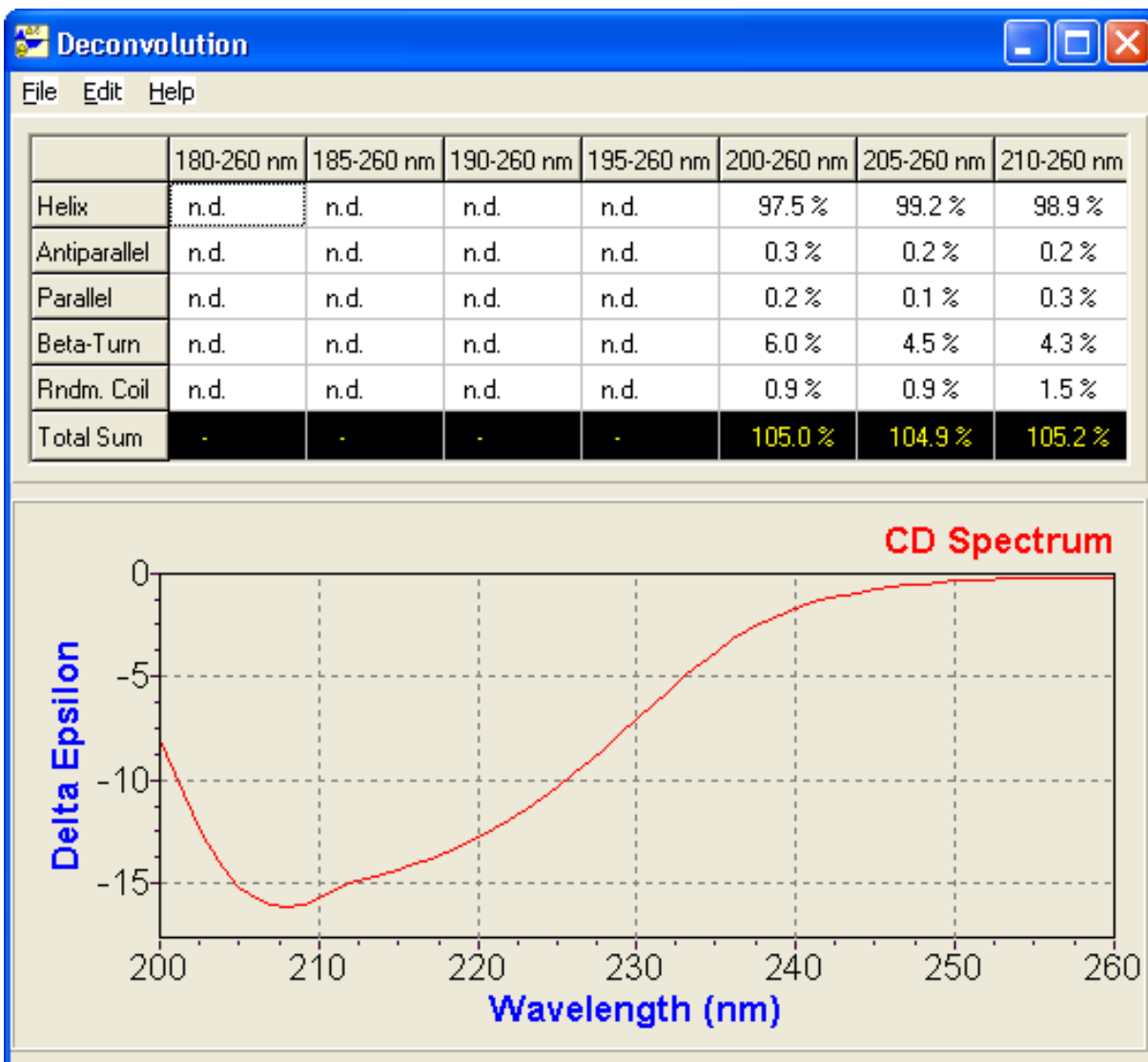
A estrutura secundária das proteínas não apresenta uma conformação geométrica simples; o espectro obtido a partir de medidas de CD no UV distante pode possuir todas as conformações em uma mistura delas e assim sendo, reflete a variabilidade geométrica dessa estrutura secundária em estudo (SREERAMA *et al.*, 1999). Neste trabalho, os resultados das medidas de CD mostraram uma alta variabilidade na faixa de pHs avaliados e essa variabilidade foi altamente correlacionada com as análises de predição de estrutura secundária realizado pelo programa CDNN, tornando-se uma ferramenta muito útil na interpretação deste tipo de dados.

Como observado na Figura 44, a proteína incubada em pH ácido entre 1 a 4, apresenta ao redor de 100% de estrutura alfa hélice. Por esta mesma análise, em pH 5 a proteína perde quase a metade de estrutura em alfa hélice e ganha em folha beta e randômica, porém este resultado não foi muito consistente com o espectro de CD (Figura 38). Nos pH 8 e 9 a perda estimada de alfa hélice foi em torno de 10% sendo compensada por ganho em folha beta. Já em pH 10 e 11 a perda estimada de alfa hélice aumenta para quase 40%, sendo que esse decréscimo parece ser contrabalançado com uma mistura entre folha beta e desordenada, resultado que foi mais concordante com os espectros de CD (Figura 39). Finalmente para o pH 12, o resultado tanto para o espectro de CD como para a análise estimativa de estrutura secundária realizada pelo programa CDNN, evidenciaram uma perda quase total de alfa hélice e uma ganho em estrutura randômica ao redor de 50% (Figura 44).



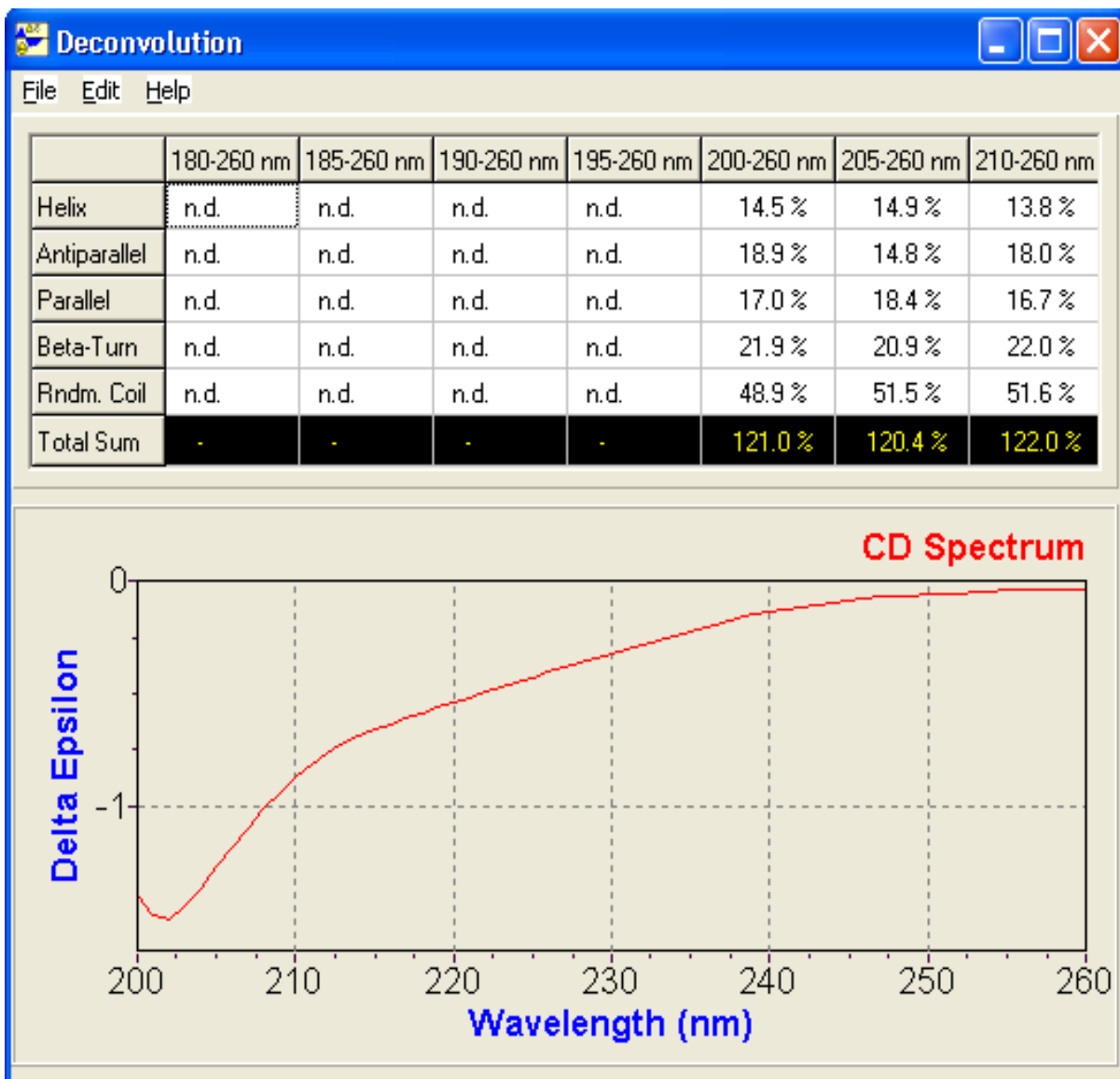


**Figura-41** Estimativa de porcentagem de estrutura secundária a partir dos dados de elipticidade molar obtidos por CD no UV-distante (198 nm e 260 nm) da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene Afe\_0551 em pH 8. A estimativa foi realizada pelo programa CDNN.

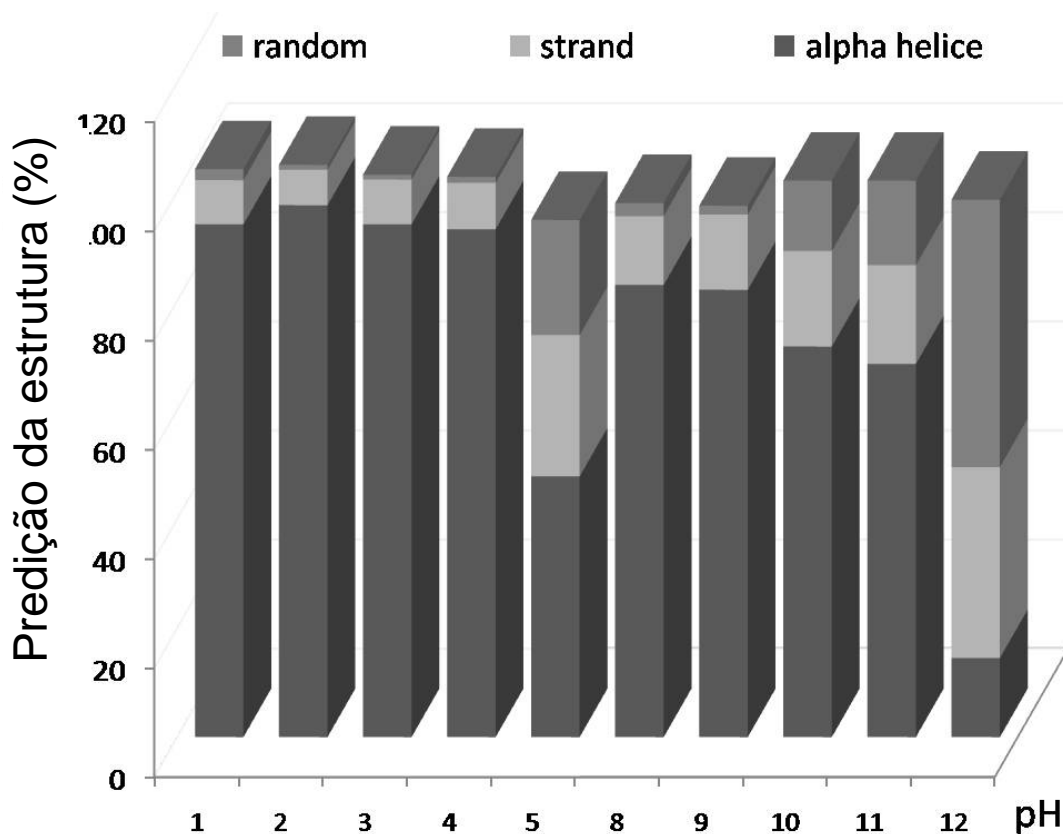


**Figura-42** Estimativa de porcentagem de estrutura secundária a partir dos dados de elipticidade molar obtidos por CD no UV-distante (198 nm e 260 nm) da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene Afe\_0551 em pH 2. A estimativa foi realizada pelo programa CDNN.





**Figura-43** Estimativa de porcentagem de estrutura secundária a partir dos dados de elipticidade molar obtidos por CD no UV-distante (198 nm e 260 nm) da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene Afe\_0551 em pH 12. A estimativa foi realizada pelo programa CDNN.



**Figura-44** Estimativa das percentagens de estrutura secundária: alfa hélice, folha beta e random coil, da proteína ligante do cluster Fe-S codificada pelo gene Afe\_0551 incubada em pHs entre 1 e 12. As percentagens de foram obtidas a partir da medida de CD no UV distante utilizando o programa CDNN.

A análise de seqüência realizada a proteína codificada pelo gene no locus Afe\_0551 (Figura 17), está em concordância com os resultados espectroscópicos de CD. Esta proteína possui grande quantidade de resíduos que podem conferir alta estabilidade estrutural em pH ácido, tais como resíduos aromáticos hidrofóbicos e polares (como exemplo: G24,29,57,94,140,162; W31,107,218 e V110,123,128), que foram altamente conservados em todas as proteínas que alinharam com uma alta porcentagem de identidade. Estes resíduos provavelmente protegem os *clusters* Fe-S frente a solventes, formando pontes de hidrogênio no eixo e nas cadeias laterais e fazendo interações eletrostáticas ao redor dos *clusters* (NOUAILLER *et al.*, 2006).

Por outro lado, a proteína tem nove prolinas que possivelmente estão envolvidas tanto em estabilização da estrutura em pH ácido como em termo estabilidade, sendo

que posicionado estrategicamente, este aminoácido pode conferir rigidez ou flexibilidade dependendo das condições do ambiente da proteína (BOTUYAN *et al.*, 1996; WALTER *et al.*, 1996; SCHÄFER *et al.*, 2004; NOUAILLER *et al.*, 2006).

Estes resultados também indicaram que o processo de alcalinização teve um efeito desestabilizador na estrutura secundária da proteína, enquanto que a acidificação teve o efeito contrário. Este fenômeno pode estar relacionado com o fato de que *A. ferrooxidans* possui proteínas, no periplasma, que são ácido estáveis. Estas proteínas com alto potencial redox são essenciais para o metabolismo energético desta bactéria, sendo que elas também pertencem à família de *cluster* Fe-S (NOUAILLER *et al.*, 2006). Além disso, a possível função predita na análise de seqüência para esta proteína, como sendo uma hetero dissulfeto redutase, tem sido amplamente estudada em microrganismos metanogênicos, nos quais estas enzimas comumente se encontram no periplasma (HEDDERICH *et al.*, 1999), fato que coincide com a localização das proteínas estáveis em pH ácido de *A. ferrooxidans*.

#### 4.3.6.2 Medidas de CD no UV próximo

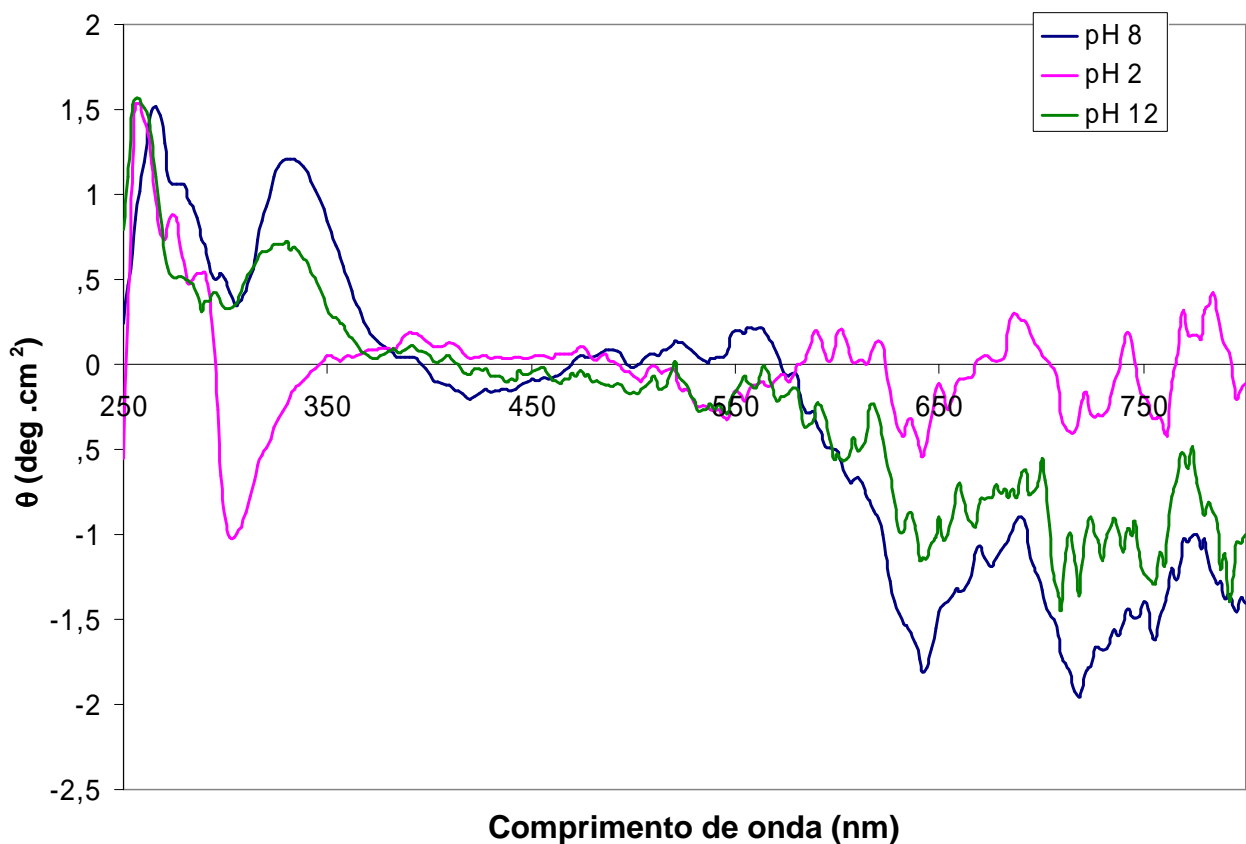
Com o objetivo de determinar se nas condições avaliadas a proteína conservava ligações de estrutura terciária e presença dos *clusters* Fe-S, foram realizadas medidas de CD no UV próximo na faixa entre 250 nm e 800 nm (Figura 45).

O espectro de CD de uma proteína na faixa do UV próximo (região espectral entre 250-350 nm) pode ser sensível à estrutura terciária. Nessas longitudes de onda, os cromóforos são de resíduos aromáticos e pontes dissulfeto e os sinais de CD que eles produzem representam a estrutura terciária da proteína. Sinais na região de 250-270 nm são atribuídos para resíduos de fenilalanina, sinais de 270-290 nm são atribuídos para resíduos de tirosina e aqueles entre 280-300 nm são atribuídos para resíduos de triptofano (GEORGAKOPOULOU *et al.*, 2009).

Por outro lado, uma proteína pode conservar sua estrutura secundária e não possuir uma estrutura tridimensional definida, como é o caso de uma proteína com estrutura de “*molten-globule*” ou renaturada incorretamente, na qual os sinais na região de UV próximo seriam perto de zero. Assim sendo, a presença de sinais, seja máximos

ou mínimos, nesta região é um bom indicativo de que a proteína foi renaturada corretamente (Alliance Protein Laboratories, 2008).

Como pode ser observada na Figura 45, a proteína recombinante de *cluster* Fe-S, apresentou estrutura terciária definida nos diferentes pHs avaliados, demonstrado pelo sinal de absorção na faixa entre 250 nm e 350 nm, independentemente deste sinal ser positivo ou negativo. Neste caso, o espectro da proteína em pH 2 foi diferente quando comparado com os pHs básicos, sendo que, em pH ácido foi observado um mínimo a 300 nm e em pH básicos um máximo a 330 nm que foi mais intenso em pH 8.



**Figura-45** Espectros de CD, no UV próximo, da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 incubada em pH 2, 8 e 12 (amostras 50  $\mu$ M em tampão Tris-HCl). Média de 20 acumulações.

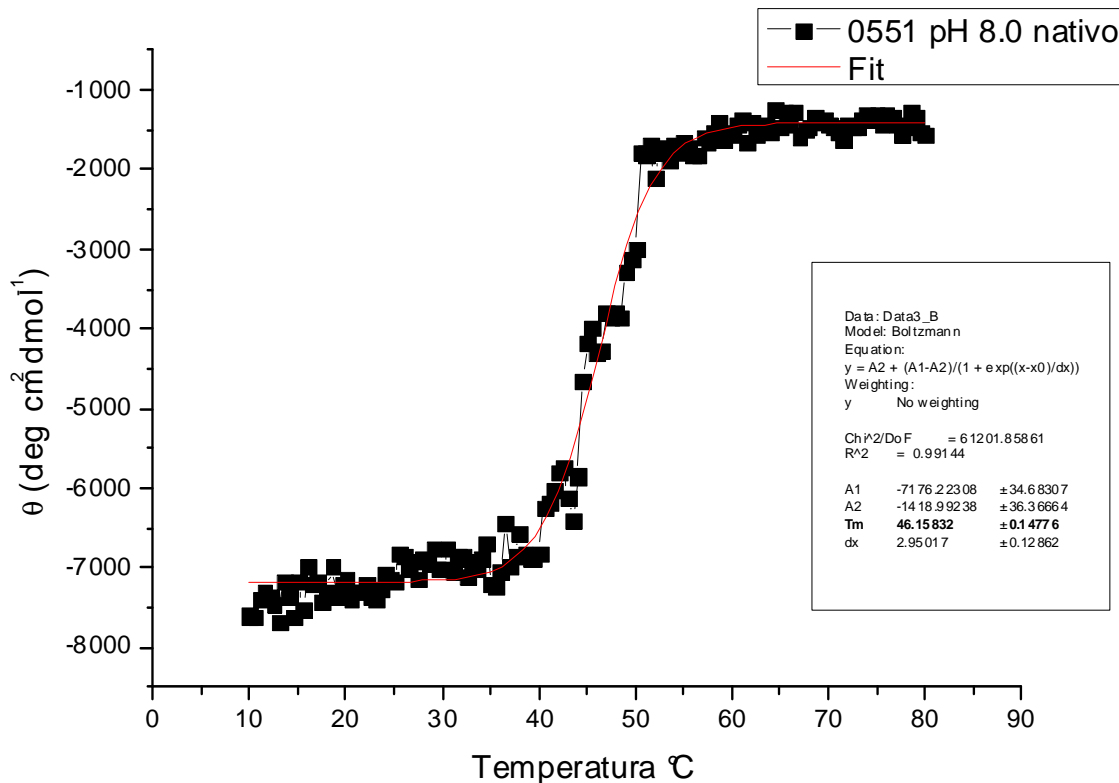
Na faixa entre 640 nm e 800 nm foram observados vários sinais de absorção que possivelmente podem ser atribuídos aos *clusters* de Fe-S (LEAL e GOMES, 2008), sendo que em pH 8 o espectro apresentou mínimos mais intensos quando comparados com os outros pHs. Esses mínimos foram: 642 nm, 716 nm, 756 nm e 794 nm. Uma

possível explicação pela maior intensidade observada em pH 8, seria que neste pH os *clusters* ficam mais expostos, sendo que em pH 2 a proteína é mais hidrofóbica e os *clusters* poderiam estar mais protegidos.

#### 4.3.7 Desnaturação térmica

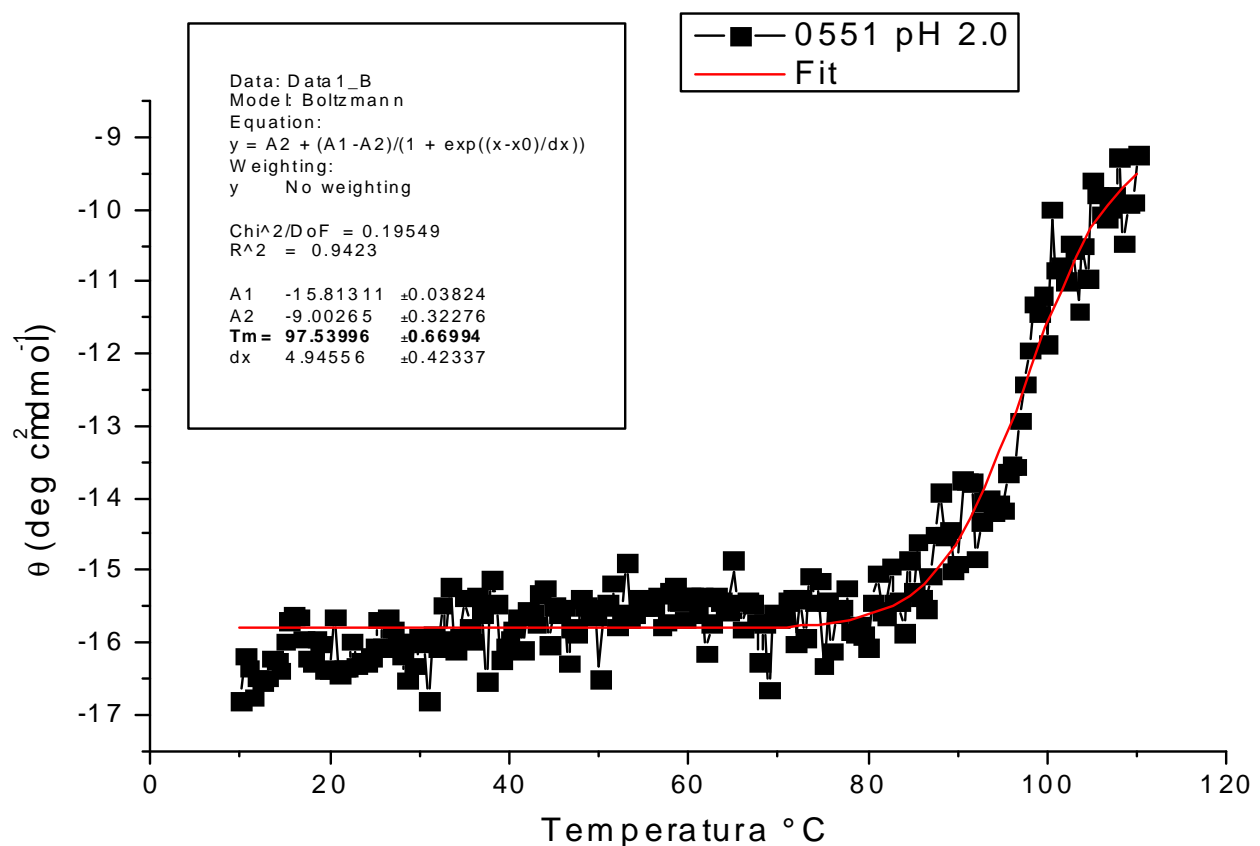
O dicroísmo circular também é uma excelente técnica para monitorar a desnaturação e renaturação de uma proteína em função da temperatura, podendo ser determinada à temperatura de transição entre o estado enovelado a desenovelado ( $T_m$ ).

Nas Figuras 46 a 51 se observa à curva do aumento de temperatura entre 10 a 110° C para diferentes pHs. Em pH 8, o gráfico é similar a uma típica curva sigmóide, própria de muitas proteínas de eucariotos e microrganismos mesófilos (MOCZYGEMBA *et al.*, 2001), com uma  $T_m$  de 46° C, ver Figura 46.

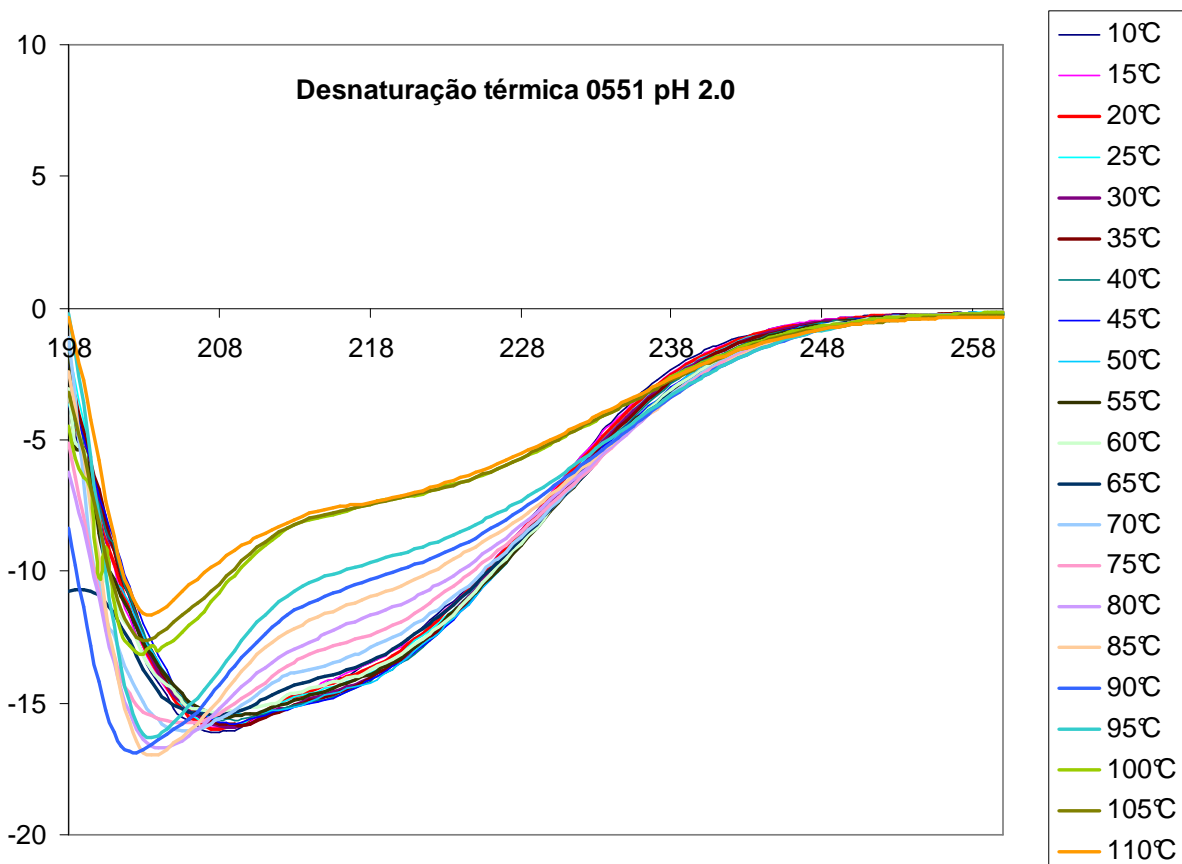


**Figura-46** Gráfico de subida de temperatura desde 10 a 110 °C da proteína ligante de *cluster* Fe-S codificada pelo gene Afe\_0551, incubada em pH 8 (condições de purificação).  $T_m$  46° C obtida através de regressão sigmoidal.

No entanto, para o pH 2 o gráfico muda completamente (Figura 47) e a Tm encontrada é similar a dos microrganismos termófilos que crescem em torno de 100° C (LEAL e GOMES, 2008). Os resultados tanto da Tm como o do espectro de CD em pH 2, (ver Figura 37), no qual a proteína é mais estruturada, evidenciaram que nesta condição a proteína é altamente estável e resistente à temperatura. Além disso, o conjunto de espectros de CD medidos através do aumento da temperatura a cada 5° C confirma esta alta resistência, já que até 110° C a proteína não precipita e não desnatura completamente, ver Figura 48.

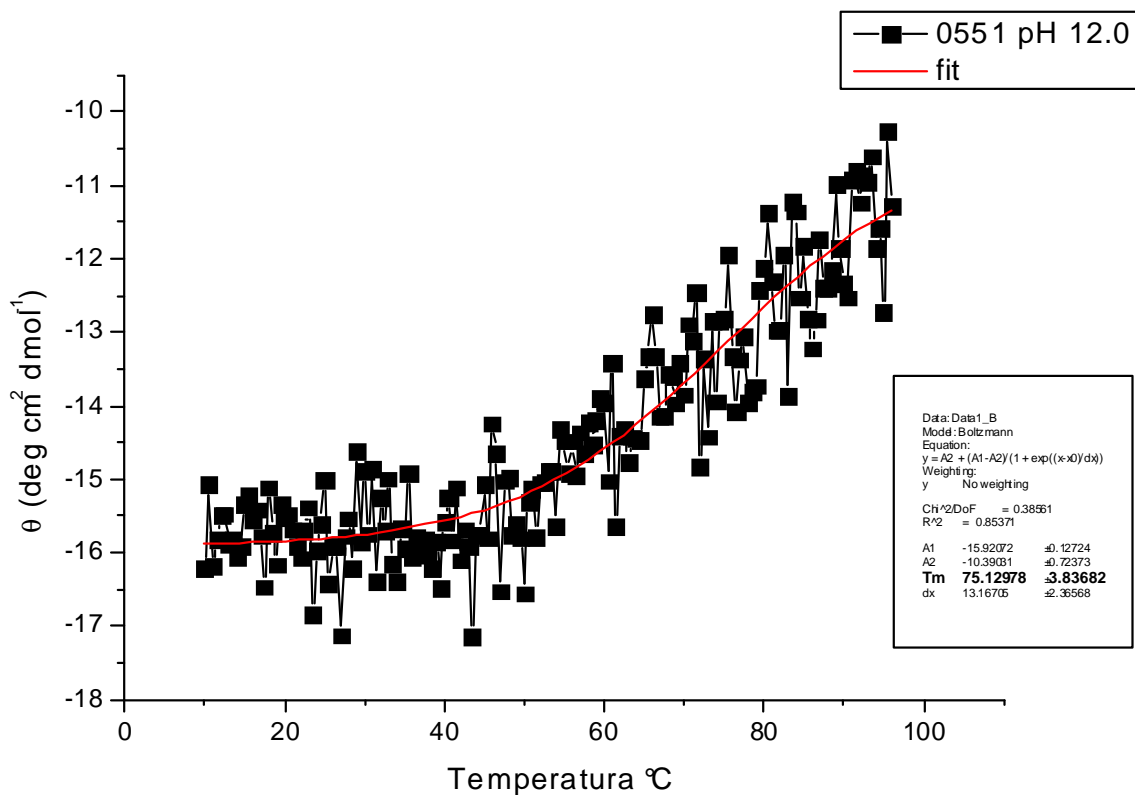


**Figura-47** Gráfico de subida de temperatura desde 10 a 110 °C da proteína ligante de *cluster* Fe-S codificada pelo gene *Afe\_0551*, incubada em pH 2. Tm 97,5° C obtida através de regressão sigmoidal.



**Figura-48** Conjunto de espectros de CD de proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 incubada em pH 2 e temperatura entre 10 a 110° C (amostra 9 µM em tampão Tris-HCl). Média de 20 acumulações.

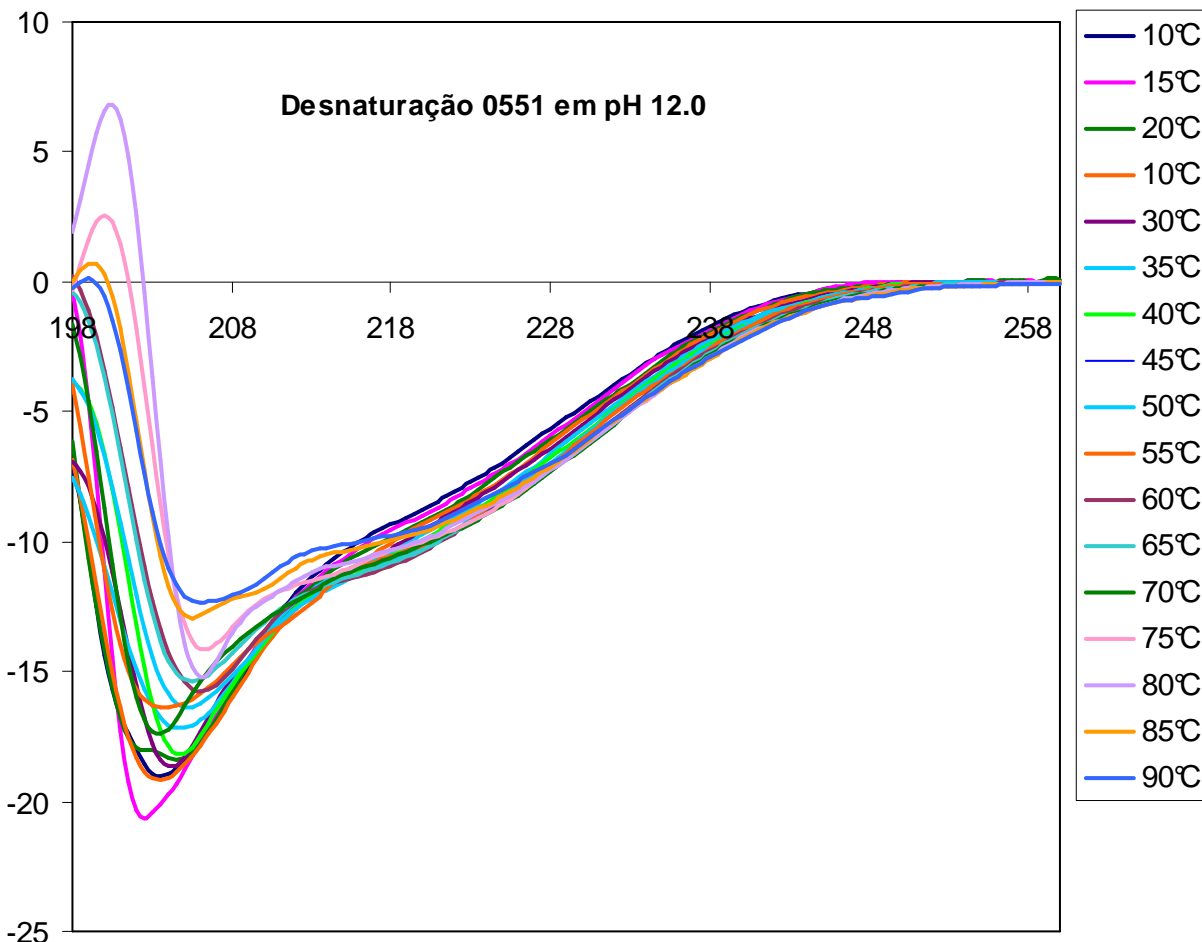
Na Figura 49 pode ser observado o gráfico de aumento de temperatura para o pH 12. Neste pH a  $T_m$  encontrada foi de 75° C, demonstrando também resistência à temperatura, porém o espectro de CD em pH 12, (ver Figura 39), revela que a proteína tem uma estrutura predominantemente randômica. Na Figura 50 observa-se o conjunto de espectros de CD medidos através do aumento da temperatura a cada 5° C, que corrobora sua resistência à temperatura, sendo que em 90° C a proteína não precipita e não desnatura completamente.



**Figura-49** Gráfico de subida de temperatura desde 10 a 110° C da proteína ligante de *cluster* Fe-S codificada pelo gene Afe\_0551, incubada em pH 12. **Tm 75° C** obtida através de regressão sigmoidal.

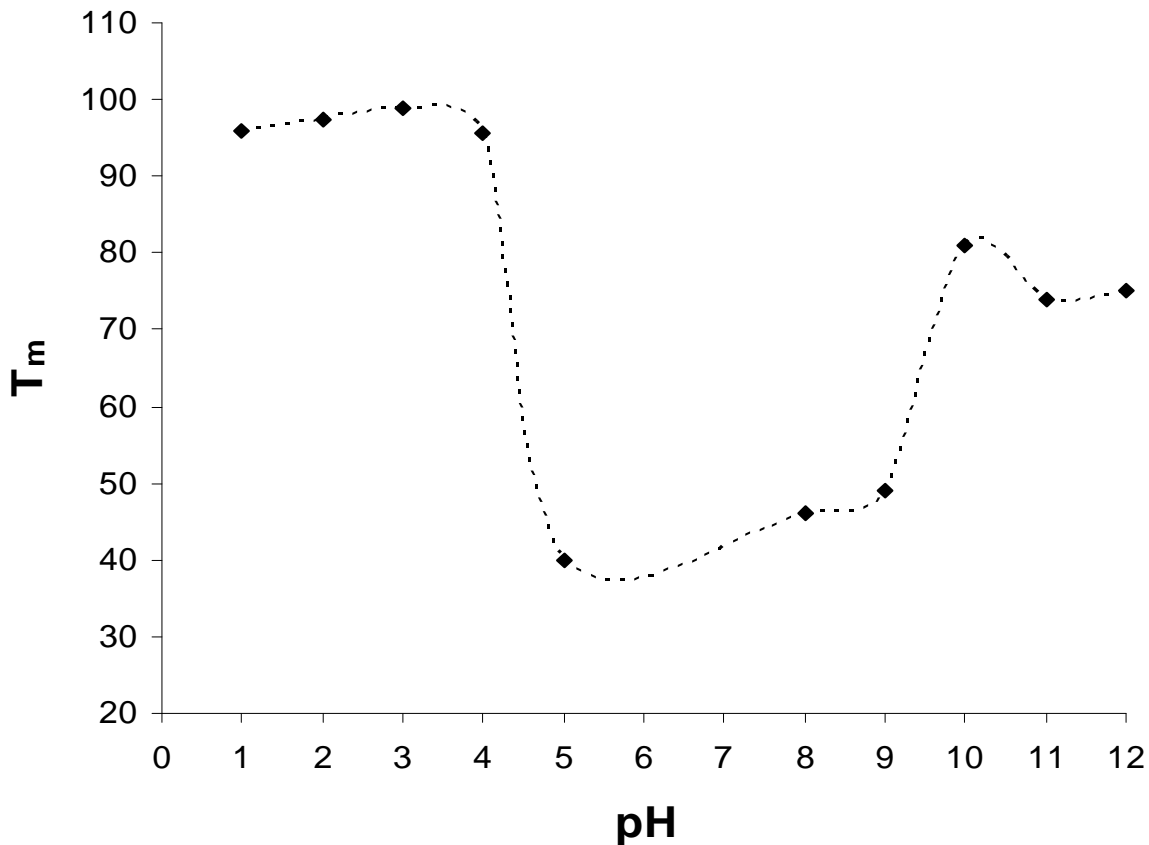
O resumo dos resultados de desnaturação térmica é apresentado na Figura 51. A proteína recombinante codificada pelo gene no locus Afe\_0551 mostrou uma alta termo estabilidade em pH ácido, na faixa entre 1 a 4, com uma Tm em torno de 95° C. Por outro lado em pH básico, entre 10 a 12, a proteína também apresentou uma resistência alta à temperatura com uma Tm ao redor de 77° C. De acordo com estes resultados, parece ser que uma alta estruturação, principalmente em alfa hélice, da proteína em pH ácido provavelmente está relacionada com a alta resistência a temperatura. Apesar de que a desnaturação térmica mostrou-se um processo irreversível, uma vez que as amostras aquecidas até 110° C não voltaram a apresentar espectro de CD semelhante ao seu estado nativo, mesmo após rápido ou lento resfriamento para 10° C, não foi observada precipitação de nenhuma amostra protéica.





**Figura-50** Conjunto de espectros de CD de proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 incubada em pH 12 e temperatura entre 10 a 110° C (amostra 9 µM em tampão Tris-HCl). Média de 20 acumulações.

É possível que a alta resistência à temperatura tanto em pH ácido como básico, seja devido a efeitos aditivos de vários fatores, entre eles, a um incremento do número de pontes de hidrogênio em pH ácido e a novas interações eletrostáticas de van der Waals. Comportamentos similares de desnaturação térmica têm sido reportados para proteínas ferredoxinas de vários microrganismos hipertermófilos. Nessas proteínas as vias de desnaturação envolvem formação de estados transitórios, nos quais, o polipeptídeo sofre rearranjos de conformação conservando contatos com os *clusters* de Fe-S, sendo que esse fenômeno possivelmente confere uma alta resistência à temperatura (GOMES *et al.*, 1998; MOCZYGEMBA *et al.*, 2001; LEAL e GOMES, 2008).



**Figura-51** Dependência do pH na temperatura de transição da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551. T<sub>m</sub> = 96 °C (pH 1); T<sub>m</sub> = 97,5 °C (pH 2); T<sub>m</sub> = 99 °C (pH 3); T<sub>m</sub> = 95,5 °C (pH 4); T<sub>m</sub> = 40 °C (pH 5); T<sub>m</sub> = 46 °C (pH 8); T<sub>m</sub> = 49 °C (pH 9); T<sub>m</sub> = 81 °C (pH 10); T<sub>m</sub> = 74 °C (pH 11); T<sub>m</sub> = 75 °C (pH 12).

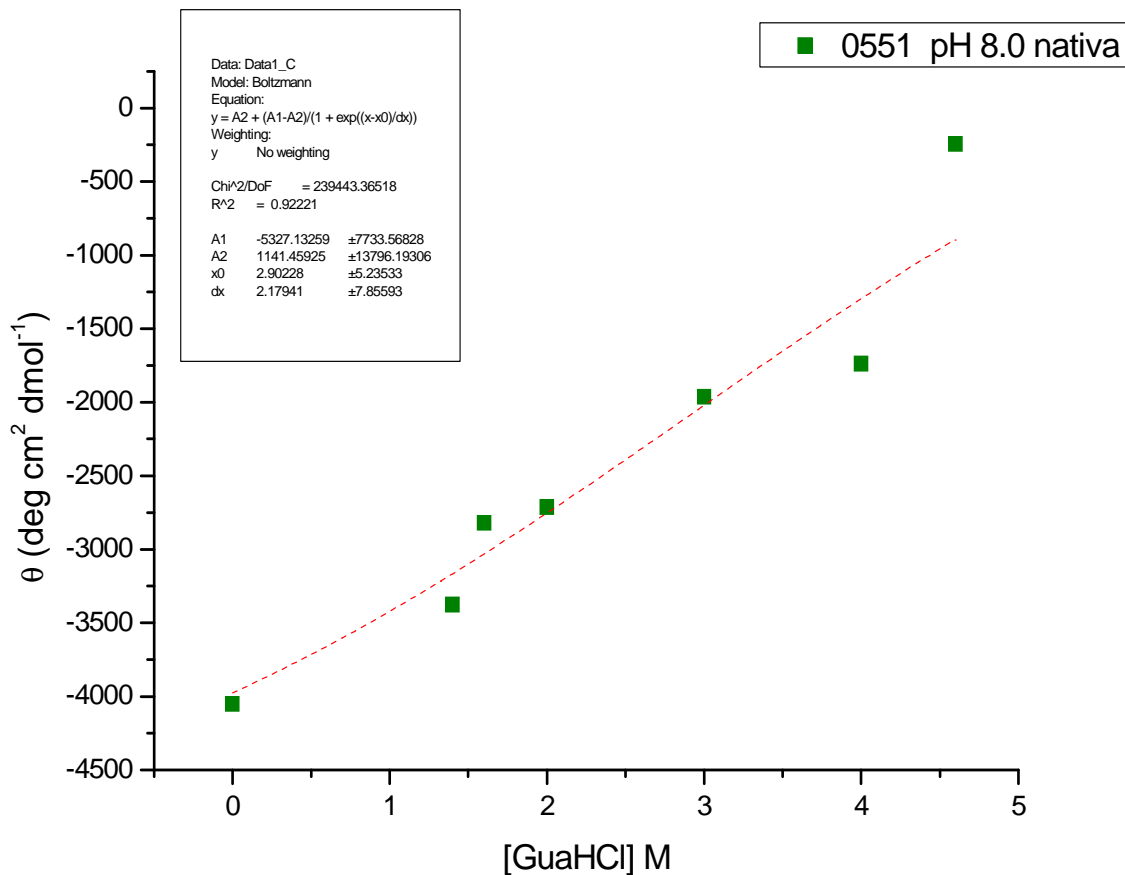
Estas análises espectroscópicas realizadas com a proteína de *cluster* Fe-S fornecem parâmetros essenciais para a utilização de proteínas que possam auxiliar o processo de biolixiviação.

#### 4.3.8 Desnaturação química

Os resultados de estabilidade da estrutura secundária por CD no UV distante frente à variação do pH na presença de diferentes concentrações do agente químico guanidina-HCl são apresentados nas Figuras 52 a 55. As medidas de CD foram

realizadas a 25° C empregando concentrações de 0 a 7 M de guanidina-HCl dependendo do pH avaliado.

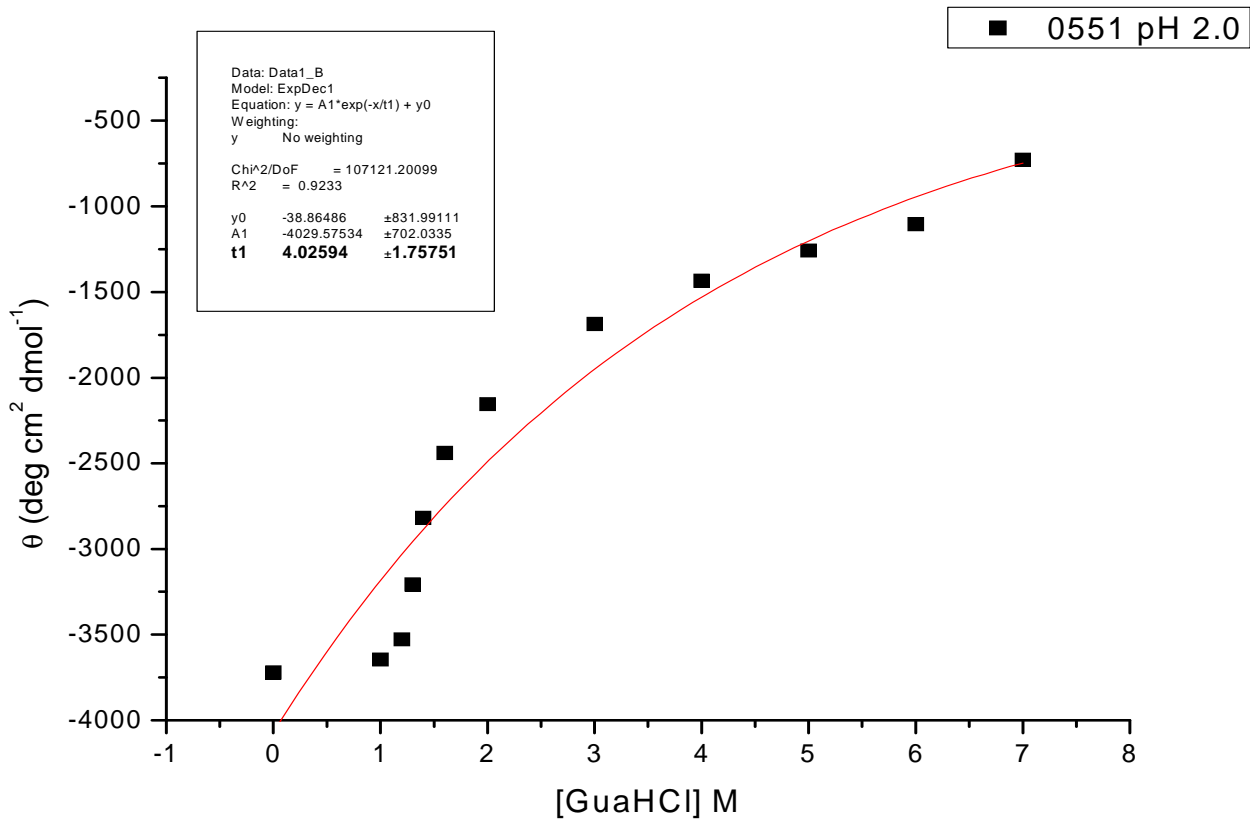
Como pode ser observado na Figura 52, em pH 8 ocorre um decréscimo gradativo na elipticidade a 222 nm com o aumento da concentração de guanidina-HCl, sugerindo uma perda cooperativa no conteúdo de alfa hélice da estrutura secundária, sendo que a 4,5 M de guanidina-HCl a proteína desnatura completamente e o ponto médio no qual a proteína perde a metade de sua estrutura foi entorno de 2 M.



**Figura-52** Gráfico de estabilidade da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 (nativa pH 8) incubada em concentrações crescentes de guanidina GuHCl (1 a 4.6 M). Ponto médio na transição de desnaturação **2,17 M** obtido através de regressão sigmoideal.

Por outro lado em pH 2, à proteína apresenta uma maior estabilidade frente ao aumento na concentração de guanidina-HCl, já que o ponto médio encontrado na transição da desnaturação foi de 4 M, o qual foi o dobro comparado com o pH 8, ver

Figuras 53 e 55. Além disso, o processo de diminuição na elipticidade a 222 nm não foi constante, nem drástico, quando comparado com o pH 8, sendo que foi preciso adicionar até 7 M do agente químico para ser observada a desnaturação da proteína.

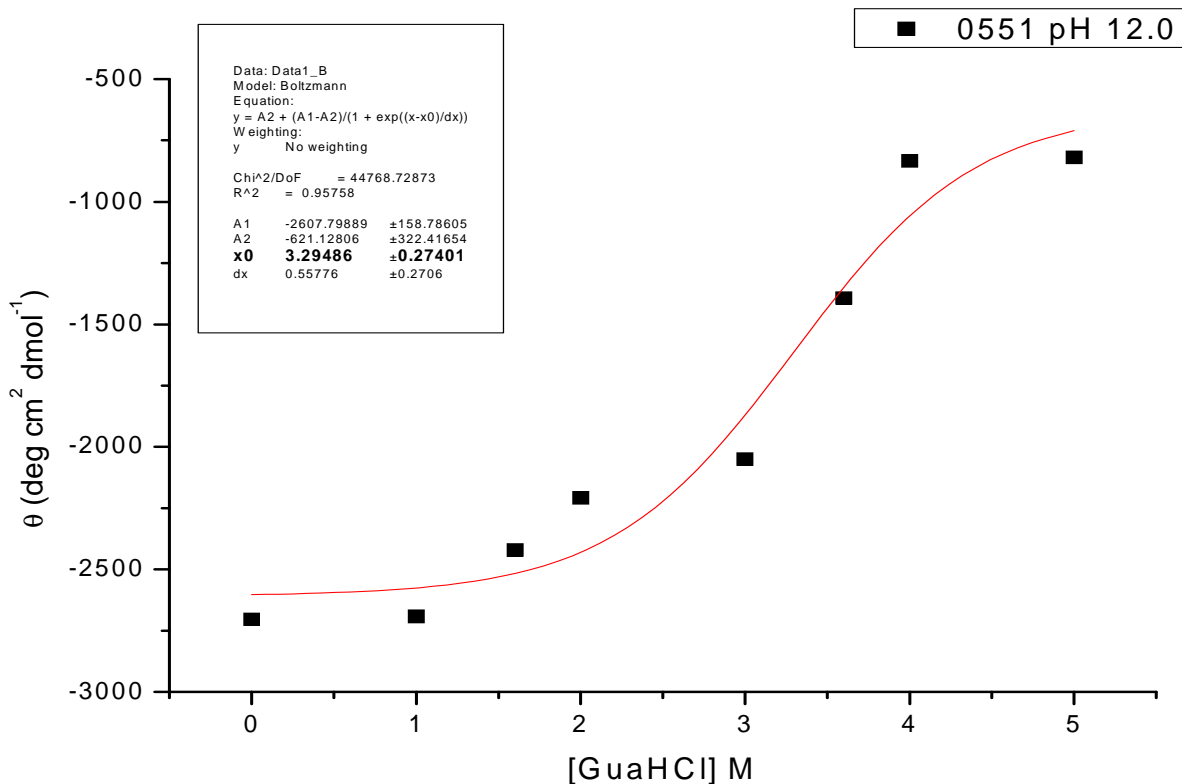


**Figura-53** Gráfico de estabilidade da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 (pH 2) incubada em concentrações crescentes de guanidina GuHCl (1 a 7 M). Ponto médio na transição de desnaturação **4,02 M** obtido através de regressão sigmoideal.

Finalmente em pH 12, a proteína também apresentou maior estabilidade ao aumento de guanidina-HCl quando comparada com pH 8, porém, essa estabilidade ainda é menor comparada com pH 2, ver Figuras 54 e 55. Neste pH a proteína perdeu a metade da sua estrutura em torno de 3 M, sendo que a partir desta concentração, a caída na elipticidade é bem exponencial e a 5 M de guanidina-HCl ela desnatura completamente.

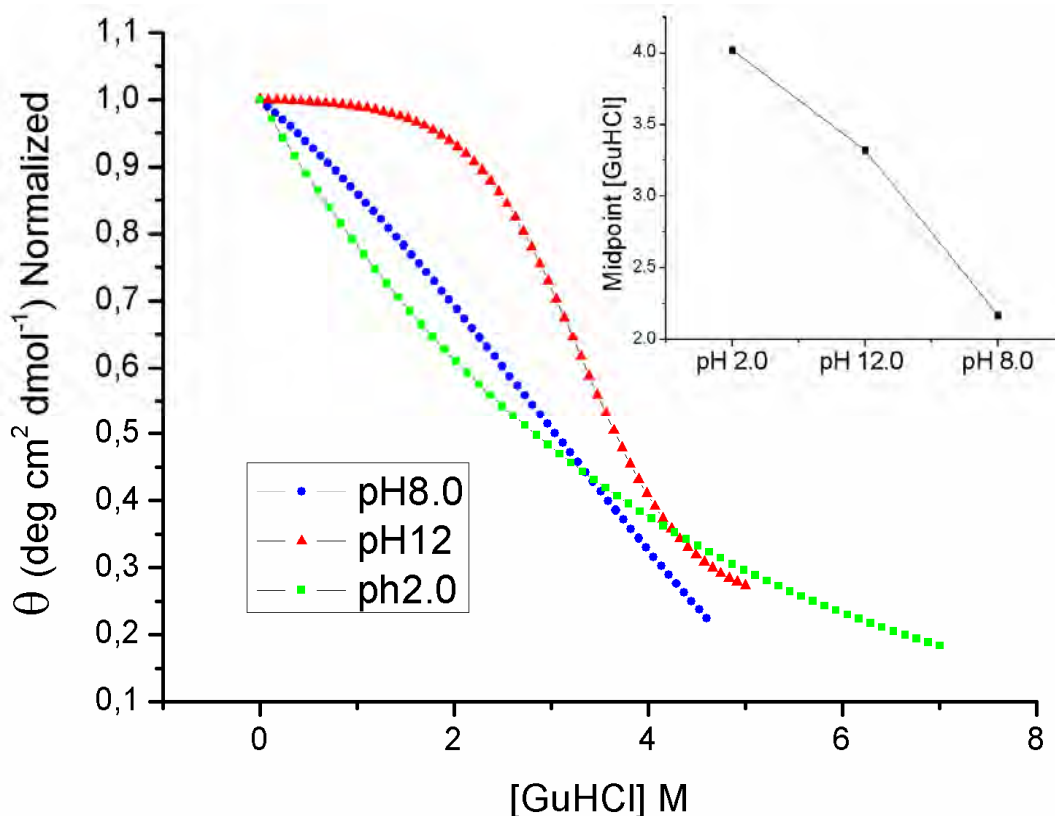
Cabe assinalar que em pH 12, a proteína não apresenta uma estrutura de alfa hélice e se uma dominância em estrutura randômica. Portanto, a resistência à

desnaturação química encontrada pode ser devido à presença dos *clusters* de Fe-S, como acontece igualmente, com a resistência à temperatura observada em pHs básicos extremos.



**Figura-54** Gráfico de estabilidade da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 (pH 12) incubada em concentrações crescentes de guanidina GuHCl (1 a 5 M). Ponto médio na transição de desnaturação **3,29 M** obtido através de regressão sigmoide.

Em resumo, os resultados de estabilidade da estrutura secundária frente a adições crescentes do agente químico guanidina-HCl, demonstraram que em pH 2 a proteína é mais resistente comparada com os pHs 8 e 12, sendo que neste pH ácido o ponto médio encontrado no qual ocorre uma perda da metade da estrutura é de 4 M de GuHCl (Figura 55). Estes resultados estão em concordância com as análises de CD e resistência à temperatura, que evidenciaram uma alta termo estabilidade e dominância de alfa hélice em pH ácido.



**Figura-55** Gráfico de dependência de pH na estabilidade da proteína *cluster Fe-S* codificada pelo gene no locus *Afe\_0551* (pH 8, 2 e 12) incubada em concentrações crescentes de guanidina GuHCl. Dados normalizados. Os pontos médios na transição de desnaturação em função do pH são mostrados no enquadramento.

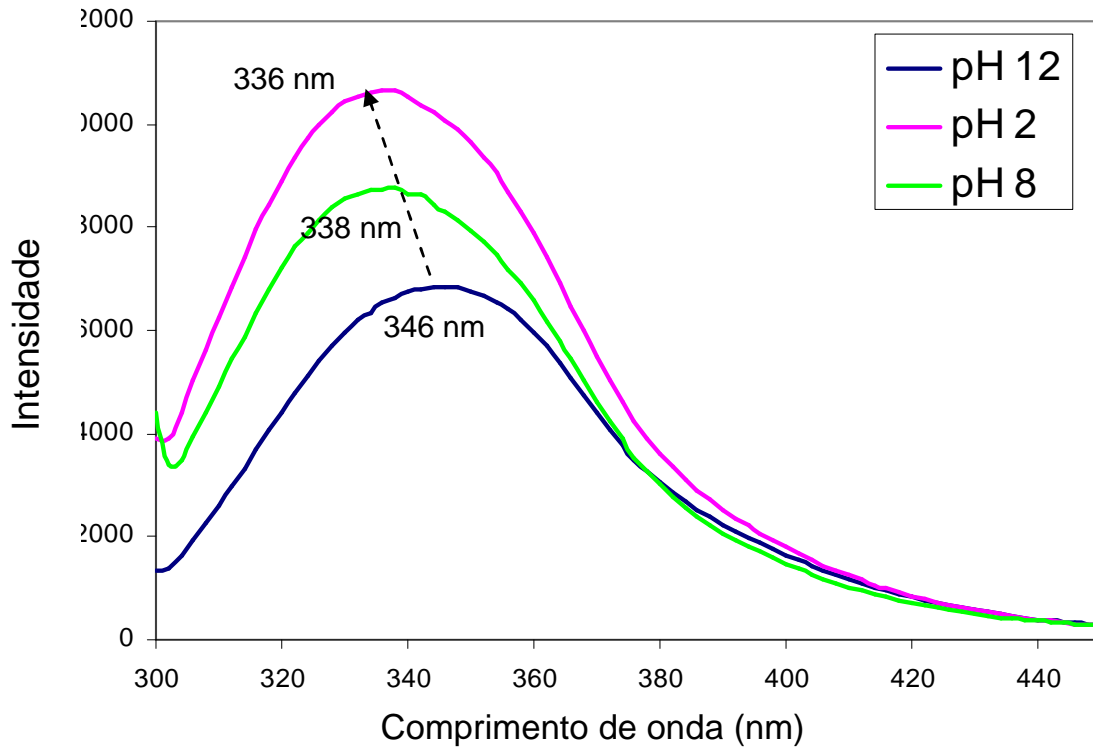
#### 4.3.9 Medidas de Emissão de Fluorescência

O ambiente dos sete resíduos de triptofano presentes na seqüência primária da proteína de *cluster Fe-S* codificada pelo gene no locus *Afe\_0551*, foram monitorados por espectroscopia de emissão de fluorescência a fim de complementar e confirmar os anteriores resultados de CD quanto à integridade estrutural e a estabilidade em diferentes pHs. Mudanças na emissão de fluorescência revelam informações sobre acessibilidade de solventes e sobre a hidrofobicidade do meio ao redor destes resíduos. O resíduo de triptofano atua como uma sonda espectral para a estrutura terciária da proteína (LAKOWICZ *et al.*, 1999). Na seqüência primária desta proteína de *cluster Fe-*

S, parece ser que os resíduos de triptofano se localizam em zonas estratégicas perto das cisteínas ligantes dos *clusters*, provavelmente exercendo um papel protetor. Além disso, estes resíduos foram altamente conservados nas proteínas das espécies que alinharam com alta identidade (Figura 17), evento que também pode estar relacionado com a importância deste aminoácido na estabilidade da proteína.

O espectro de emissão de fluorescência intrínseca da proteína de *cluster* Fe-S em diferentes pHs é mostrado na Figura 56.

Como observado na Figura 56, em pH 2 a proteína apresenta o máximo de emissão de fluorescência em 336 nm ( $\lambda_{\text{max}}$ ), indicando que neste pH os resíduos de triptofano estão internalizados na proteína, portanto, neste ambiente provavelmente a proteína é mais hidrofóbica. Nos pHs 8 e 12, ocorreu uma diminuição na intensidade da fluorescência, além de um deslocamento para o vermelho, no pico de emissão (338 nm e 346 nm, respectivamente), sugerindo que nesses pHs o ambiente dos resíduos de triptofano tornou-se mais hidrofílico. Em pH 12, tanto a diminuição da intensidade como o deslocamento no pico de emissão foi mais drástico quando comparado com o pH 8. Assim sendo, neste pH extremo, os resíduos de triptofano podem estar mais expostos à água e a proteína provavelmente começa a desenovelar. Este fenômeno possivelmente está em concordância com o espectro de CD (Figura 39) que mostra predominância de estrutura randômica em pH 12.



**Figura-56** Espectros de emissão de fluorescência da proteína *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551 a valores de pH 2, 8 e 12. As medidas foram realizadas com excitação a 295 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada no intervalo de 300 nm a 450 nm. A concentração de proteína utilizada foi de 5  $\mu$ M.



## 5. CONCLUSÕES

- Os resultados de expressão gênica podem indicar que os genes envolvidos em adesão e reconhecimento de grupos tióis não foram recrutados pela bactéria depois de 24 h de incubação com calcopirita. Provavelmente nesse momento a célula precisa da ativação de outros genes essenciais à sobrevivência, tais como aqueles envolvidos no seu metabolismo basal ou na adaptação ao novo ambiente.
- Depois de 20 dias de incubação, os genes envolvidos em “*pilus assembly*”, pilinas, *pilus* tipo IV e alguns do *cluster* Fe-S, são induzidos, indicando que provavelmente as células estão buscando se aderir ao minério.
- A avaliação de células livres e aderidas depois de 2 h de incubação, revela a importância destes genes no processo de adesão, já que os níveis de expressão são significativamente diferentes, sendo que os valores das células livres ficaram altos comparados com as células aderidas.
- Em resumo, parece que o processo de adesão e reconhecimento de grupos tióis é favorecido nas primeiras horas de incubação com calcopirita, tempo no qual, provavelmente, as células estão mais aptas para aderir ao minério.
- Os resultados sugerem também, que o inóculo mais “jovem”, ou seja, no começo da fase de crescimento logarítmica (60% de oxidação de  $Fe^{2+}$ ), parece ter mais capacidade para aderir ao minério, indicado pela maior expressão dos genes envolvidos em adesão.

- A proteína recombinante ligante de *cluster* Fe-S codificada pelo gene no locus Afe\_0551, foi expressa adequadamente em células de *E. coli* BL21 (DE3). Além disso, foram estabelecidos protocolos eficientes de purificação e renaturação da proteína a partir de corpos de inclusão.
- Esta proteína apresentou uma alta resistência e termo estabilidade em uma ampla faixa de pH de 1 a 12.
- As medidas de CD no UV distante revelaram que a proteína é altamente estruturada em pH ácido na faixa entre 1 e 4, na qual prevalece um alto conteúdo de alfa hélice. Nestas condições a proteína também apresenta uma grande estabilidade térmica, sendo que sua temperatura de transição se encontra em torno de 100 °C. Na faixa de pH básico entre 9 e 11, a proteína provavelmente sofre um rearranjo com adições de folha beta e estrutura randômica. Já em pH básico extremo de 12, a proteína é menos estruturada e uma estrutura desordenada prevalece.
- As medidas de CD no UV próximo demonstraram que a proteína recombinante foi renaturada corretamente, conservando sua estrutura terciária e os *clusters* de Fe-S em diferentes pHs.
- Os resultados de CD no UV distante apresentaram uma alta correlação com programas de predição de estrutura secundária, o qual foi uma ferramenta muito útil na interpretação dos dados.
- Os experimentos de desnaturação química evidenciaram uma alta estabilidade da estrutura secundária frente a adições crescentes do agente químico guanidina-HCl, em pH 2, sendo que neste pH a proteína é mais resistente comparada com os pHs 8 e 12.

- As medidas de emissão de fluorescência confirmaram que em pH 2 a proteína apresentou o máximo de intensidade indicando que os resíduos de triptofano se encontram internalizados e que o ambiente é mais hidrofóbico quando comparado com os pHs 8 e 12.
- Em geral, todas as análises de caracterização biofísica evidenciaram que a proteína é altamente estável em pH ácido, sendo que em pH 2 apresentou a maior estrutura secundária, resistência à temperatura, resistência à desnaturação química e grande hidrofobicidade, resultados que podem sugerir que este seja o pH ótimo de atividade dela.
- As análises espectroscópicas realizadas com a proteína de *cluster* Fe-S forneceram parâmetros essenciais para a utilização de proteínas que possam auxiliar o processo de biolixiviação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABKEN, H. J.; TIETZE, M.; BRODERSEN, J.; BÄUMER, S.; BEIFUSS, U.; DEPPENMEIER, U. Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2027-2032, 1998.

ATOMI, H. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 166-173, 2005.

BAKER-AUSTIN, C.; DOPSON, M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 165-171, 2007.

BANCIU, H.; SOROKIN, D. Y.; GALINSKI, E. A.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; KUENEN, J. G. *Thioalkalivibrio halophilus* sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, facultatively alkaliphilic, and extremely salt-tolerant, sulfur-oxidizing bacterium from a hypersaline alkaline lake. **Extremophiles**, v. 8, p. 325-334, 2004.

BARRETO, M.; JEDLICKI, E.; HOLMES, D. S. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environment Microbiology**, v. p. 71, 2902-2909, 2005.

BHATTACHARJEE, M. K.; KACHLANY, S. C.; FINE, D. H.; FIGURSKI, D. H. Nonspecific adherence and fibril biogenesis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: TadA protein is an ATPase. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5927-5936, 2000.

BEBIE, J.; SCHOONEN, M. A.; FUHRMANN, M.; STRONGIN, D. R. Surface charge development on transition metal sulfides: an electrokinetic study. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 62, p. 633-642, 1998.

BEINERT, H.; HOLM, R. H.; MÜNCK, E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. **Science**, v. 277, p. 653-659, 1997.

BELLER, H. R.; CHAIN, P. S.; LETAIN, T. E.; CHAKICHERLA, A.; LARIMER, F. W.; RICHARDSON, P. M.; COLEMAR, M.; WOOD, A. P.; KELLY, D. P. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 473-1488, 2006.

BENJAMIN, E.; AUSSEL, L.; BARRAS, F. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1703, p. 221-229, 2005.

BHAYA, D.; BIANCO, N. R.; BRYANT, D.; GROSSMAN, A. Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 941-951, 2000.

BLAKE II, R. C.; SASAKI, K.; OHMURA, N. Does aporusticyanin mediate the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite? **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 357-372, 2001.

BOSCHI-MULLER, S.; AZZA, S.; BRANLAT, G. *E. coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. **Protein Science**, v. 10, p. 2272-2279, 2001.

BOSECKER, K. Bioleaching metal solubilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p. 591-604, 1997.

BOTUYAN, M. V.; TOY-PALMER, A.; CHENG, J.; II-BLAKE, R. C.; BEROZA, P.; CASE, D. A.; DYSON, H. J. NMR solution structure of Cu(I) rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: structural basis for the extreme acid stability and redox potential. **Journal of Molecular Biology**, v. 263, p. 752-767, 1996.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Letters**, v. 46, p. 165-173, 1987.

CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. **Biological spectroscopy**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1984.

CASPERSEN, M. B.; BENNET, K.; CHRISTENSEN, H. E. Expression and characterization of recombinant *Rhodocyclus tenuis* high potential iron-sulfur protein. **Protein Expression and Purification**, v. 19, p. 259-264, 2000.

CLAUSEN, M.; KOOMEY, M.; MAIER, B. Dynamics of type IV pili is controlled by switching between multiple states. **Biophysical Journal**, v. 96, p. 1169-1177, 2009.

COHEN-KRAUSZ, S.; TRACHTENBERG, S. The flagellar filament structure of the extreme Acidothermophile *Sulfolobus shibatae* B12 suggests that Archaeobacterial flagella have a unique and common symmetry and design. **Journal of Molecular Biology**, v. 375, p. 1113-1124, 2008.

CORRÊA, H. A.; RAMOS, H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **AJBR**, v. 2, p. 1-10, 2008.

CHEN, G.; WALKER, S. L. Role of solution chemistry and ion valence on the adhesion kinetics of groundwater and marine bacteria. **Langmuir**, v. 23, p. 7162-7169, 2007.

CRAIG, L.; PIQUE, M. E.; TAINER, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Microbiology**, v. 2, p. 363-378, 2004.

CRAIG, L.; LI, J. Type IV pili: paradoxes in form and function. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, p. 267-277, 2008.

DEPPENMEIER, U.; BLAUT, M.; GOTTSCHALK, G. H<sub>2</sub>:heterodisulfide oxidoreductase, a second energy-conserving system in the methanogenic strain Gö1. **Archives in Microbiology**, v. 155, p. 272-277, 1991.

DEPPENMEIER, U.; MULLER, V.; GOTTSCHALK, G. Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. **Archives in Microbiology**, v. 165, p. 149-163, 1996.

DEVASIA, P.; NATARAJAN, K. A.; SATHYANARAYANA, D. N.; RAMANANDA, R. G. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. **Applied and Environment Microbiology**, v. 59, p. 4051-4055, 1993.

DEVECI, H. Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 385-396, 2004.

EDWARDS, K. J.; SCHRENK, M. O.; HAMERS, R. J.; BANFIELD, J. F. Microbial oxidation of pyrite: experiments using microorganisms from an extreme acidic environment. **American Mineralogy**, v. 83, p. 1444-1453, 1998.

EHRENREICH, A.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. **Applied and Environment Microbiology**, v. 60, p. 4517-4526, 1994.

ESCOBAR, B.; HUERTA, G.; RUBIO, J. Short communication: influence of LPS on the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to minerals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 593-594, 1997.

FARAH, C.; VERA, M.; MORIN, D.; HARAS, D.; JEREZ, C. A.; GUILIANI, N. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 71, p. 7033-7040, 2005.

FRIEDRICH, A.; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. **Applied and Environment Microbiology**, v. 62, p. 2875-2882, 1996.

GARCÍA, A.; JEREZ, C. A. Changes of the solid-adhered populations of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* in leaching ores as determined by immunological analysis. In: JEREZ, C. A.; VARGAS, T.; TOLEDO, H.; WIERTZ, J. V. (Ed.). **Biohydrometallurgical processing**. Santiago de Chile: Ed. University of Chile, 1995. Cap. 1, p. 19-30.

GARCIA JUNIOR, O.; URENHA, L. C. Lixiviação bacteriana de minérios. In: LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, cap. 22, p. 485-512.  
GEHRKE, T.; HALLMANN, R.; KINZLER, K.; SAND, W. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* – a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. **Water Science Technology**, v. 43, p. 159-167, 2001.

GEORGAKOPOULOU, S.; MOLLER, D.; SACHS, N.; HERRMANN, H.; AEBI, U. Near-UV circular dichroism reveals structural transitions of vimetin subunits during intermediate filament assembly. **Journal of Molecular Biology**, v. 386, p. 544-553, 2009.

GHAURI, M. A.; OKIBE, N.; JOHNSON, D. B. Attachment of acidophilic bacteria to solid surface: the significance of species and strain variations. **Hydrometallurgy**, v. 85, p. 72-80, 2007.

GOMES, C. M.; FARIA, A.; CARITA, J. C.; MENDES, J.; REGALLA, M.; CHICAU, P.; HUBER, H.; STETTER, K. O.; TEIXEIRA, M. Di-cluster, seven-iron ferredoxins from hyperthermophilic *Sulfolobales*. **JBIC**, v. 3, p. 499-507, 1998.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2527-2532, 2006.

HACKL, R. R.; DREISINGER, E.; PETERS, E.; KING, J. A. Passivation of chalcopyrite during oxidative leaching in sulfate media. **Hydrometallurgy**, v. 39, p. 25-48, 1995.

HANNA, S. L.; SHERMAN, N. E.; KINTER, M. T.; GOLDBERG, J. B. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microbiology**, v. 146, p. 2495-2508, 2000.

HEDDERICH, R.; KLIMMEK, O.; KRÖGER, A.; DIRMEIER, R.; KELLER, M.; STETTER, K. O. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 353-381, 1999.

HERMANSSON, M. The DLVO theory in microbial adhesion. **Colloids and Surfaces B**, v. 14, p. 105-119, 1999.

HOLM, N. C.; GLIESCHE, C. G.; HIRSCH, P. Diversity and structure of *Hyphomicrobium* populations in a sewage treatment plant and its adjacent receiving lake. **Applied and Environment Microbiology**, v. 62, p. 522-528, 1996.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 409-418, 2002.

HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M. F.; GUIMARÃES, C. T.; JARDIM, S. N.; GOMES, E. A.; VASCONCELOS, A. T. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetic Molecular Research**, v. 31, p. 102-106, 2004.

- HUTCHINS, S. R.; DAVIDSON, M. S.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Microorganisms in reclamation of metals. **Annual Review Microbiology**, 40, p. 311-336, 1986.
- IDE, T.; BÄUMER, S.; DEPPENMEIER, U. Energy conservation by the H<sub>2</sub>: heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Go<sup>1</sup>: identification of two proton-translocating segments. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 4076-4080, 1999.
- JEREZ, C. A. The use of genomics, proteomics and others OMICS technologies for the global understanding of biomining microorganisms. **Hydrometallurgy**, v. 94, p. 162-169, 2008.
- JOHSON, D. C.; DEAN, D. R.; SMITH, A. D.; JOHSON, M. K. Structure, function and formation of biological iron-sulfur clusters. **Annual Review Biochemistry**, v. 74, p. 247-281, 2005.
- JORGENSEN, S.; VORGIAS, C. E.; ANTRANIKIAN, G. Cloning, sequencing and expression of a extracellular  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p.16335-16342, 1997.
- JUCKER, B. A.; HARMS, H.; ZEHNDER, J. B. Polymer interactions between five gram-negative bacteria and glass investigated using LPS micelles and vesicles as model systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 11, p. 33-45, 1998.
- KAISER, D. Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. **Current Opinion in Biology**, v. 17, p. 561-570, 2007.
- KILLEY, P. J.; BEINERT, H. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 181-185, 2003.
- KUIPERS, B. J.; GRUPPEN, H. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5445-5451, 2007.
- KUZNAR, Z. A.; ELIMELECH, M. Adhesion kinetics of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts to quartz surfaces. **Environmental Science and Technology**, v. 38, p. 6839-6845, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York.. Plenum Press, 1999. 698 p.



LEAL, S. S.; GOMES, M. On the relative contribution of ionic interactions over iron-sulfur clusters to ferredoxin stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 1596-1600, 2008.

LEITE, B.; ISHIDA, M. L.; ALVES, E.; CARRER, H.; PASCHOLATIS, S. F.; KITAJIMA, E. W. Genomics and X-Ray microanalysis indicate  $\text{Ca}^{2+}$  and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 645-650, 2002.

LEUSCHNER, C.; ANTRANIKIAN, G. Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 95-114, 1995.

LOVLEY, D. R.; PHILLIPS, E. J. P.; LONERGAN, D. J.; WIDMAN, P. K. Fe (III) and  $\text{S}^0$  reduction by *Pelobacter carbinolicus*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 61, p. 2132-2138, 1995.

LU, H. M.; MOTLEY, S. T.; LORY, S. Interactions of the components of the general secretion pathway: role of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin subunit in complex formation and extracellular protein secretion. **Molecular Microbiology**, v. 25, p. 247-259, 1997.

MANDER, G. J.; PIERIK, A. J.; HUBER, H.; HEDDERICH, R. Two distinct heterodisulfide reductase-like enzymes in the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus profundus*. **European Journal Biochemistry**, v. 271, p. 1106-1116, 2004.

McBRIDE, M. J. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement. **Annual Review Microbiology**, v. 55, p. 9-75, 2001.

MÁRQUEZ, M. G.; GASPARGAS, J.; BESSLER, K.; MAGELA, G. Process mineralogy of bacterial oxidized gold ore in Sao Bento mine (Brasil). **Hydrometallurgy**, v. 83, p. 114 - 123, 2006.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 289-314, 2002.

MOCZYGEMBA, C.; GUIDRY, J.; JONES, K. L.; GOMES, C. M.; TEIXEIRA, M.; WITTUNG-STAFSHEDE, P. High stability of a ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *A. ambivalens*: involvement of electrostatic interactions and cofactors. **Protein Science**, v. 10, p. 1539-1548, 2001.

NDLOVU, S.; MONHEMIUS, A. J. The influence of crystal orientation on the bacterial dissolution of pyrite. **Hydrometallurgy**, v. 78, p. 187-197, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Leningher princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 11-729, 1999.

NIES, D. H. Heavy metal resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia spec. CH34*. **Extremophiles**, v. 4, p. 77-82, 2000.

NOUAILLER, M.; BRUSCELLA, P.; LOJOU, E.; LEBRUN, R.; BONNEFOY, V.; GUERLESQUIN, F. Structural analysis of the HiPIP from the acidophilic bacteria: *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Extremophiles**, v. 10, p. 191-198, 2006.

NOVAGEN, **pET System Manual**, 11<sup>th</sup> Edition, EMD Bioscience, 2005.

OKABAYASHI, A.; WAKAI, S.; KANAO, T.; SUGIO, T.; KAMIMURA, K. Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. **Journal Bioscience Bioengineering**, v. 6, p. 644-652, 2005.

PAULINO, L. C.; MELLO, M. P.; OTTOBONI, L. M. M. Diferencial gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Electrophoresis**, v. 23, p. 520-527, 2002.

POGLIANI, C.; DONATI, E. The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 88-92, 1999.

RABUS, R.; KUBE, M.; HEIDER, J.; BECK, A.; HEITMANN, K.; WIDDEL, F.; REINHARDT, R. The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. **Archives of Microbiology**, v. 183, p. 27-36, 2005.

REYSENBACH, A. L.; HAMAMURA, N.; PODAR, M.; GRIFFITHS, E.; FERREIRA, S.; HOCHSTEIN, R.; HEIDELBERG, J.; JOHNSON, J.; MEAD, D. Complete and draft genome sequences of six members of the *Aquificales*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 1992-1993, 2009.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; TRIBUTSCH, H. Biochemistry of sulfur extraction in bio-corrosion of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 291-300, 2001.

ROHWERDER, T.; GEHRKE, T.; KINZLER, K.; SAND, W. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 239-248, 2003.

ROSSI, G. The design of bioreactors. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 217-231, 2001.

ROST, B.; YACHDAV, G.; LIU, J. The predict protein server. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 321-326, 2004.

RUDIGER, A.; JORGENSEN, P. L.; ANTRANIKIAN, G. Isolation and characterization of a heat stable pullulanase from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 61, p. 567-575, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAND, W.; GEHRKE, T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processing involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 49-56, 2006.

SCHÄFER, K.; MAGNUSSON, U.; SCHEFFEL, F.; SCHIEFNER, A.; SANDGREN, M. O.; DIEDERICHS, K.; WELTE, W.; HÜLSMANN, A.; SCHNEIDER, E.; MOWBRAY, S. L. X-ray structures of the maltose-maltodextrin-binding protein of the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* provide insight into acid stability of proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, p. 261-274, 2004.

SCHIPPERS, A.; SAND, W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 319-321, 1999.

SCHNEIKER, S.; MARTINS, S. V.; BARTELS, D.; BEKEL, T.; BRECHT, M.; BUHRMESTER, J.; CHERMIKOVA, T. M.; DENNARO, R.; FERRER, M.; GERTLER, C.; GOESMANNA, A.; GOLYSHINA, O. V.; KAMINSKI, F.; KHACHANE, A. N.; LANG, S.; LINKE, B.; McHARDY, A. C.; MEYER, F.; NECHITAYLO, T.; PUEHLER, A.; REGENHART, D.; RUPP, O.; SABIROVA, J. S.; SELBITSCHKA, W.; YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; VORHDELTER, F. J.; WEIDIVER, S.; KAISER, O.; GOLYSHIN, P. N. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 997-104, 2006.

SIMIANU, M.; MURAKAMI, E.; BREWER, J. M.; RAGSDALE, S. W. Purification and properties of the heme- and iron-sulfur- containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. **Biochemistry**, v. 37, p. 10027-10039, 1998.

SINGH, V. K.; MOSKOVITZ, J. Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. **Microbiology**, v. 149, p. 2739-2747, 2003.

SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in protein using circular dichroism spectroscopy **Protein Science**, v. 8, p. 370-380, 1999.

THIRD, K. A.; CORD-RUWISCH, R.; WATLING, H. R. The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 55, p. 225-233, 2000.

- TOMICH, M.; PLANET, P. J.; FIGURSKI, D. H. The tad locus: postcards from the widespread colonization island. **Nature**, v. 5, p. 363-375, 2007.
- TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. **Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie**, v. 12, p. 311-346, 1972.
- TUOVINEN, O. H.; BHATTI, T. M.; BIGHAM, J. M.; HALLBERG, K. B.; GARCIA JUNIOR, O.; LINDSTROM, E. B. Oxidative dissolution of arsenopyrite by mesophilic and moderately thermophilic acidophiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3268-3274, 1994.
- VALDÉS, J.; PEDROSO, I.; QUATRINI, R.; DODSON, R. J.; TETTELIN, H.; BLAKE, R.; EISEN, J. A.; HOLMES, D. S. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. **BMC Genomics**, v. 9, p. 597, 2008. doi: 10.1186/1471-2164-9-597.
- VOGEL, A. Titulaciones de oxidación con dicromato de potasio. In:\_\_\_\_\_. **Química analítica cuantitativa**.4. ed. Buenos Aires: Kapelusz, 1960. p. 412-419.
- WAGNER, V. E.; BUSHNELL, D.; PASSADOR, L.; BROOKS, A. I.; IGLEWSKI, B. H. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2080-2095, 2003.
- WALTER, R. L.; EALICK, S. E.; FRIEDMAN, A. M.; II-BLAKE, R. C.; PROCTOR, P.; SHOHAM, M. Multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) crystal structure of rusticyanin: a highly oxidizing cupredoxin with extreme acid stability. **Journal of Molecular Biology**, v. 263, p. 730-751, 1996.
- WATLING, H. R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review. **Hydrometallurgy**, v. 84, p. 81-108, 2006.
- YARZÁBAL, A.; BRASSEUR, G.; RATOUCHEK, J.; LUND, K.; LEMESLE-MEUNIER, D.; DEMOSS, J. A.; BONNEFOY, V. The high-molecular-weight cytochrome c Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 313-317, 2002.
- YASUHIRO, O.; STAR, B.; HUISMAN, L. A.; GOTTSCHAL, J. C.; FORNEY, L. J. Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodospseudomonas*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5186-5191, 2003.
- ZENG, J.; HUANG, X.; LIU, Y.; LIU, J.; QIU, G. Expression, purification and characterization of a [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] cluster containing ferredoxin from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Current Microbiology**, v. 55, p. 518-523, 2007.

ZENG, J.; GENG, M.; LIU, Y.; ZHAO, W.; XIA, L.; LIU, J.; QIU, G. Expression, purification and molecular modelling of the Iro protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans* Fe-1. **Protein Expression and Purification**, v. 52, p. 146-152, 2007.

ZITA, A.; HERMANSSON, M. Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater *in situ*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p. 299-306, 1997.

## ANEXO

Elsevier Editorial System™ for Process Biochemistry  
Manuscript Draft  
Manuscript Number: PRBI-D-10-00185

### **Expression, purification and spectroscopic analysis of a new iron-sulfur cluster-binding protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans***

**D. M. H. Ossa<sup>1</sup>, R. R. Oliveira<sup>2</sup>, M. T. Murakami<sup>2</sup>, F. Alexandrino<sup>3</sup>, L. M. M. Ottoboni<sup>3</sup>, O. Garcia Jr<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>D. M. H. Ossa, O. Garcia Jr

Laboratório de Biohidrometalurgia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Rua Francisco Degni s/n, Bairro quitandinha, 14800- 900 Araraquara, S. P., Brasil

<sup>2</sup>R. R. Oliveira, M. T. Murakami

Laboratório Nacional de Biociências e Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, 13084-971 Campinas, S. P., Brasil

<sup>3</sup>F. Alexandrino, L. M. M. Ottoboni

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 13083-875 Campinas, S. P., Brasil

\*Corresponding author.

E-mail: [oswaldo@iq.unesp.br](mailto:oswaldo@iq.unesp.br) (Oswaldo Garcia Jr)

[ossaster@gmail.com](mailto:ossaster@gmail.com) (Diana Marcela Ossa)

Tel.: + 55 (16) 3301 6677

## Abstract

Iron-sulfur cluster-binding proteins are present in all living organisms and have been considered to be very ancient due to their ubiquity in the three domains of life and to their importance in anaerobic metabolic pathways. To date, there is very little information regarding this protein family in *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a bacterium involved in the bioleaching process. In this study, we describe the cloning, expression, purification and spectroscopic characterization of a new Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* strain LR. The oligomeric state of the protein was assessed by both dynamic light scattering and size-exclusion chromatography demonstrating that it is present as a monomer in solution. Far-UV CD measurements revealed that this protein is extremely stable at acidic pHs and at the lower pHs, it becomes more structured exhibiting a predominance of  $\alpha$ -helical secondary structure. In contrast, at basic pHs, from 9 to 12, the protein showed a spectral profile characteristic for proteins with high content of beta structure and random coil. Thermal unfolding studies demonstrated a high temperature tolerance of this protein at acidic conditions, with a melting temperature of 95°C. Furthermore, a bioinformatic analyses suggested a heterodisulfide reductase function for the analyzed protein, which could be related to hydrogen and/or formate metabolism in *A. ferrooxidans*.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Fe-S cluster-binding protein, stability, thermal unfolding studies.

## 1. Introduction

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is one of the most studied extremely acidophilic microorganism that was initially isolated from coal-mine waters. This bacterium metabolizes iron- and sulfur-containing minerals to gain energy for growth [1]. Furthermore, the metabolic machinery of *A. ferrooxidans* also includes anaerobic processes such as sulfur reduction, hydrogen [2, 3, 4] and formate metabolism and nitrogen fixation [5]. *A. ferrooxidans* is of great industrial importance since it is used in the recovery of metals such as copper, uranium, gold and zinc from mining wastes and low-grade mineral resources [6], in the purification of gases containing sulfur compounds [7] and in the treatment of acid mine drainage [8].

The genome of the type strain, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, was sequenced and annotated by TIGR (The Institute for Genomic Research), providing a framework for *in silico* metabolic reconstruction that offers a valuable platform for gene discovery and functional prediction, helping to elucidate novel metabolic pathways and to explain their role in acidic environments [5].

Iron-sulfur proteins are present in all living organisms and have a remarkable structural versatility which forms the basis for their various functions: electron transfer, oxidation-reduction reactions, catalysis, sulfur and iron donors, substrate recognition, sensors of iron and oxygen and regulatory functions [9, 10]. Regarding to the Fe-S cluster-binding protein family found in *A. ferrooxidans*, there is very little information available. Recently, it has been proposed that the Iro protein participates in iron respiratory electron transport [11]. Nouailler *et al.* [12] and Zheng [13] have studied the participation of high potential iron-sulfur protein (HiPIP) in electrons transfer from bc1 complex to the terminal oxidase. Hiudan *et al.* [14] investigated the involvement of IscA in the iron-sulfur cluster assembly encoded by the *iscSUA* operon and Zheng *et al.* [15] have addressed a key role for adenosine 5'-phosphosulfate reductase in the metabolic pathway for sulfate reduction and sulfide oxidation in the biological sulfur cycle.

In this work, we have cloned, overexpressed, purified and biophysically characterized a new iron-sulfur cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* strain LR.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Fe-S cluster-binding protein gene cloning and sequencing

The *A. ferrooxidans* strain LR used in this work was isolated from an effluent of column leaching of uranium ore from Lagoa Real, State of Bahia, Brazil [16] and was identified as *A. ferrooxidans* [17, 18]. The gene that encodes the Fe-S cluster-binding protein was amplified by PCR from *A. ferrooxidans* LR purified genomic DNA by using the primers 5'-ccggCATATGGCTATTCATGAA-3' (forward primer) and 5'-aatAAGCTTTTAGCCATGATGCGC-3' (reverse primer). These primers were designed, by using the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 gene on locus AFE\_0551 as a template, to generate products with cohesive overhangs (underlined) for efficient cloning onto the expression vector.

The PCR product was cloned into the pET28a vector (Promega), this vector is designed for the heterologous protein expression in *E. coli* producing a protein with a tag of six histidines at the amino terminus to facilitate the purification of the protein, resulting in the plasmid pET28a-R. The plasmid DNA was isolated with the Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), according to the manufacturer instructions. The gene was digested out from the plasmid with the restriction endonucleases *NdeI* and *HindIII*. *E. coli* DH5 $\alpha$  was used for the propagation of the recombinant plasmid. *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the plasmid pET28a-R and used for protein expression. The correct sequence of the gene cloned into the vector was verified by DNA sequencing. The gene was sequenced (ABI-Prism 3700, Applied Biosystems) and the predicted protein sequence was submitted to multiple alignments comparison in protein databases by using the NCBI Entrez protein sequence research, Clustal W, ExPASy Proteomic and the PROSITE motif search for identification of functional regions.

### 2.2. Expression

*E. coli* BL21 (DE3) cells containing the recombinant pET28a-R plasmid (10 mL) were grown at 37°C in 1 L of LB medium containing kanamycin (100 mg/L) until the OD<sub>600</sub> reached 0.8. A concentration of 0.8 mM of IPTG and of ferrous sulfate were added and growth continued at room temperature for 22 h, approximately. The cells were harvested by centrifugation at 6000 g, 4°C for 10 min. The Fe-S cluster-binding protein was expressed in inclusion corps in all

conditions tested at the different temperatures. The protein extraction of the inclusion corps was performed in three steps: (1) the cell pellet was suspended in lysis buffer 1 (50 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA and 25% sucrose, pH 8.0), sonicated for 2 min and centrifuged. (2) the cell pellet obtained in (1) was suspended in lysis buffer 2 (50 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 100 mM NaCl and 5 mg lysozyme, pH 8.0) and (3) the extraction of the recombinant protein was carried out in the presence of 8 M urea.

### 2.3. Protein purification

The obtained protein was incubated in a Hi-Trap chelating column loaded with Ni<sup>2+</sup>, as the affinity metal equilibrated, with buffer (50 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole and 8 M urea). The protein was eluted with an elution buffer (50 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 100 mM NaCl, 500 mM imidazole and 8 M urea, pH 8.0) and the eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE. As shown in Fig. 1, the obtained protein purity was > 95%. The purified protein fractions were folding by successive dialysis against buffer (20 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 100 mM NaCl, 2 mM Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine Hydrochloride TCEP, pH 8.0) with a decreased gradient of urea, from 6 M to 0 M. The protein concentration was determined by using the absorption at 280 nm and the theoretical extinction coefficient calculated on the basis of the protein amino acid composition [19].

### 2.4. Dynamic Light Scattering

After protein purification and folding steps, a gel filtration chromatography Superdex 26/60 prep grade 200 was realized. The monodispersivity of the sample was analyzed by dynamic light scattering using a DynaPro equipment for Protein Solutions. The protein concentration was 2 mg/mL in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl at 25°C. The hydrodynamic parameters were obtained by the equipment software.

### 2.5. Protein identification

The protein bands were excised and an in-gel trypsin digestion was performed according to Hanna *et al.* [20]. A sample (4.5 µL) of the peptide mixture was separated by C18 (100 µm x 100 mm) RP-UPLC (nanoAcquity UPLC, Waters) coupled with a nano-electrospray tandem mass spectrometry on a Q-ToF Ultima API mass spectrometer (MicroMass/Waters) at a flow rate

of 600 nL/min. The gradient was 0-80% acetonitrile in 0.1% formic acid over 45 min. The instrument was operated in the 'top three' mode, in which one MS spectrum is acquired followed by MS/MS of the top three most-intense peaks detected. The resulting spectra were processed using Mascot Distiller 2.2.1.0, 2008, Matrix Science (MassLynx V4.1) and searched against the human non-redundant protein database (NCBI) using Mascot, with carbamidomethylation as fixed modification, oxidation of methionine as variable modifications, one trypsin missed cleavage and a tolerance of 0.1 Da for both precursor and fragment ions.

### *2.6. UV-visible scanning*

UV-visible spectrum scanning was carried out at 25°C on a Tecan Infinite M 200 spectrophotometer. Samples of the reduced and the oxidized protein (15 µM) were prepared in 10 mM Tris-HCl buffer containing 100 mM NaCl, pH 8.0. The oxidized protein was obtained by incubation with 5 mM ammonium persulfate for 30 min.

### *2.7. CD spectroscopy analysis*

The CD spectra were recorded in a Jasco J-810 spectropolarimeter equipped with a Peltier temperature control. The conformational changes in the secondary structure of the protein in a pH range from 1 to 12 were analyzed using Far-UV-CD measurements. The protein samples (typically 8.6 µM) were incubated for 24 h, 4°C at different pH values (the pH was adjusted by HCl or NaOH addition). Far-UV-CD measurements were obtained by monitoring the mean residue ellipticity between 195 and 260 nm and recorded using 1 mm path length polarimetrically certified cells (Hellma). Molar ellipticity was calculated according to Corrêa and Ramos [21].

Analysis of the secondary structure content of the protein, estimated from the Far-UV spectrum at different pHs, was complemented using the CDNN and PHD program predictions.

### *2.8. Thermal unfolding analysis*

Far-UV-CD temperature scans of protein samples at different pH values (from 1 to 12) were recorded on a Jasco J-810 spectropolarimeter at temperatures ranging from 10 to 110°C, with a heating rate of 1°C/min. The protein concentration used for Far-UV CD was 8.6 µM, using a cell with path length of 1 mm. Temperature scans were recorded using a step resolution of 0.5°C and a response time of 8 s. Detection wavelengths were at 208 nm or at 222 nm, depending

on which wavelength was the most sensitive to temperature. The apparent midpoint transition temperature ( $T_m$ ) at each pH was determined by direct analysis of the spectroscopy signal vs. temperature and curve fitting to a sigmoid transition.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Sequence analysis

A BLAST analysis indicated that proteins sharing sequence identity above 30% with the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR, display a highly conserved motif related to a heterodisulfide reductase function [22]. The cysteine residues required for Fe-S cluster-binding are fully conserved (Fig. 2). Moreover, several hydrophobic and polar residues are also conserved and possibly involved in protein stability.

Best alignment results (Table 1) were obtained with ortholog genes from several microorganisms, that share either the same energetic substrate or the extreme environment. That is, *Acidithiobacillus caldus* and *Sulfolobus solfataricus* that have been found in similar acidophilic environments [23, 24]. Thermophilic microorganisms from the order *Aquificales*, which can oxidize hydrogen and sulfur, such as the thermoacidophilic species *Hydrogenobaculum* [25]. *Rhodobacter* that is a ferrous iron-oxidizer and can use  $H_2$  and  $CO_2$ , acetate and pyruvate as substrates for growth [26]. *Thioalkalivibrio* that is extremely tolerant to salt and uses reduced sulfur compounds (thiosulfate, sulfide, elemental sulfur and tetrathionate) as energy sources [27]. *Hyphomicrobium* that utilizes methanol, methylamine and formate for growth and furthermore, is very efficient in denitrification and methanogenesis [28].

Apparently, the protein from the species that showed a best alignment, share the same heterodisulfide reductase function (Table 1), although this function has not been described for these organisms until now. Moreover, there is neither functional nor structural data available for this protein. However, the enzymatic characterization and metabolic pathways involving  $H_2$ ,  $CO_2$ , formate, methanol and acetate have been studied in methanogenic microorganisms [29, 30].

The heterodisulfide reductase (HDR) enzyme has been studied in methanoarchaea microorganisms under cell growth in  $H_2/CO_2$ -rich environments. In such conditions, the HDR reaction is involved in the generation of an electrochemical ion gradient that is essential for energy conservation by methanogens [29]. The proton translocation is coupled to electron

transport pathways and ATP synthesis involving the HDR-catalyzed heterodisulfide. This reaction was demonstrated when the electron donor was H<sub>2</sub> [31] or CO<sub>2</sub> [32].

In acidophilic microorganisms, the  $\Delta$ pH across the cytoplasmic membrane is intrinsically linked to cellular bioenergetics because it is the major contributor to the proton-motive force (PMF). The PMF is a measurement of the energized state of the cell membrane as a result of a charge separation between the cytoplasm and the external milieu created by the membrane potential and pH gradient across the membrane [33]. If molecular hydrogen is present, then the membrane-bound F420-nonreducing hydrogenase forms channels by transferring electrons via the *b*-type cytochromes to the heterodisulfide reductase which reduces the terminal electron acceptor. This electron transport system, referred to as H<sub>2</sub>: heterodisulfide oxidoreductase, is coupled to proton translocation across the cytoplasmic membrane. These reactions coupled to proton translocation resulted in electrochemical proton gradient, which is used for ATP synthesis [34]. According to Valdés *et al.* [5] and Brasseur *et al.* [35], the reverse electron flow for the production of NADH via the oxidation of Fe(II) in *A. ferrooxidans*, is driven by the proton motif force (PMF) across the membrane that results from the acidic environment. *A. ferrooxidans* can exploit the natural PMF to generate reducing power and couple it to redox reactions. Although this electron transport system has not been fully described for *A. ferrooxidans*, it could occur in acidophilic microorganisms.

### 3.2. Expression and purification

The best protein expression levels were obtained under induction with 0.8 mM IPTG at 25°C overnight, however the recombinant protein was found in an inclusion body form (Fig. 1). The presence of iron in the culture media did not affect the solubility and expression levels of the protein. The fraction containing the protein displayed a green-brown color which indicates the presence of [4Fe-4S] clusters even after the purification steps. A MS analysis of the recombinant protein indicated a molecular weight around 29 kDa which is agreement with the full-length protein in fusion with the N-terminal 6x His tag (Table 2). The protein identification was carried out by LC-MS/MS and indicated total sequence coverage to the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Dynamic light scattering experiments indicated a monomeric state in solution for the recombinant protein featuring a hydrodynamic radius of 2.8 nm as

observed for other family members. The sample resulted in a very low polydispersity of 11% indicating its suitability for structural and biophysical characterization.

### 3.3. UV-visible scanning

The UV-visible spectra of the oxidized and reduced recombinant Fe-S cluster-binding protein are shown in Fig. 3. According to several authors [11, 36, 37], the spectra were similar to those previously reported for other iron-sulfur cluster-binding proteins that were characterized by maximum absorption peaks between 300 to 500 nm, approximately. In this region, the oxidized protein exhibited an increase in the absorbance compared to the reduced protein.

### 3.4. CD spectroscopy analysis

Protein conformational changes induced by altering the net charge through pH titrations were monitored using far-UV CD. Prediction of the secondary structure contents at different pHs were calculated using the CDNN and PHD algorithms (Figs. 4 and 5). Notably, the protein displayed a gain of secondary structure at lower pHs indicating that the protein becomes more structured in acidic conditions. The spectral profile presented two relative minimums at 208 nm and 222 nm, and a relative maximum at 195 nm which is typically observed for  $\alpha$ -helical proteins (Fig. 6). However, at basic pH values the protein gradually lost the  $\alpha$ -helical structure characterized by a turn down of the minimum peaks at 208 and 222 nm and the spectra deconvolution indicated an increase of  $\beta$ -sheet and random coil combinations (Fig. 7). The protein was not analyzed at pH 6-7 due to the proximity of its isoelectric point (6.3), which can cause its precipitation.

The sequence analysis also corroborated with the spectroscopic results, since the analyzed protein contains several residues that confer stability to its structure at acidic pHs, such as the conserved aromatic and polar residues G, W, V (Fig. 2) that may protect the Fe-S cluster from solvent by forming H-bonds in the backbone and side chains and by making electrostatic interactions with the cluster [12]. In addition, the protein contains nine prolines that probably play an important role in the stabilization of protein folding at acidic pHs [12, 38, 39]. Other study has concluded that the proline residues could be involved in the thermostability of proteins [40].

These results revealed that alkalization was more destabilizing than acidification and it is in accordance to the fact that periplasmic acid-stable proteins with very high redox potentials are essential for the bioenergetic metabolism of *A. ferrooxidans* [12]. Moreover, its putative Hdr function in methanogenic microorganisms was also observed in the periplasm supporting our results [41].

### 3.4. Effect of pH on thermal denaturation

The recombinant protein showed a highly thermo stability at acidic pHs, ranging from 1 to 4, with a melting temperature of 95°C (Fig. 8). At pH 5.0, the stability drastically decreased with a  $\Delta T_m$  of 40°C and surprisingly, at pHs higher than 10 its  $T_m$  presented an average of 77°C. Probably, this anomalous behavior is due to the additive effects of several factors, such as an increasing number of hydrogen bonds at the acidic pHs and new electrostatic interactions of van der Waals contacts [36]. Despite the unfolding to be irreversible, no precipitates were observed. A similar thermal denaturation behavior has been reported for ferredoxins from various hyperthermophilic microorganisms [36, 42, 43] and their unfolding paths usually involves the formation of transient states in which the polypeptide suffers conformational rearrangements to keep contacts with the iron clusters.

## 4. Conclusions

The Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR was overexpressed and purified. A spectroscopic analysis indicated that the protein becomes more structured in acidic pHs, with a predominance of  $\alpha$ -helical structure. Thermal unfolding studies indicated a high thermal resistance and stability in acidic pHs with a  $T_m$  around 95°C. In basic pHs, large structural rearrangements were observed and the protein stability decreased with additions of  $\beta$ -sheet and coil random combinations. These results are in full agreement to secondary structure predictions. Moreover, a bioinformatics analysis predicted a heterodisulfide reductase function for the protein that has not been described yet in the genus *Acidithiobacillus*.

## Acknowledgements

Support for this work was received from Company Vale. DMHO received a fellowship from Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). LMMO and OGJr received research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

- [1] Johnson DB. Extremophiles: acidic environments. Encyclopedia of Microbiology, (Moselio Schaechter. Editor, Elsevier (2009) 107-126.
- [2] Drobner E, Huber H, Stetter KO. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. Appl Environ Microbiol 1990; 56: 2922-2923.
- [3] Ohmura N, Sasaki K, Matsumoto N, Saiki H. Anaerobic respiration using  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{S}^0$ , and  $\text{H}_2$  in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology 2002; 184: 2081-2087.
- [4] Kai T, Nagano T, Fukumoto T, Nakajima M, Takahashi T. Autotrophic growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by oxidation of molecular hydrogen using a gas-liquid contactor. Bioresource Technology 2007; 98: 460-464.
- [5] Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, II Blake R, Eisen JÁ, Holmes DS. *Acidithiobacillus ferrooxidans* Metabolism: From Genome Sequence to Industrial Applications. BMC Genomics 2008; 9: 597-621.
- [6] Deng TL, Liao MX, Wang MH, Chen Y-W, Belzile N. Investigations of accelerating parameters for the biooxidation of low-grade refractory gold ores. Minerals Eng 2000; 13: 1543-1553.



- [7] Jensen AB, Webb C. Treatment of H<sub>2</sub>S-containing gases: a review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbial Technol* 1995; 17: 2-10.
- [8] Umita T. Biological mine drainage treatment. *Resources Conservation and Recycling* 1996; 16: 179-188.
- [9] Beinert H, Holm RH, Münck E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 1997; 277: 653-659.
- [10] Caspersen MB, Bennett K, Christensen HE. Expression and characterization of recombinant *Rhodocyclus tenuis* high potential iron-sulfur protein. *Protein Expression and Purification* 2000; 19: 259-264.
- [11] Zeng J, Geng M, Liu Y, Zhao W, Xia L, Liu J, Qiu G. Expression, purification and molecular modelling of the Iro protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans* Fe-1. *Protein Expression and Purification* 2007; 52: 146-152.
- [12] Nouailler M, Bruscella P, Lojou E, Lebrun R, Bonnefoy V, Guerlesquin F. Structural analysis of the HiPIP from the acidophilic bacteria: *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Extremophiles* 2006; 10: 191-198.
- [13] Zeng J, Jiang H, Geng M, Wang Y, Zhang X, Liu J, Qiu G. In vitro assembly of [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] cluster in high potential iron-sulfur protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr Microbiol* 2008; 57: 161-166.
- [14] Huidan J, Zhang X, Ai C, Liu Y, Liu J, Qiu G, Zeng J. Asp97 is a crucial residue involved in the ligation of the [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] cluster of IscA from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18: 1070-1075.

- [15] Zheng C, Zhang Y, Liu Y, Wu A, Xia L, Zeng J, Liu J, Qiu G. Characterization and reconstitute of a [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] adenosine 5'-phosphosulfate reductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr Microbiol* 2009; 58: 586-592.
- [16] Garcia OJ. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Revista de Microbiologia* 1991; 20: 1-6.
- [17] Paulino LC, Bergamo RF, Mello MP, Garcia OJ, Manfio GP, Ottoboni LMM. Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolates from mine wastes in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek* 2001; 80: 65-75.
- [18] Bergamo RF, Novo MTM, Verissimo RV, Luciana LC, Stoppe NC, Sato MIZ, Manfio GP, Prado PI, Garcia OJ, Ottoboni LMM. Differentiation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains based on 16S-23S rDNA spacer polymorphism analysis. *Research in Microbiology* 2004; 155: 559-567.
- [19] Kuipers BJ, Gruppen H. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 5445-5451.
- [20] Hanna SL, Sherman NE, Kinter MT, Goldberg JB. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* 2000; 146: 2495-2508.
- [21] Corrêa DHA, Ramos CHI. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research* 2008; 2: 1-10.

- [22] Mander GJ, Pierik AJ, Huber H, Hedderich R. Two distinct heterodisulfide reductase-like enzymes in the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus profundus*. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1106-1116.
- [23] Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Holmes DS. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 2008; 94: 180-184.
- [24] Okabayashi A, Wakai S, Kanao T, Sugio T, Kamimura K. Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. *J Bioscience Bioengineering* 2005; 6: 644-652.
- [25] Reysenbach AL, Hamamura N, Podar M, Griffiths E, Ferreira S, Hochstein R, Heidelberg J, Johnson J, Mead D, Pohorilles A, Sarmiento M, Schweighofer K, Seshadri R, Voytek MA. Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. *J Bioscience Bioengineering* 2005; 6: 644-652. Complete and draft genome sequences of six members of the *Aquificales*. *J Bacteriology* 2009; 191: 1992-1993.
- [26] Ehrenreich A, Widdel F. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4517-4526.
- [27] Banciu H, Sorokin DY, Galinski EA, Muyzer G, Kleerebezem R, Kuenen JG. *Thioalkalivibrio halophilus* sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, facultatively alkaliphilic, and extremely salt-tolerant, sulfur-oxidizing bacterium from a hypersaline alkaline lake. *Extremophiles* 2004; 8: 325-334.
- [28] Holm NC, Gliesche CG, Hirsch P. Diversity and structure of *Hyphomicrobium* populations in a sewage treatment plant and its adjacent receiving lake. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 522-528.

- [29] Simianu M, Murakami E, Brewer JM, Ragsdale SW. Purification and properties of the heme- and iron-sulfur- containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry* 1998; 37: 10027-10039.
- [30] Abken HJ, Tietze M, Brodersen J, Bäumer S, Beifuss U, Deppenmeier U. Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *J Bacteriology* 1998; 180: 2027-2032.
- [31] Deppenmeier U, Blaut M, Gottschalk G. H<sub>2</sub>:heterodisulfide oxidoreductase, a second energy-conserving system in the methanogenic strain Gö1. *Arch Microbiol* 1991; 155: 272-277.
- [32] Deppenmeier U, Muller V, Gottschalk G. Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch Microbiol* 1996; 165: 149-163.
- [33] Baker-Austin C, Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology* 2007; 15: 165-171.
- [34] Ide T, Bäumer S, Deppenmeier U. Energy Conservation by the H<sub>2</sub>: Heterodisulfide Oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Gö1: Identification of Two Proton-Translocating Segments. *Journal of Bacteriology* 1999; 181: 4076-4080.
- [35] Brasseur G, Bruscella P, Bonnefoy V, Lemesle-Meunier D. The bc(1) complex of the iron-grown acidophilic chemolithotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* functions in the reverse but not in the forward direction. Is there a second bc(1) complex?. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1555: 37-43.
- [36] Gomes CM, Faria A, Carita JC, Mendes J, Regalla M, Chicau P, Huber H, Stetter KO, Teixeira M. Di-cluster, seven-iron ferredoxins from hyperthermophilic *Sulfolobales*. *JBIC* 1998; 3: 499-507.

- [37] Zeng J, Huang X, Liu Y, Liu J, Qiu G. Expression, purification and characterization of a [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] cluster containing ferredoxin from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr Microbiol* 2007; 55: 518-523.
- [38] Botuyan MV, Toy-Palmer A, Cheng J, II Blake RC, Beroza P, Case DA, Dyson HJ. NMR solution structure of Cu(I) rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: structural basis for the extreme acid stability and redox potential. *J Mol Biol* 1996; 263: 752-767.
- [39] Walter RL, Ealick SE, Friedman AM, II Blake RC, Proctor P, Shoham M. Multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) crystal structure of rusticyanin: a highly oxidizing cupredoxin with extreme acid stability. *J Mol Biol* 1996; 263: 730-751.
- [40] Schäfer K, Magnusson U, Scheffel F, Schiefner A, Sandgren MO, Diederichs K, Welte W, Hülsmann A, Schneider E, Mowbray SL. X-ray structures of the maltose-maltodextrin-binding protein of the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* provide insight into acid stability of proteins. *J Mol Biol* 2004; 335: 261-274.
- [41] Hedderich R, Klimmek O, Kröger A, Dirmeier R, Keller M, Stetter KO. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiology Reviews* 1999; 22: 353-381.
- [42] Moczygemba C, Guidry J, Jones KL, Gomes CM, Teixeira M, Wittung-Stafshede P. High stability of a ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *A. ambivalens*: involvement of electrostatic interactions and cofactors. *Protein Science* 2001; 10: 1539-1548.
- [43] Leal SS, Gomes CM. On the relative contribution of ionic interactions over iron-sulfur clusters to ferredoxin stability. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1784: 1596-1600.

## Figure captions

**Fig. 1.** Expression and purification analyses of the recombinant Fe-S cluster-binding protein, from *A. ferrooxidans* LR, by SDS-PAGE (12%). Lane 1, molecular weight marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder); lane 2, not induced fraction; lane 3, induced fraction of cells carrying the vector pET28a-R after IPTG induction for 2 h; lane 4, induced fraction of cells carrying the vector pET28a-R after IPTG induction overnight; lane 5, soluble fraction of cells carrying the vector pET28a-R after IPTG induction; lane 6, insoluble fraction of cells carrying the vector pET28a-AFE\_0551 after IPTG induction; lane 7, lyses fraction; lane 8, purified protein fractions eluted from the column with 300 mM imidazole.

**Fig. 2.** Sequence alignment of the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR with *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 (ACA\_2420), *Thioalkalivibrio* sp. strain HL\_EbGR7 (Tgr7\_2212), *Rhodobacter* sp. SW2 (Rsw2\_3300), *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC 51888 (Hden\_2630), *Hydrogenivirga* sp. 128-5-R1-1 (HG\_18434), *Hydrogenobaculum* sp. strain YO4AAS1 (HYO\_1078) and *Sulfolobus solfataricus* 98/2 (Ssol\_2103). The black boxes indicate the two sets of Fe-S binding residues Cys and other possible residues important for the stability of the protein.

**Fig. 3.** UV-visible scanning of oxidized and reduced recombinant Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR. The solid line indicates the oxidized protein and the dashed line indicates the reduced protein. The inset shows the difference of the spectrum at wavelength ranging from 300 to 500 nm.

**Fig. 4.** Secondary structure prediction of the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR. Cylinders represent  $\alpha$ -helices, arrows represent  $\beta$ -strands and lines represent random coil structure. The prediction was performed with the PHD program.

**Fig. 5.** Secondary structure prediction of the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR. The prediction was performed with the CDNN program.

**Fig. 6.** Far-UV circular dichroism spectrum of the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR in acid pH range. The protein was previously incubated for 24 h in the respective pH before each measurement.

**Fig. 7.** Far-UV circular dichroism spectrum of the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR in basic pH range. The protein was previously incubated for 24 h in the respective pH before each measurement.

**Fig. 8.** pH dependence of the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR melting temperature ( $T_m$ ).  $T_m = 96\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 1);  $T_m = 97,5\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 2);  $T_m = 99\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 3);  $T_m = 95,5\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 4);  $T_m = 40\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 5);  $T_m = 46\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 8);  $T_m = 49\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 9);  $T_m = 81\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 10);  $T_m = 74\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 11);  $T_m = 75\text{ }^\circ\text{C}$  (pH 12).

**Table 1.** Sequence alignment of the Fe-S cluster-binding protein from *A. ferrooxidans* LR.

**Table 2.** Identification of the Fe-S cluster-binding protein codified from *A. ferrooxidans* LR by nano-electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

**Table 1.**

<b>Organism</b>	<b>Order/Family</b>	<b>Accession</b>	<b>% Identity</b>	<b>% positives</b>	<b>Predict function</b>
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	<i>Acidithiobacillales/ Acidithiobacillaceae</i>	AFE_0551	100%	100%	Heterodisulfide reductase subunit C
<i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756	<i>Acidithiobacillales / Acidithiobacillaceae</i>	ACA_2420	90%	228/239 95%	Heterodisulfide reductase subunit C
<i>Thioalkalivibrio</i> sp. Strain HL-EbGR7	<i>Chromatiales/ Ectothiorhodospiraceae</i>	Tgr7_2212	70%	192/237 81%	Heterodisulfide reductase subunit C
<i>Rhodobacter</i> sp. SW2	<i>Rhodobacterales/ Rhodobacteraceae</i>	Rsw2 DRAFT_3300	58%	173/235 73%	Heterodisulfide reductase subunit C
<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> ATCC 51888	<i>Rhizobiales/ Hyphomicrobiaceae</i>	Hden DRAFT_2630	51%	162/234 69%	Heterodisulfide reductase subunit C
<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1	<i>Aquificales/ Aquificaceae</i>	HG1285_18434	37%	150/253 59%	Heterodisulfide reductase subunit C
<i>Hydrogenobaculum</i> sp. Strain Y04AAS1	<i>Aquificales/ Aquificaceae</i>	HYO4AAS1_1078	36%	149/253 58%	Heterodisulfide reductase subunit C
<i>Sulfolobus solfataricus</i> 98/2	<i>Sulfolobales/ Sulfolobaceae</i>	Ssol_2103	34%	120/221 54%	Heterodisulfide reductase subunit C



**Table 2.**

Sample	Protein Class	Accession number	Peptide Sequence, m/z, z
Protein	iron-sulfur <i>Cluster binding</i>	gi   218666436	TLIDPDR, 830.4012, +2 LGLKAELMK + Oxidation (M), 1020.68, +3 YWIYLIR, 1027.56, +2 DVRPEGVMK, 1032.52, +3 TGEVLAEYVK, 1109.54, +2 MGMNVVFRPK, 1195.59, +2 QMTSKICNISSPYL, 829.3574, +2 IEDTEVMVGFFK, 1415.67, +2 DIIWQCVSCNK, 1423.66, +2 SWGKTGEVLAEYVK, 1568.86, +3 IEDTEVMVGFFKR, 1572.77, +3 ATAHWMEENGLTPK, 1592.68, +2 AGQPLVQAWIVEFGK, 1643.84, +2 DKDIIWQCVSCNK, 1666.74, +2 AGQPLVQAWIVEFGKR, 1799.98, +2 RAGQPLVQAWIVEFGK, 1801.05, +3 TLSTHFDEEFTHQCIEFGR, 2356.02, +3 AGQPLVQAWIVEFGKR, 1801.05, +3 TLSTHFDEEFTHQCIEFGR, 2357.2, +4 LQHDHLVIDGVDVSGSWNTMITPR, 2822.51, +4 TLDYEEHFEEIIQSYSGGENVHR, 2853.29, +4 ILQHDHLVIDGVDVSGSWNTMITPR, 2806.52, +4

**Figures**

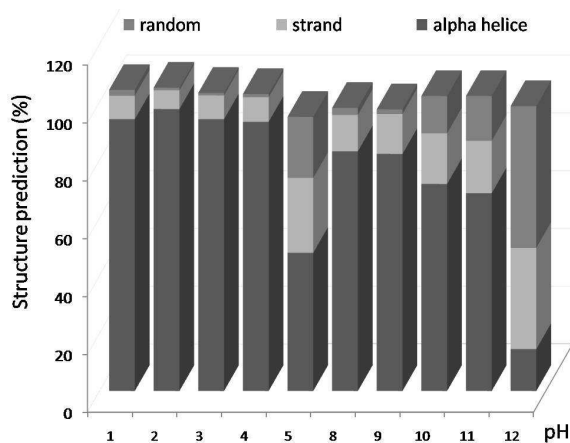


Figure 1

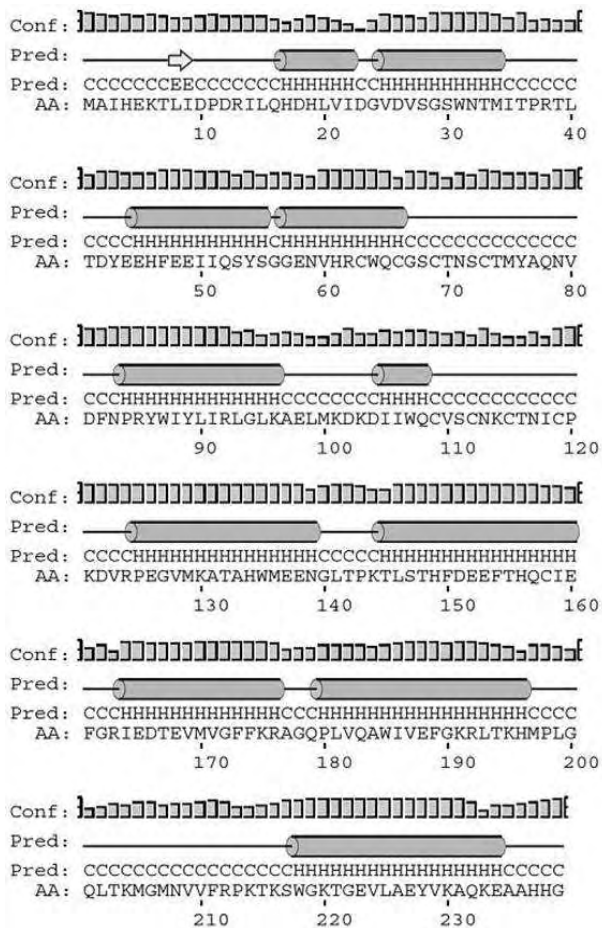


Figure 2

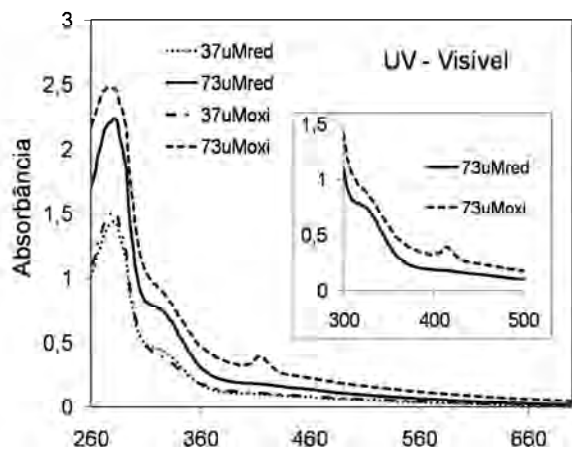


Figure 3

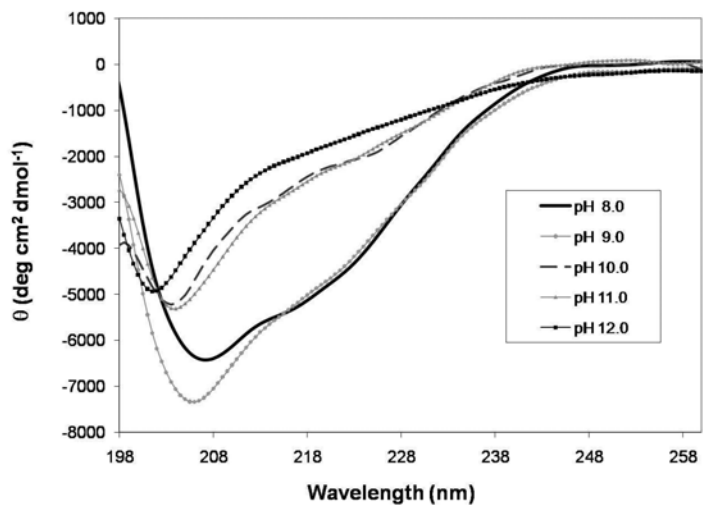


Figure 4

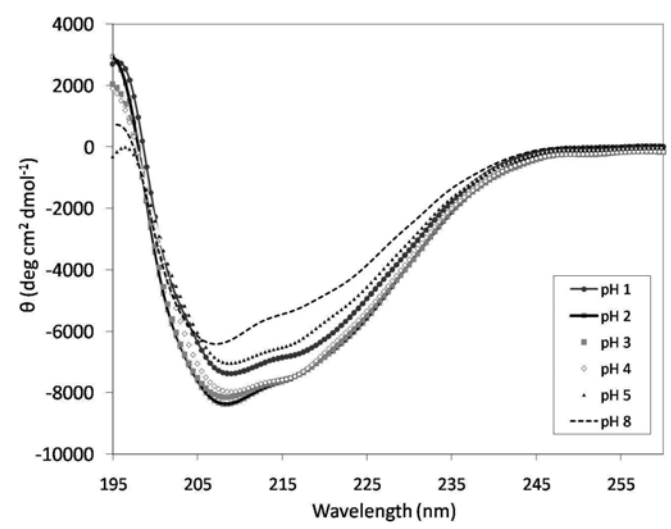


Figure 5

```

AFE_0551 : MALHRTIIDDRILQHDHIVDGVDSSENNTMTPRRLTYEHEHBEIISYSGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 92
ACA_2420 : MALHRTIIDDRILQHDHIVDGVDSSENNTMTPRRLTYEHEHBEIISYSGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 92
Tgr7_2212 : MALHRSRIRERLNHESIVDGVDSSENNTMTPRRLTYEHEHBEIISYSGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 92
Raw2_3300 : NPLHRSRIRERLNKVNHTAIDGVDSGHSSTFHKSRVTVYNEAMQEBIAAMPGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 92
Hden_2630 : NPLHRSRIRERLNKVNHTAIDGVDSGHSSTFHKSRVTVYNEAMQEBIAAMPGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 92
HG_18434 : MALHRSRIRERLNKVNHTAIDGVDSGHSSTFHKSRVTVYNEAMQEBIAAMPGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 93
HYO_1078 : MALHRSRIRERLNKVNHTAIDGVDSGHSSTFHKSRVTVYNEAMQEBIAAMPGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 93
Sso1_2103 : NPLHRSRIRERLNKVNHTAIDGVDSGHSSTFHKSRVTVYNEAMQEBIAAMPGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 92

AFE_0551 : IGLKADIMKDRDIIIVDGVDSSENNTMTPRRLTYEHEHBEIISYSGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 184
ACA_2420 : IGLKADIMKDRDIIIVDGVDSSENNTMTPRRLTYEHEHBEIISYSGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 184
Tgr7_2212 : IGLKADIMKDRDIIIVDGVDSSENNTMTPRRLTYEHEHBEIISYSGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 184
Raw2_3300 : TGMHRSRIRERLNKVNHTAIDGVDSGHSSTFHKSRVTVYNEAMQEBIAAMPGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 184
Hden_2630 : NPLHRSRIRERLNKVNHTAIDGVDSGHSSTFHKSRVTVYNEAMQEBIAAMPGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 184
HG_18434 : IGLKADIMKDRDIIIVDGVDSSENNTMTPRRLTYEHEHBEIISYSGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 186
HYO_1078 : IGLKADIMKDRDIIIVDGVDSSENNTMTPRRLTYEHEHBEIISYSGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 186
Sso1_2103 : KQKQALTEIQNSIRVDSGHSSTFHKSRVTVYNEAMQEBIAAMPGSENVHRCQCCSCNSCMY-AQNVDFPRYWIILR : 178

AFE_0551 : -----IIVEFGKRLTTHMPLGQTRKMGNNVVERE-KTKS-GRKTGEIYAEVYKAKQEAHHG----- : 239
ACA_2420 : -----IIVEFGKRLTTHMPLGQTRKMGNNVVERE-KTKS-GRKTGEIYAEVYKAKQEAHHG----- : 239
Tgr7_2212 : -----ILKVFYLRNMTGLDISHILKMGNNVVERE-RKSS-GRKTGEIYAEVYKAKQEAHHG----- : 238
Raw2_3300 : -----LLALITSLLLKMPVGVYFRLGFTVVERE-KVRN-SKNRVAQEVYDVRKAAQR-----AALGHTGKGDH----- : 248
Hden_2630 : -----LVAIWMGLARRIVPKMGKTLAQAVERE-KARR-KNVRASIDMIYEDEMRRKQLTIAAVERSTQPTQTHLEAAE : 260
HG_18434 : ILKKPIPFPIGGVPEILKSLAAKPLISNNIGPVLNAKHMLEH-RKNNRNFKQVTRKVMDEEGVFAH----- : 253
HYO_1078 : ILKKPIPFAGGVPDILKSLAAKPLISNNIGPVLNAKHMLEH-RKNNRNFKQVTRKVMDEEGVFAH----- : 253
Sso1_2103 : -----MVTLSLKLINIGAAIKGGLIKDLRNRVKNRDKIKVLEAMKQEVVPE----- : 230

```

Figure 6

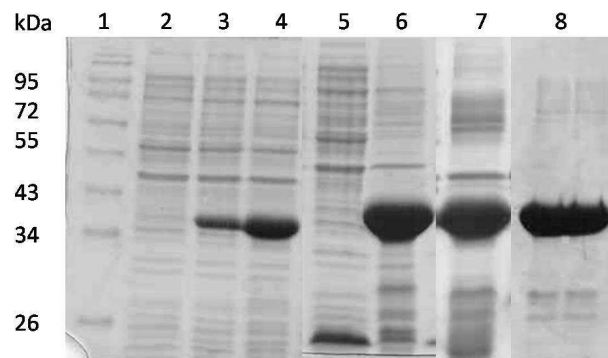


Figure 7

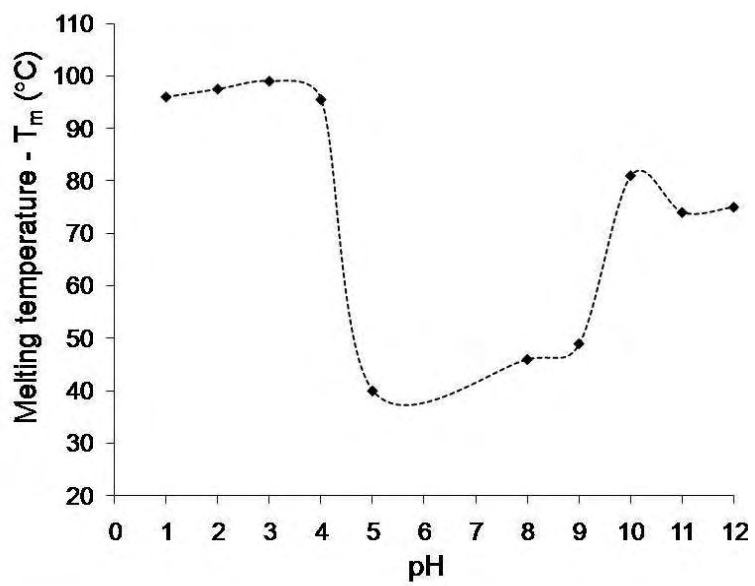


Figure 8