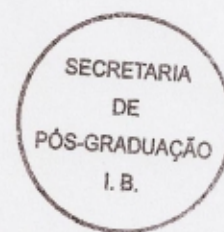


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Daniela Alves Ribeiro

“Estudo da resposta fisiológica de *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante alterações nas condições de cultivo através de análise proteômica e da expressão gênica”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
DANIELA ALVES RIBEIRO  
Daniela Alves Ribeiro  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Laura m. m. Ottoboni

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de microrganismos.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Laura Maria Mariscal Ottoboni

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>R354e</b> | <p>Ribeiro, Daniela Alves<br/> Estudo da resposta fisiológica de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> mediante alterações nas condições de cultivo através de análise proteômica e da expressão gênica / Daniela Alves Ribeiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni.<br/> Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>. 2. Proteômica. 3. Expressão gênica. 4. Stress (Fisiologia). 5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p align="right">(rodt/ib)</p> |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Título em inglês:** Physiological response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions, analyzed by gene expression and proteomic tools.

**Palavras-chave em inglês:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*; Proteomics; Gene expression; Stress (Physiology); Fourier transformed infrared.

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos.

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Laura Maria Mariscal Ottoboni, Fabiana Fantinatti-Garboggini, Valeria Maia de Oliveira, Salete Graziola, Tatiana Amábile de Campos.

**Data da defesa:** 17/02/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.



Campinas, 17 de Fevereiro de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni  
(Orientadora)

Laura m.m. Ottoboni  
(Assinatura)

Dra. Valéria Maia Merzel

Merzel  
(Assinatura)

Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini

Fabiana Fantinatti Garboggini  
(Assinatura)

Dra. Salete Aparecida Gaziola

Salete Gaziola  
(Assinatura)

Dra. Tatiana Amabile de Campos

Tatiana Campos  
(Assinatura)

Dra. Lara Durães Sette

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Dra. Maricilda Palandi de Mello

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Dra. Maria Ines Z. Sato

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus; é a sua obra mais notável.”*

Galileu Galilei

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, sempre!*

*Ao meu anjo protetor, companheiro amado e melhor amigo, Bá, a quem agradeço cada conquista da minha vida;*

*A minha família: pai amado que todo apoio me ofereceu; mãe amada, por tudo compreender e amados irmãos Fred e Lu;*

*À Laura, pela orientação e grandiosos ensinamentos;*

*Aos membros integrantes da pré-banca, Dra Valéria Maia e Dra Maria Inês pelas sábias sugestões;*

*Aos membros integrantes da banca, Dra Valéria Maia Merzel, Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini, Dra. Salete Aparecida Gaziola, Dra. Tatiana Amabile de Campos, por aceitarem contribuir com esta pesquisa;*

*Ao Dr. Márcio por todo apoio dado às análises de proteoma e na submissão dos “papers”; Ao Dr. Chico Campos, da Universidade Federal do Ceará e Dr. Gilberto Dumont da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela enorme contribuição com as análises proteômicas;*

*Ao Dudu e Renato Vicentini, por todo suporte dado aos nossos “papers”;*

*Ao Lucio Ferraz, por tanto ter me ensinado e ajudado no início do doutorado;*

*A todos do laboratório de Biologia Molecular ambiental, Tânia, Fernanda Reis, Danielle Januzzi, Bruna, Leandro, Suzy, Lucy e Viviane, por anos de tão boa convivência e aprendizado. Em especial a Camila Carlos (Cabeção) e Fabiana Alexandrino (Frau) pelo convívio encantador e principalmente pela linda amizade que sempre guardarei comigo;*

*As minhas companheiras de república, Máira, Talita, Diana, Lídia, Ana Laura, Ju, Marília, Carol, Letícia, Juks, Simone, pela amizade e compreensão em relação a minha falta de tempo, correria e estresse.*

*Ao CBMEG e todos seus integrantes pelos dias de convívio;*

*A todos meus amigos do CTBE, Dr. Roberto Ruller, João Paulo, Junio, Cleiton, Thabata, Hans, Livia, Ana Paula, Douglas e Rodrigo, pelas alegrias de cada dia.*

*Ao Dr Fabio Squina do CTBE por todo apoio e compreensão;*

*A CAPES e a FAPESP pelo financiamento;*

*A todos, que por ventura, não foram mencionados aqui, mas que de alguma forma participaram desta trajetória.*

# ÍNDICE

|                                                                                                                                                                                             |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>VIII</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>X</b>    |
| <b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                        | <b>1</b>    |
| <b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                                                                                              | <b>3</b>    |
| 2.1. O Gênero <i>Acidithiobacillus</i> e a biolixiviação.....                                                                                                                               | 3           |
| 2.2. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....                                                                                                                                            | 5           |
| 2.3. Genética e biologia molecular de <i>A. ferrooxidans</i> .....                                                                                                                          | 7           |
| 2.4. Fatores que interferem na biolixiviação .....                                                                                                                                          | 11          |
| 2.5. Respostas bacteriana a estresses.....                                                                                                                                                  | 18          |
| 2.5.1 Chaperonas moleculares.....                                                                                                                                                           | 19          |
| 2.5.2. Proteólise e complexos proteolíticos bacterianos.....                                                                                                                                | 23          |
| 2.6 . Técnicas aplicadas no estudo .....                                                                                                                                                    | 26          |
| 2.6.1. PCR em tempo Real .....                                                                                                                                                              | 26          |
| 2.6.2. Proteômica .....                                                                                                                                                                     | 28          |
| 2.6.3. FTIR.....                                                                                                                                                                            | 29          |
| 2.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....                                                                                                                                              | 33          |
| 2.6.5. Bioinformática .....                                                                                                                                                                 | 34          |
| <b>CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                                          | <b>37</b>   |
| 3.1. Objetivo geral:.....                                                                                                                                                                   | 37          |
| 3.2. Objetivos específicos: .....                                                                                                                                                           | 37          |
| <b>CAPÍTULO 4 – Artigo: Heat and phosphate starvation effects on the proteome, morphology and chemical composition of the biomining bacteria <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>.....</b> | <b>38</b>   |
| <b>CAPÍTULO 5 – Artigo: Gene expression modulation by heat stress in <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> LR .....</b>                                                                     | <b>50</b>   |
| <b>CAPÍTULO 6 – Artigo: The small heat shock proteins from <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>: gene expression, phylogenetic analysis and structural modeling.....</b>                   | <b>74</b>   |
| <b>CAPÍTULO 7 – DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                         | <b>99</b>   |
| <b>CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                                        | <b>106</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                                    | <b>108</b>  |

## RESUMO

*Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria quimiolitotrófica, Gram-negativa e acidofílica que exerce um importante papel no processo de biolixiviação. O processo de biolixiviação é afetado por intempéries como variações na temperatura e na composição de nutrientes e, entender os mecanismos que *A. ferrooxidans* dispõe para sobreviver em ambientes extremos é de suma importância para melhorar o seu emprego no processo de biolixiviação. Neste trabalho foi estudada a resposta de *A. ferrooxidans* ao aumento da temperatura e à privação de fosfato. Para tanto, foram utilizadas técnicas baseadas em microscopia, espectroscopia no infravermelho, ferramentas proteômicas, PCR quantitativo e bioinformática. Pela microscopia eletrônica de varredura, verificou-se o alongamento das células de *A. ferrooxidans*, e a espectroscopia no infravermelho (FTIR) mostrou alterações em números de ondas entre 850 e 1275  $\text{cm}^{-1}$ , referentes a carboidratos, fosfolípidos e fosfoproteínas. A abordagem proteômica utilizada, uma combinação de eletroforese de duas dimensões e espectrometria de massas, identificou 44 proteínas diferencialmente expressas e pertencentes a 11 categorias funcionais. Dentre as proteínas com expressão aumentada foram identificadas algumas de resposta ao choque térmico. A técnica de PCR quantitativo em tempo real foi utilizada para avaliar o padrão de expressão de genes do choque térmico e de outros genes que codificam proteínas pertencentes a diversas categorias funcionais em *A. ferrooxidans*. Para tanto, *A. ferrooxidans* foi cultivada a 40°C até 50% de oxidação dos íons ferrosos (aproximadamente metade fase logarítmica) e também foi submetida a um choque térmico em diferentes tempos e na mesma temperatura. Os resultados obtidos mostraram que o padrão de expressão da maioria dos genes analisados foi afetado após o choque térmico. Contudo, o crescimento a 40°C pouco afetou a expressão gênica, com exceção de alguns genes relacionados com o transporte de ferro, os quais foram consideravelmente reprimidos. Análises *in silico* para predição de sítios de ligação do fator



sigma 32 da RNA polimerase nos genes afetados pelo aumento da temperatura indicaram que 15 do total de genes analisados possivelmente estão sob a regulação deste fator. Adicionalmente, análises da filogenia das sequências de aminoácidos de três “*small heat shock proteins*” (AFE\_1437, AFE\_1009 e AFE\_2172) revelou que elas são, possivelmente, proteínas não-parálogas. Estudos estruturais baseados em modelagem molecular por homologia indicaram que as proteínas AFE\_1437, AFE\_1009 e AFE\_2172 possuem um domínio  $\alpha$ -cristalino com características estruturais semelhantes. Contudo, a proteína codificada por AFE\_2172 apresenta uma região C-terminal bastante curta. Os resultados obtidos com este trabalho mostram que *A. ferrooxidans* possui um conjunto de respostas ao estresse muito bem elaborado, enfatizando seu potencial para uso biotecnológico.

## ABSTRACT

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a chemolithoautotrophic, Gram negative, acidophilic bacterium which plays an important role in metal bioleaching. During bioleaching, cells are subjected to changes in growth temperature and nutrient starvation, thus understanding the mechanisms used for their survival in such harsh environments could help to improve *Acidithiobacillus*'s efficacy on such processes. This study presents the effects of heat and phosphate starvation on *A. ferrooxidans* physiology, analysed using microscopy, infrared spectroscopy, proteomic tools, quantitative PCR and bioinformatics. Scanning electron microscopy results showed that under the tested stress conditions *A. ferrooxidans* cells became elongated, and the Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis showed alterations in wavenumbers between 850 and 1275 cm<sup>-1</sup>, which are related to carbohydrates, phospholipids and phosphoproteins. Proteomic analyses, such as 2-DE and tandem mass spectrometry, identified 44 differentially expressed protein spots, the identified proteins belonging to 11 different functional categories. The up-regulated proteins were mainly from the protein fate category. Real time quantitative PCR was employed to analyze changes in the expression patterns of heat shock genes, as well as many other genes encoding proteins related to several functional categories in *A. ferrooxidans*. Cells were submitted to long-term growth and to heat shock, both at 40°C. The results evidenced that heat shock affected the expression levels of most genes while long-term growth at 40°C caused minimal changes in gene expression patterns – with exception of some iron transport related genes, which were strongly down-regulated. Further bioinformatic analysis indicated a putative transcriptional regulation, by the  $\sigma^{32}$  factor, for 15 of the 34 heat-affected genes. In addition, phylogenetic analysis of some small heat shock proteins (AFE\_1437, AFE\_1009 e AFE\_2172) showed that sHSPs from *A. ferrooxidans* are possible non-

paralogous proteins. Homology molecular modeling structure studies indicated that the proteins encoded by AFE\_1437, AFE\_1009, and AFE\_2172 have conserved  $\alpha$ -crystallin domains. However, the model for AFE\_2172 showed a very short C-terminus. These results evidence that *A. ferrooxidans* has an efficient range of stress-responses, which explains its ability for biotechnological purposes.

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Organismos unicelulares, como bactérias, não dispõem de órgãos e tecidos especializados em prover um ambiente interno relativamente homogêneo e estável. Desta forma, os micro-organismos procariotos apresentam diversos mecanismos para se adaptarem às mudanças ambientais drásticas. A habilidade em responder rapidamente às flutuações ambientais é crucial para a aptidão competitiva e sobrevivência. O objetivo de entender a resposta celular às mudanças ambientais é obter informações que decifrem o aparato molecular escondido atrás da capacidade microbiana de adaptação aos mais diversos ambientes.

*Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria extremófila capaz de crescer em valores de pH tão baixos quanto 0,5 e concentrações de metais pesados muito elevadas para a maioria dos seres vivos existentes. Sendo considerado um organismo modelo para o estudo da biolixiviação (Rawlings, 2005), *A. ferrooxidans* vem despertando crescente interesse biotecnológico. Desta forma, a compreensão dos mecanismos adotados por essa bactéria em resposta às condições de estresse as quais está exposta é de considerável relevância.

Sendo o termo estresse recorrente neste estudo, faz-se necessário defini-lo. Assim, estresse pode ser definido como qualquer fator que promova uma situação desvantajosa para um organismo. Na maioria dos casos o estresse é uma medida diretamente relacionada ao crescimento e/ou sobrevivência. Em plantas, por exemplo, ele é medido através de alterações em processos relacionados com o crescimento vegetal, tais como a absorção de CO<sub>2</sub> e de minerais (Nogueira, 2004). Já em bactérias, estresse pode ser definido como o fenômeno no qual o crescimento normal da bactéria é interrompido ou desacelerado em virtude de algum fator externo. Este fator pode ser a ausência de algum nutriente, choque térmico, mudança brusca de pH, invasão viral entre outros.

Neste trabalho, o aumento da temperatura e a privação nutricional de fosfato foram estudados. Estes dois fatores de estresse afetam o processo de biolixiviação e, conseqüentemente, seus micro-organismos participantes. Para tanto, foi utilizada uma abordagem que englobou técnicas de diferentes áreas do conhecimento, biologia molecular e química. Este trabalho foi organizado em capítulos, sendo este o Capítulo 1. No Capítulo 2 é feita uma revisão bibliográfica do tema desta pesquisa e uma breve explicação das técnicas utilizadas. O Capítulo 3 foi destinado à apresentação dos objetivos deste trabalho e nos Capítulos 4, 5 e 6 são apresentados os artigos científicos resultantes desta pesquisa. No capítulo 7 é apresentada uma discussão geral dos resultados obtidos e as conclusões são apresentadas no Capítulo 8.

## CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O Gênero *Acidithiobacillus* e a biolixiviação

*Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria pertencente ao gênero *Acidithiobacillus* juntamente com as espécies *A. thiooxidans*, *A. caldus* e *A. albertensis* (Kelly & Wood, 2000). *Acidithiobacillus* é considerado um gênero polifilético enquadrando-se no Domínio *Bactéria*, filo Proteobacteria, classe  $\gamma$ -*proteobacteria* (Kelly & Wood, 2000); o mesmo subgrupo de famílias muito bem caracterizadas de bactérias heterotróficas como Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae e Vibrionaceae.

As espécies compreendidas pelo gênero *Acidithiobacillus* são bactérias Gram-negativas, não patogênicas, acidofílicas e quimiolitotróficas obrigatórias, sendo que o carbono para a constituição celular é captado através da fixação do dióxido de carbono atmosférico. Recentemente, Hallberg et al. (2010) propuseram a existência de uma nova espécie para o gênero *Acidithiobacillus*. De acordo com esses autores, a nova espécie, denominada *A. ferrivorans*, é um micro-organismo anaeróbico facultativo, diazotrófico, psicrotolerante com conteúdo de CG em torno de 56%. Ainda de acordo com Hallberg et al. (2010), as principais diferenças entre *A. ferrooxidans* e *A. ferrivorans* são referentes a uma menor tolerância a baixos valores de pH por *A. ferrivorans* e por essa última apresentar um mecanismo diferente de oxidação de ferro devido à ausência dos genes *rusA* e *rusB*, codificadores da rusticiana, uma das principais enzimas envolvidas na oxidação do ferro em *A. ferrooxidans*.

Todas as espécies do gênero *Acidithiobacillus* são capazes de obter energia através da oxidação do enxofre e de compostos inorgânicos contendo formas reduzidas deste elemento químico, como



sulfitos, sulfetos e tiosulfatos (Kelly & Wood, 2000), sendo que somente *A. ferrooxidans* e *A. ferrivorans* são capazes de obter energia através da oxidação aeróbica de íons  $\text{Fe}^{2+}$  (Kelly & Wood, 2000; Hallberg et al., 2010). É importante ressaltar que a capacidade em oxidar íons  $\text{Fe}^{2+}$  não é uma característica incomum entre as bactérias acidofílicas (Johnson & Hallberg, 2008).

Devido a este metabolismo oxidativo, as bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, principalmente *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, são largamente empregadas no processo de biolixiviação ou lixiviação bacteriana, sendo que a espécie *A. ferrooxidans* tem sido considerada como um micro-organismo modelo no estudo deste processo (Rawlings, 2005).

A biolixiviação promove a solubilização e subsequente recuperação de metais a partir de soluções aquosas. Neste processo os sulfetos metálicos insolúveis são oxidados a sulfatos solúveis pela ação do íon férrico e do ácido sulfúrico produzidos pelos micro-organismos (Rawlings, 2005). Segundo Bosecker (1997), a biolixiviação pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na forma direta, os sulfetos metálicos são oxidados pelo contato direto das células bacterianas, ou por ação enzimática das mesmas, gerando sulfatos solúveis. A forma indireta é caracterizada pela ação de substâncias lixiviantes originadas do metabolismo microbiano. Estas substâncias oxidam quimicamente os metais, solubilizando-os. As formas direta e indireta de biolixiviação ocorrem, na prática, concomitantemente em uma série de reações químicas, havendo, no entanto, divergências sobre qual dos dois processos é mais importante para a biolixiviação.

As espécies do gênero *Acidithiobacillus* são comumente encontradas em uma grande variedade de ambientes, especialmente em lugares onde compostos de enxofre são abundantes, como em áreas de mineração, de tratamento de efluentes e fontes térmicas sulfurosas. O Rio Tinto, localizado na Espanha, é um destes ambientes, apresentando pH ácido e altas concentrações de metais. Resultados de estudos microbiológicos convencionais mostraram que *A. ferrooxidans* está presente em alto número neste rio (Rawlings, 2005).

A importância do processo de biolixiviação para a economia mundial e para preservação do meio ambiente se dá em virtude do aumento da demanda mundial de bens minerais, o que tem provocado um esgotamento progressivo de reservas contendo altos teores de metais de interesse econômico. Assim, a aplicação da biolixiviação para recuperação de metais a partir de minérios de baixos teores se mostrou como uma alternativa economicamente e ecologicamente viável, pois quase sem exceção, este método não requer alto consumo de energia, não gera emissão de gases poluentes e formação de chuva ácida, devido à liberação de óxidos de enxofre para atmosfera e não poluem efluentes aquáticos com resíduos de metais tóxicos, como acontece nos métodos convencionais (Rawlings, 2005).

No Brasil, o Centro de Tecnologia Mineral (Cetem), unidade de pesquisa do Ministério da Ciência e Tecnologia no Rio de Janeiro, está operando uma unidade semi-piloto de Biolixiviação em parceria com a norte-americana Geobiotics, objetivando a substituição gradativa do processo pirometalúrgico (queima de sulfetos de cobre em altas temperaturas) pelo bio-hidrometalúrgico (lixiviação bacteriana). Na unidade de biolixiviação situada na mineração Caraíba (Bahia), os sulfetos calcopirita e bornita são utilizados para a obtenção do cobre eletrolítico. O cobre eletrolítico é utilizado em cabos e fios para a transmissão de energia elétrica por chegar a ter 99,99% de cobre puro <sup>1</sup>.

## **2.2. *Acidithiobacillus ferrooxidans***

*A. ferrooxidans* é uma bactéria muito versátil sendo que com muita frequência são publicados novos dados na literatura de linhagens capazes de diferentes tipos de respiração, linhagens

---

<sup>1</sup> <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=010125070227>- Acesso em 08/08/2010

psicrotolerantes e/ou com maior tolerância a valores mais baixos de pH. Além dessa diversidade quanto às propriedades fisiológicas e ao crescimento, também são observadas diversidades nas sequências de RNAr 16S e no conteúdo de C+G. Toda essa diversidade era, até então, explicada como sendo uma consequência da variabilidade genética da espécie *A. ferrooxidans*, todavia, atualmente vê-se uma tendência de considerar a existência de novas espécies (Hallberg et al., 2010).

Luo et al. (2009) realizaram um trabalho de detecção de diversidade genômica em 12 linhagens de *A. ferrooxidans* isoladas de diferentes áreas de drenagem ácida de minas (DAM) na China e, por meio da tecnologia de microarranjos de DNA, essas linhagens mostraram-se altamente diversas. Estes autores analisaram detalhadamente cinco categorias funcionais, incluindo o metabolismo energético e de carbono, sendo que os resultados mostraram que muitos genes são ausentes em várias dessas categorias. Além disso, estes autores concluíram que a distribuição geográfica foi o principal fator para a diversidade encontrada. Obviamente, a variabilidade genética entre diferentes linhagens de *A. ferrooxidans* reflete na grande diversidade fisiológica encontrada entre linhagens até então descritas. Por exemplo, *A. ferrooxidans* realiza respiração aeróbica utilizando  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{S}^0$  como doadores de elétrons ( $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$  e  $\text{S}^0/\text{O}_2$ ), mas muitas linhagens são capazes de realizar também a respiração anaeróbica utilizando os seguintes pares doador/receptor de elétrons:  $\text{H}_2/\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{H}_2/\text{S}^0$ , e  $\text{S}^0/\text{Fe}^{3+}$  e outras também são hábeis em utilizar hidrogênio e ácido fórmico para o crescimento aeróbico (Ohmura et al., 2002).

A resistência a altas concentrações de metais pesados como alumínio, zinco, cobalto, manganês, cobre, cromo e urânio (Rawlings, 2005) é outra característica que se destaca em *A. ferrooxidans* e é extremamente importante para micro-organismos que atuam no processo de biolixiviação. O crescimento desta bactéria em meios de cultivo contendo  $\text{Co}^{2+}$  (30,0 g/L),  $\text{Cu}^{2+}$  (55,0 g/L),  $\text{Ni}^{2+}$  (72,0 g/L),  $\text{Zn}^{2+}$  (120,0 g/L) e  $\text{Fe}^{2+}$  (160,0 g/L) já foi reportado (Rawling, 2005).

Em um estudo comparativo entre *A. ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* e *A. thiooxidans* foi demonstrado que *A. ferrooxidans* e *L. ferrooxidans* tinham aproximadamente a mesma resistência ao  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , mas *L. ferrooxidans* foi menos resistente ao cobalto do que *A. ferrooxidans*. Os resultados para *A. thiooxidans* mostraram que esta bactéria foi resistente a menos que 5 g/L para todos os cátions testados, com exceção ao zinco que foi de 10 g/L (Sand, 1993).

O crescimento ótimo para *A. ferrooxidans*, assim como para as outras espécies do gênero, ocorre em temperaturas em torno de 30°C e pH de aproximadamente 2,0 (Rawling, 2005), embora existam dados na literatura da ocorrência de linhagens de *A. ferrooxidans* capazes de crescer a 0°C (Dopson et al., 2006) e outras a 42°C (Rawlings, 2005). A linhagem psicrotolerante de *A. ferrooxidans* denominada SS3, capaz de crescer a 0°C, foi isolada em uma área industrial no noroeste da Sibéria. A comparação da capacidade oxidativa desta bactéria, crescida a 5°C, com uma linhagem mesofílica mostrou que a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  e dos compostos sulfurosos foi maior com a linhagem psicrotolerante (Dopson et al., 2006).

Economicamente o emprego de *A. ferrooxidans* também se mostra bastante versátil. Além da sua participação no processo de biolixiviação, esta bactéria é utilizada no tratamento de minérios refratários de ouro, na remoção de metais pesados de esgotos e no processo de desulfurização do carvão (Rawlings, 2005).

### 2.3. Genética e biologia molecular de *A. ferrooxidans*

Com o genoma totalmente anotado, estudos que avaliam as capacidades metabólicas e de regulação d *A. ferrooxidans* foram e estão sendo realizados, ajudando na compreensão dos caminhos bioquímicos que sustentam os processos biogeoquímicos, funções metabólicas e da evolução das comunidades microbianas em ambientes ácidos. A anotação do genoma deste micro-organismo se

torna ainda mais importante quando nos deparamos com sua recalcitrância às manipulações genéticas convencionais.

São várias as dificuldades impostas ao pesquisador para se obter sucesso na manipulação genética deste organismo, por exemplo, não há marcadores selecionáveis como resistência a antibióticos e/ou a metais pesados, o cultivo deste micro-organismo em meio sólido é bastante difícil, além do fato de que seu crescimento lento e baixa produtividade celular dificultarem a realização de vários experimentos. Assim, com relativa dificuldade e pouca eficiência, foram realizados experimentos de conjugação (Peng et al., 1994) e transformação por eletroporação (Kusano et al., 1992). Zhenying et al. (2000) obtiveram mutantes *recA* por meio de mutagênese de troca de marcadores. Todavia, informações básicas sobre a genética molecular de *A. ferrooxidans* foram acumuladas durante os anos. Um enorme número de relatos sobre a existência de plasmídeos naturais e transposons em *A. ferrooxidans* tem sido registrado (Rawlings & Kusano, 1994; Dominy et al., 1997; Holmes et al., 2001). Vários destes plasmídeos foram clonados em *Escherichia coli*. Rawlings et al. (1984) reportaram que um plasmídeo isolado de *A. ferrooxidans*, capaz de replicar em *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, se propagou entre linhagens de *E. coli*.

Dois plasmídeos de *A. ferrooxidans* têm sido estudados em maiores detalhes, o plasmídeo pTF1 de 6,7 kb (Holmes et al., 1984) e o plasmídeo pTF-FC2 *Broad-host-range*, de 12,2 kb e relacionado à resistência ao arsênio nesta bactéria (Rawlings et al., 1993). Um trabalho realizado por Jin et al. (1992) demonstrou a transferência do plasmídeo InPC de *E. coli* para *A. thiooxidans*. No entanto, tentativas de transferir plasmídeos de largo espectro de *E. coli* para *A. ferrooxidans* não obtiveram o mesmo sucesso.

Conforme mencionado anteriormente, *A. ferrooxidans* produz energia através da oxidação de íons ferrosos e de compostos sulfurados, gerando íons férricos e ácido sulfúrico. Estes produtos da oxidação são os responsáveis pelo ataque químico aos sulfetos metálicos, permitindo a solubilização

de metais. Assim, o transporte de elétrons é muito importante para o processo biolixiviante. Nesta bactéria, os genes que codificam para proteínas envolvidas na oxidação de ferro estão organizados em duas unidades transcricionais, os operons *petI* e *rus*.

O operon *petI* foi alvo de estudo nas linhagens de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 (Levican et al., 2002) e ATCC 33020 (Bruscella et al., 2007). Este operon (*petC-1*, *petB-1*, *petA-1*, *sdrA-1*, e *cycA-1*) codifica as três subunidades do complexo *bc* (PetCAB), uma desidrogenase de cadeia curta (Sdr) cuja função é desconhecida e um citocromo *c<sub>4</sub>*, para o qual a função de receptor de elétrons oriundos da proteína rusticianina tem sido sugerida. Esses elétrons são transferidos para o complexo *bc* (Levican et al., 2002).

O operon *rus* (*cyc2*, *cyc1*, *hyp*, *coxB*, *coxA*, *coxC*, *coxD*, e *rus*) codifica dois citocromos do tipo *c* (Cyc1 e Cyc2), os componentes do complexo citocromo-oxidase e a proteína rusticianina, respectivamente (Appia-Ayme et al., 1999). Yarzabal et al. (2002) demonstraram que Cyc2 recebe elétrons diretamente do  $Fe^{2+}$  devido sua localização na membrana externa, atuando no primeiro passo da oxidação do ferro. Baseando-se em estudos genéticos, bioquímicos e transcricionais, Holmes & Bonnefoy (2006) propuseram que os elétrons oriundos da oxidação do ferro, seguem do citocromo Cyc2 para rusticianina, a partir de onde alguns elétrons seguem o caminho “downhill” – citocromo Cyc 1 → citocromo-oxidase aa, enquanto outros elétrons seguem o caminho “uphill”. Neste último ocorrerá a regeneração do doador universal de elétrons NADH através do percurso: CycA1 → complexo *bc* → ubiquinona → NADH desidrogenase.

*A. ferrooxidans* fixa  $CO_2$  atmosférico usando a energia oriunda da oxidação de ferro/enxofre através do ciclo de Calvin. A enzima chave neste processo, D-ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (RuBisCO) é composta de duas subunidades, uma grande e uma pequena (Kusano et al., 1999). Em *A. ferrooxidans* a subunidade maior é codificada pelos genes *cbbL 1* e *cbbS-1*, e a subunidade menor é codificada pelos genes *cbbL-2* e *cbbS-2* (Kusano et al., 1999; Appia-Ayme et

al., 2006), sendo que a expressão da RuBisCO é controlada pelo regulador transcricional *cbbR*. Luo et al. (2009) demonstraram através de experimentos de hibridização DNA-DNA que em *A. ferrooxidans* os genes *cbbL-1/cbbS-1* são mais conservados que *cbbL-2/cbbS-2*.

Em 2006, Appia-Ayme et al. sugeriram modelos para o metabolismo de carbono usando técnicas de microrranjos de DNA e de bioinformática. Os resultados deste trabalho indicaram que genes que codificam proteínas envolvidas na fixação de CO<sub>2</sub>, formação de carboxissomo e biosíntese de glicogênio foram induzidos quando a bactéria era cultivada na presença de enxofre enquanto genes envolvidos na utilização de glicogênio foram preferencialmente expressos na presença de ferro, sugerindo que *A. ferrooxidans* é capaz de ajustar o metabolismo de carbono em resposta a variações ambientais.

O genoma de *A. ferrooxidans* carrega genes que codificam cinco enzimas requeridas na biosíntese de glicogênio a partir de 6-P-frutose. Vários genes envolvidos no anabolismo (*glgC*, *glgA*, *glgB*) e catabolismo de glicogênio (*glgP1*, *glgP2*) também já foram descritos (Valdés et al., 2008). Alguns genes, como o que codifica fosforibuloquinase, envolvidos na utilização do glicogênio, não foram identificados no genoma de *A. ferrooxidans*, sugerindo que esta bactéria regenera piruvato e 3-P-glicerato por caminhos alternativos.

*A. ferrooxidans* carrega três genes (AFE\_1802, AFE\_1676 e AFE\_3248) que foram preditos codificar frutose-bifosfato aldolases, enzima que catalisa a formação de frutose 1,6-bifosfato. Na maioria das bactérias heterotróficas, a interconversão de 1 frutose 1,6-bifosfato em 6-P-frutose é executada pelas enzimas frutose-bifosfatase e fosfofrutoquinase (Valdés et al., 2008). Um gene codificando uma frutose-bifosfatase (AFE\_0189) foi identificado no genoma de *A. ferrooxidans*, o que sugere um fluxo direto de carbono fixado a armazenamento de glicogênio. Da mesma forma, um gene candidato para fosfofrutoquinase (AFE\_1807) também foi identificado na região vizinha aos

genes envolvidos em glicólise e gliconeogênese, sugerindo uma rota metabólica bidirecional para utilização e geração de glicogênio (Valdes et al., 2008).

No que se refere à resistência a metais pesados, o operon *ars*, composto pelos genes *arsC*, *arsR*, *arsB* e *arsH*, codifica proteínas responsáveis pela resistência ao arsênio III em *E. coli* (Butcher et al., 2000) e está presente no genoma de *A. ferrooxidans*. O operon de resistência ao mercúrio encontrado em *A. ferrooxidans* difere daqueles encontrados na maioria das bactérias Gram-negativas por não se iniciar com o gene *merR*. Ao contrário, este operon consiste do gene *merC*, que codifica uma proteína transportadora de mercúrio, e do gene *merA*. Adicionalmente, é encontrado no genoma de *A. ferrooxidans* outro operon contendo dois genes funcionais *merR*, um *merC* e dois genes não-funcionais *merA*. Foi encontrado um gene homólogo Tn7 *tnsA* próximo ao operon *mer*, sugerindo que um evento de transposição pode ter sido responsável por esse arranjo gênico (Inoue et al., 1991).

## **2.4. Fatores que interferem na biolixiviação**

A biolixiviação é uma tecnologia já consolidada na indústria minero-metalúrgica e é aplicada com sucesso no tratamento de minérios refratários de ouro e na recuperação de cobre contido em minérios marginais e rejeitos. Entretanto, muitas vezes os processos ambientalmente seguros, como a biolixiviação, possuem uma cinética mais lenta, quando comparados a processos químicos tradicionalmente empregados no processamento de sulfetos metálicos (lixiviação direta e lixiviação sob pressão). Diversos são os fatores tidos como limitantes para a biolixiviação, como o pH, a temperatura, a disponibilidade de nutrientes, o fosfato, concentração de íons metálicos, potencial de oxido-redução, disponibilidade de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, entre outros. Grande parte do poder limitante desses fatores se deve a sua grande influência no crescimento e na sobrevivência das bactérias.



### 2.4.1. Temperatura

A temperatura é um dos principais parâmetros para o crescimento microbiano e, em se tratando de biolixiviação, além de interferir no crescimento dos micro-organismos do processo, a temperatura também interfere na velocidade das reações químicas, particularmente na biolixiviação indireta, em que ocorrem reações sem ação enzimática (Rawlings, 2005). As reações envolvidas no processo de lixiviação bacteriana são exotérmicas e, apesar da velocidade das reações ser baixa, o processo se dá numa grande massa mineral, levando o interior desta massa a atingir temperaturas elevadas, na faixa de 60 a 80°C. Em um modelo desenvolvido para simular uma pilha cilíndrica de minério de sulfeto com 20 m de altura e 20 m de raio foi estimado temperaturas de até 100°C em determinados pontos da pilha (Rawlings, 2005). Nestas condições a oxidação química ocorre de forma mais rápida (Bennett, 1989).

Tyagi et al. (1994) mostraram que a temperatura exerce um papel indireto, mas bastante significativo na dissolução de metais como cádmio, cromo, cobre, níquel, chumbo e zinco. Segundo esses autores esse efeito indireto se deve à influência da temperatura no crescimento microbiano e na taxa de produção de sulfato, o que por sua vez acarreta em mudanças no pH. O trabalho de dissertação de mestrado de Pina (2006) mostrou que a quantidade de zinco solubilizado é fortemente influenciada pela temperatura, de forma que o aumento da temperatura provoca uma elevação na concentração de metal solubilizado. Existe uma concentração limite ou crítica do agente oxidante acima da qual um posterior aumento da temperatura não provoca uma elevação na concentração de zinco em solução. Segundo Pina (2006), a etapa controladora do processo de lixiviação do sulfeto de zinco é, provavelmente, a reação química na superfície do sulfeto na etapa inicial de lixiviação, e a difusão do íon férrico através da camada de enxofre elementar formada sobre a superfície do sulfeto, durante a etapa final do processo de dissolução.

Em se tratando de *A. ferrooxidans*, a literatura é farta de trabalhos que investigam o efeito da temperatura na taxa de oxidação de metais por essa bactéria (Tshilombo et al., 2002; Leahy et al., 2005). Kovalenko et al. (1981) relataram que a temperatura afeta a taxa de oxidação dos íons ferrosos. Rodríguez et al. (2003) demonstraram que a dissolução da pirita é controlada pela quimioadsorção competitiva entre  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  na superfície do mineral e, de acordo com Deveci et al. (2004), altas temperaturas podem promover a precipitação do íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). A influência da temperatura é também crucial na biolixiviação da calcopirita, um mineral extremamente importante para a indústria do cobre (Rawlings, 2005). Durante a biolixiviação desse minério, uma camada de passivação, de constituição ainda indefinida é formada. Essa camada é considerada uma das razões para a lenta cinética de lixiviação da calcopirita e a temperatura tem sido considerada um dos fatores de maior interferência na formação dessa camada (Dutrizac, 1989; Tshilombo et al., 2002).

Modak et al. (1996) adaptaram uma linhagem de *A. ferrooxidans* à temperatura de 42°C, usando várias subculturas em meio 9k em temperaturas crescentes (30 a 42°C). Estes autores observaram que a linhagem adaptada apresentou um aumento na biolixiviação da pirita. Quando a linhagem voltou a ser cultivada a 30°C, a tolerância a 42°C foi perdida mostrando que ela era estresse-dependente. Desta forma, para que linhagens adaptadas a temperaturas mais elevadas possam ser utilizadas, a biolixiviação deve ser efetuada na mesma temperatura a qual a bactéria foi adaptada (Modak et al., 1996).

Entretanto, em se tratando do efeito direto da temperatura na fisiologia de *A. ferrooxidans* ainda pouco se sabe. Em geral, quando células procarióticas ou eucarióticas são confrontadas com altas temperaturas em seus ambientes uma resposta ao choque térmico ou “*heat shock response*” é acionada (Lindquist, 1986). A resposta ao choque térmico é caracterizada por uma redução da síntese de proteínas celulares normais e, ao mesmo tempo, uma superprodução transiente de um

grupo específico de proteínas, conhecido como "*heat shock proteins*" (HSPs), após uma curta exposição a temperaturas elevadas ou a outros agentes de estresse (Lindquist, 1986).

Em *A. ferrooxidans*, Hubert et al. (1995) demonstraram que após sofrer um choque de temperatura, as células sobreviventes adquiriram uma resistência temporária a altas temperaturas. Estudos em eletroforese de duas dimensões mostraram modificações no padrão de proteínas de células de *A. ferrooxidans* durante crescimento em temperatura ótima (30°C) e estressante (41°C), sendo observado que a síntese de HSPs aumentava na condição estressante (Hubert et al., 1995). Xião et al. (2009), ao analisarem a expressão de alguns genes codificantes para HSPs de *A. ferrooxidans*, mostraram que a maioria desses genes, incluindo *dnaK*, *dnaJ*, *groEL*, *groES*, foram significativamente induzidos após um choque térmico de 25 minutos a 42 °C.

A indução de HSPs em resposta ao aumento da temperatura tem sido relatado em várias espécies de bactérias. Em *E. coli*, mais de 20 tipos de HSPs foram sintetizadas com o aumento da temperatura de 30°C para 42°C (Arsene et al., 2000). Através de experimentos de *Western blot* e sequenciamento do amino-terminal de proteínas isoladas de géis de duas dimensões, Varela & Jerez (1992) mostraram que DnaK e GroEL eram as principais HSPs de *A. ferrooxidans*.

#### **2.4.2. Privação de fosfato**

Durante o processo de biolixiviação, mudanças em vários parâmetros podem afetar adversamente os micro-organismos. Pode-se citar a privação de nutrientes como os fosfatos. O fósforo é um nutriente essencial para todas as células vivas, uma vez que é um constituinte dos ácidos nucléicos e de outros componentes celulares, como fosfolipídeos (Wanner, 1990). Um dos principais mecanismos de sinalização celular envolve a fosforilação de proteínas e várias moléculas sinalizadoras apresentam fosfato em sua constituição, como o cAMP, (p)ppGpp e polifosfato. Essas

moléculas são de fundamental importância para os mecanismos de transdução de sinais e regulação da expressão gênica (Vera et al., 2003).

Em resposta à limitação de fosfato inorgânico (Pi), bactérias e provavelmente todos os organismos vivos sintetizam fosfatases, nucleases e fosfato permeases para atender a demanda intracelular desse nutriente (Nahas et al., 1982). De fato, Seeger & Jerez (1993) demonstraram haver um aumento no nível de uma fosfatase ácida em células de *A. ferrooxidans* sob privação de fosfato. A fosfatase ácida tem como função converter o fosfato que se encontra associado a compostos orgânicos em fosfato inorgânico, uma vez que tais compostos orgânicos impedem a assimilação do fosfato.

A resposta fisiológica mediante a privação de fosfato tem sido bem caracterizada em *E. coli* (Wanner, 1990). Nesta bactéria já foi verificado que diferentes estresses ambientais como temperaturas extremas, choque osmótico e privação nutricional, induzem uma resposta semelhante (Hengge-Aronis, 1999). Esta resposta generalizada ao estresse se caracteriza principalmente pelo aumento dos níveis da subunidade  $\sigma^S$  da RNA polimerase, e uma concomitante diminuição da concentração da subunidade vegetativa  $\sigma^{70}$  (Hengge-Aronis, 1999).

Em *E. coli*, o nível de mais de 80 proteínas aumenta em resposta à privação de fosfato, sendo que muitas destas são proteínas codificadas por genes co-regulados pelo regulon Pho (Makino et al., 1989). A indução de genes pertencentes ao regulon Pho é acompanhada por um mecanismo no qual o regulador transcricional PhoB que liga à sequência box Pho (Makino et al., 1989). Muitas unidades transcricionais do regulon Pho representam operons multigênicos, como o operon que codifica para as quatro subunidades (PstS, pstC, PstA e pstB) do sistema de transporte de alta afinidade Pst (Willisky & Malamy, 1980). O operon *pstSCAB* inclui o gene *phoU* que é um possível regulador negativo do sistema de dois componentes PhoR-PhoB (Wanner, 1995). Genes do regulon Pho também codificam fosfatases (por exemplo, PhoA), que tem como função liberar fósforo de fontes

orgânicas do ambiente e enzimas requeridas para utilização de outras fontes de fósforo, incluindo UPG glicerol-fosfato (Wanner, 1995). *Pseudomonas fluorescens* Pf01 possui um regulon Pho carente de um homólogo de PhoA, porém apresenta uma fosfatase conhecida como PhoX, proteína responsável pela atividade fosfatase extracelular durante condições limitantes de fósforo (Monds et al., 2006). As enzimas polifosfatase kinase 1 (PPk1) e exopolifosfatase (PPX) também são membros do regulon Pho em *E. coli* e na cepa PCC 6803 de *Synechocystis*. PPk1 é uma enzima altamente conservada em procariotos e é responsável pela polimerização reversível do ATP para formar polifosfato [poly(P)] (Gómez-García et al., 2003). Já PPX é responsável pela degradação de poly(P) em condições de privação de fosfato

Em *A. ferrooxidans*, já foi demonstrado que o cultivo na ausência de fosfato acarreta em mudanças no perfil de várias proteínas (Jerez et al., 1992; He et al., 2005), mudanças morfológicas e fisiológicas, incluindo diminuição da taxa de oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  e de fixação de  $\text{CO}_2$ , acarretando em um declínio do metabolismo celular (Seeger & Jerez, 1993). Amaro et al. (1993) mostraram que a quantidade de lipopolissacarídeos, componente da matriz de polissacarídeos envolvida na colonização do minério por *A. ferrooxidans*, aumenta quando ela é submetida ao crescimento na ausência de fosfato. Farah et al. (2005) relataram a indução do gene *afel*, um componente chave na regulação do sistema “quorum sensing”. De fato, o metabolismo bacteriano de fosfato e polifosfatos tem sido correlacionado com a formação de biofilme e com vias regulatórias por “quorum sensing” (Rashid et al., 2000). A fosforilação das chaperonas DnaK e GroEL em *A. ferrooxidans* submetida à privação de fosfato também foi relatada (Seeger et al., 1996), sugerindo que chaperonas, em geral, estão envolvidas na resposta de *A. ferrooxidans* a diferentes tipos de estresse.

Vera et al. (2003) identificaram através da análise *in silico*, ortólogos dos principais genes do regulon *pho* de *E. coli* em *A. ferrooxidans*. Apesar dos produtos putativos das ORFS terem apresentado peso molecular semelhante ao de seu ortólogo, os pontos isoeletrônicos e a organização

destes genes diferem em algum nível, o que pode ser um reflexo das diferenças na regulação dos mesmos. De acordo com Vera et al. (2008), *A. ferrooxidans* é capaz de crescer na ausência de fosfato inorgânico devido à expressão do operon CP-lyase. Este operon permite a utilização de fosfanatos, uma classe de compostos orgânicos que possuem uma ligação C-P inerte e muito recalcitrante à degradação microbiana. Até o momento, *A. ferrooxidans* é o primeiro micro-organismo quimiolitotrófico capaz de utilizar fosfanatos como fonte de fosfato.

Uma análise do genoma anotado de *A. ferrooxidans* ATCC 2370 revelou a presença dos seguintes “clusters” gênicos potencialmente envolvidos no metabolismo de fosfato:

- *Ppx* (AFE\_1643, exopolifosfatase, também envolvida com processos de resistência a metais pesados) *phoU* (AFE\_1644, proteína regulatória de transporte de fosfato), *pstB* (AFE\_1645, fosfato ABC transportador dependente de ATP), *pstA* (AFE\_1646, permease fosfato ABC transportador), *pstC-2* (AFE\_1647, permease fosfato ABC transportador), *pstS-2* (AFE\_1648, PstC, ABC transportador – proteína de ligação ao fosfato), *phoR* (AFE\_1649, proteína regulatória PhoR), *phoB* (AFE\_1650, proteína regulatória de ligação ao DNA).
- *pstC-1* e *pstS-1* 2 (AFE\_1150 e AFE\_1151) codificam para uma fosfato permease e uma proteína periplasmática de ligação ao fosfato, respectivamente;
- *ppk* (AFE\_1210) proteína envolvida no estoque de polifosfato.

A determinação do estado fisiológico de *A. ferrooxidans* em situações de limitação de fosfato é particularmente importante quando os micro-organismos são crescidos na presença de arsenato. Sendo um análogo estrutural do fosfato, arsenato entra nas células através do sistema de transporte de fosfato inorgânico (*Pit -phosphate inorganic transporter, constitutive system*) e do Pst, que é o

sistema de transporte de fosfato inorgânico induzível (Van Veen, 1997). Como consequência, a resistência de *A. ferrooxidans* ao arsenato depende não apenas da presença de um *operon ars* de resistência a arsênio, mas também da concentração de fosfato presente no meio de crescimento (Varela, 1998).

Como visto, tanto o estresse térmico como o estresse causado pela privação nutricional por fosfato gera uma resposta comum conhecida como resposta ao choque térmico ou “*heat shock response*”. Um detalhamento deste processo será feito, pois será necessário em muitos pontos ao longo desta tese.

## **2.5. Respostas bacterianas a estresses**

As proteínas do choque térmico, ou HSPs, compõem um maquinário celular envolvido no renovelamento, reparo e degradação de proteínas danificadas (Lindquist, 1986). A indução das HSPs é transiente e isto representa um mecanismo homeostático e de proteção para que os organismos possam enfrentar o estresse fisiológico e ambiental.

O termo proteínas do choque térmico foi usado pela primeira vez em 1962 por Ritosa ao observar que o aumento da temperatura levava a uma mudança no padrão de cromossomos politênicos e a alteração dos genes expressos na glândula salivar de larvas de *Drosophila busckii*. Posteriormente, esses genes diferencialmente expressos devido à variação de temperatura foram clonados e seus produtos protéicos chamados de proteínas de choque térmico - HSP (Tissièrs et al., 1974). A resposta ao estresse descrita para larvas de *D. busckii* é aparentemente universal, ocorrendo tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos (Lindquist, 1986). Além disso, a estrutura primária da maioria das HSPs é bastante conservada evolutivamente, sugerindo uma similaridade funcional em todos os organismos. O estresse oxidativo, a privação nutricional, a exposição celular a

metais pesados e variações no pH dentre outros, são fatores que estão também associados à expressão de proteínas de choque térmico (Lindquist, 1986).

HSPs são comumente divididas em dois grupos, chaperonas moleculares e proteases. Juntamente, as chaperonas e proteases constituem o principal arsenal celular no combate aos efeitos de alguma forma de estresse, devido à suas habilidades em remover proteínas danificadas e em promover a regulação da expressão de diversos genes que codificam chaperonas e proteases (Dougan et al., 2002).

### **2.5.1 Chaperonas moleculares**

As chaperonas moleculares constituem uma família de proteínas importante na resposta ao estresse. Trata-se de proteínas que interagem com diversos substratos protéicos para auxiliar na obtenção da conformação tridimensional adequada ou no encaminhamento destas proteínas para degradação (Arsene et al., 2000). Consequentemente, as proteínas de choque térmico auxiliam na recuperação celular após o estresse reparando proteínas mal-formadas ou então promovendo sua degradação. Este grupo de proteínas é classificado de acordo com a massa molecular que possuem, por exemplo, HSP100 (Clps), HSP90, HSP70, HSP60 e HSP20 ou sHSP (*small* HSPs).

Apesar de serem denominadas proteínas de choque térmico, muitas destas proteínas são expressas também em condição normal. Por exemplo, em *E. coli*, a principal proteína de choque térmico da família das HSP70 é a DnaK, que sendo seu gene codificante expresso em condições normais de crescimento. A sequência de aminoácidos da proteína DnaK é altamente conservada em bactérias, como em *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus sakei*, *Streptomyces coelicolor* e espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Bacillus* e *Streptococcus*



(Gupta & Singh, 1994; Rensing & Maier, 1994; Gupta, 1998). De fato, esta chaperona é considerada uma das proteínas mais conservadas (Macario & Macário, 1999) e é a HSP melhor estudada.

As principais funções da proteína DnaK são auxiliar a montagem e hidrólise de proteínas, prevenir a agregação dos polipeptídios, ajudar na translocação de proteínas entre os compartimentos celulares e evitar a formação de grandes complexos protéicos (Gething, 1997). A atividade de DnaK está intimamente relacionada com a dependência de ligação com ATP, que fornece energia para que esta chaperona se ligue a proteínas para ajudar na montagem, reparo ou degradação de proteínas recém montadas ou desnaturadas. Além disso, para que a DnaK se ligue às proteínas, é necessária a participação de co-chaperonas: HSP40 (DnaJ) e GrpE (Mayer & Bukau, 1998). Estas três proteínas constituem a maquinaria necessária para auxiliar outras proteínas a adquirir sua conformação nativa (Parsell & Lindquist, 1993).

Na maioria das bactérias Gram-negativas como *E. coli*, a resposta ao choque térmico e a expressão de HSPs são principalmente e positivamente reguladas em nível transcricional pelo fator alternativo da enzima RNA polimerase sigma 32 -  $\sigma^{32}$  (Bukau, 1993), codificado pelo gene *rpoH*. Porém, a expressão dos genes também pode ser regulada negativamente em resposta ao choque térmico (Narberhaus, 1999). Um exemplo é o gene *hrcA* que codifica um repressor do gene *groEL* em *Bacillus subtilis*.

A expressão do gene *rpoH* é determinada pelo balanço homeostático entre a ligação da DnaK com proteínas desnaturadas e da interação da DnaK com o fator  $\sigma^{32}$  (Gamer et al., 1992). Quando as células encontram-se em condições normais, a concentração de proteínas desnaturadas é reduzida e a chaperona DnaK livre se liga ao fator  $\sigma^{32}$ , reduzindo a transcrição dos genes de proteínas de choque térmico (Gamer et al., 1992). Sob condições de choque térmico, a DnaK liga-se preferencialmente com proteínas desnaturadas, e desta forma o fator  $\sigma^{32}$  fica livre para se ligar à RNA polimerase, e este complexo fator  $\sigma^{32}$ /RNA polimerase induz a transcrição específica de genes de choque térmico,

incluindo os genes *dnaK* e *rpoH*. Algumas proteínas necessitam de outra chaperona, GroEL, para o processo de renaturação ser completado.

A proteína GroEL também é uma HSP cuja expressão é controlada pelo fator  $\sigma^{32}$ . Assim como DnaK, GroEL é altamente conservada, ATP-dependente, e possui atividade de chaperona ligando-se a proteínas em estado não-nativo e auxiliando a recuperação de suas formas nativas (Fayet et al., 1989). GroEL e sua co-chaperona GroES são proteínas essenciais não somente em condições de estresse, mas também sob condições normais (Fayet et al., 1989). Em *E. coli*, estas duas proteínas são co-expressas a partir do operon *groESL* (Bukau, 1993). Especula-se que os substratos fisiológicos de GroEL sejam proteínas estruturalmente instáveis que portanto requerem a chaperona permanentemente para manutenção conformacional (Houry et al., 1999).

Outro grupo de HSPs induzidas por choque térmico inclui proteínas de baixo peso molecular (10 kDa a 30 kDa), denominadas *small HSPs* (sHSPs), HSP da família 20 ou ainda  $\alpha$ -HSP, sendo que a denominação sHSP foi a adotada neste trabalho. As sHSPs são encontradas em praticamente todos organismos em número geralmente maior que um, contudo, alguns organismos eucariotos podem conter mais que 65 sHSP (Han et al. 2008). Esta classe de proteínas confere termotolerância a culturas celulares durante incubação prolongada a temperaturas elevadas (Laksanalamai et al. 2006). Isto demonstra a habilidade das sHSP em proteger outras proteínas celulares e em manter a viabilidade celular sob condições de estresse extremo, possivelmente devido a sua habilidade em se associar com proteínas, impedindo agregação irreversível e desnaturação.

As sHSP possuem diversas características que as distinguem das demais HSPs: elas são chaperonas independentes de ATP, são ativas na forma de complexos oligoméricos e exibem uma ampla capacidade de ligação a substratos (Han et al. 2008). Estudos recentes indicam que sHSPs são importantes para termoestabilidade, desagregação protéica e inibição da proteólise. Essas funções

podem ser aproveitadas para várias aplicações, incluindo nanobiotecnologia, proteômica, bioprodução e bioseparação (Han et al. 2008)

Em *E. coli* foram descritas duas sHSPs desta família, IbpA e IpbB (Kuczyńska-Wiśnik et al. 2002). A expressão de ambas as proteínas é induzida positivamente pelo fator  $\sigma^{32}$  em *E. coli* (Bukau 1993). A indução da expressão destas sHSPs ocorre em células que foram cultivadas a 30°C e posteriormente submetidas a 45°C durante 15 min (Kuczyńska-Wiśnik et al. 2002). A proteína IbpB (16 KDa) se liga com IbpA para formar um “corpo de inclusão”. Esta estrutura é formada rapidamente no citoplasma da célula quando a concentração de proteínas em conformação não-nativa aumenta. Este acúmulo é responsável pela indução da transcrição de IbpA e IbpB que se aderem às proteínas não-nativas formando o corpo de inclusão e direcionando algumas destas proteínas para as chaperonas DnaK e GroEL. Análises por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) de agregados protéicos mostraram que IbpA e IbpB em *E. coli* são as proteínas mais abundantes na fração insolúvel, embora a concentração de IpbB seja menor que a de IbpA (Kuczynska et al. 2002). Isto sugere que ambas as proteínas atuam em conjunto na estabilização dos agregados protéicos pós-choque térmico. É interessante notar que proteínas chaperonas ATP-dependentes (DnaK/DnaJ, GroEL/GroES) previnem a formação de agregados protéicos em *E. coli* (Parsell & Lindquist 1993), enquanto que IbpA e IpbB, ambas proteínas não-dependentes de ATP, exercem um efeito oposto. Outro fator importante é que depois de uma mudança de temperatura de 30°C para 42° C, o nível celular de IbpA e IbpB em *E. coli* aumenta aproximadamente 10 vezes, enquanto que a concentração de DnaK e GroEL apenas 2 vezes (Mock et al. 1999).

Outra proteína envolvida na resposta ao estresse, a proteína UspA, conhecida como proteína de estresse universal, é também uma pequena proteína citoplasmática codificada pelo gene *uspA* cuja expressão é aumentada quando a viabilidade celular é alterada devido a vários agentes de estresse, seja choque térmico, falta de nutrientes ou agentes tóxicos (Nyström & Neidhardt 1994). Além

disso, em *E. coli* a inativação do gene *uspA* torna a bactéria mais sensível aos agentes estressantes (Nyström & Neidhardt 1994). Bochkareva e colaboradores (2002) notaram que UspA foi co-sedimentada com GroEL durante o processo de purificação. Após adição de ATP e GroES, UspA foi liberada demonstrando que existe interação entre GroEL e UspA.

### **2.5.2. Proteólise e complexos proteolíticos bacterianos**

Os processos celulares são controlados por diversos tipos de regulação. A proteólise é um destes mecanismos de regulação por constituir uma importante forma de qualidade da síntese protéica e, conseqüentemente, representar uma regulação precisa dos níveis de diversas enzimas metabólicas (Sauer et al. 2004).

A proteólise em procariotos e eucariotos é realizada majoritariamente por complexos proteolíticos dependentes de energia (Parsell & Lindquist 1993). Tais complexos proteolíticos são capazes de clivar um amplo espectro de ligações peptídicas. No entanto, apenas proteínas anormais e/ou proteínas com tempo de vida curto são degradadas (Sauer et al. 2004). Esta regulação específica e precisa de degradação protéica depende de fatores reguladores que se associam aos complexos proteolíticos e que podem incluir até 6 ATPases diferentes e outras proteínas acessórias (Sauer et al. 2004).

Em células eucarióticas, a principal via de degradação protéica dependente de ATP envolve a conjugação de ubiquitina às proteínas alvo a serem degradadas. As proteínas ubiquitinadas são então degradadas pelo complexo protéico denominado proteasomo 26S (Pickart & Cohen 2004). Já em procariotos, a degradação protéica é realizada por pelo menos cinco complexos proteolíticos dependentes de ATP, ClpAP, ClpXP, hslUV (ClpYQ), Lon e FtsH (Sauer et al. 2004). Esses complexos apresentam uma arquitetura do tipo “pilha de anéis” e são formados por dois

componentes funcionais: um centro proteolítico em forma de barril (ClpP ou ClpQ /HslV) e uma chaperona ATPase da família AAA+ que forma um anel hexamérico (ClpA, ClpC, ClpE, ClpX ou HslU). A chaperona é responsável pelo reconhecimento do substrato, desnovelamento e segmentação da cadeia polipeptídica, enquanto o barril proteolítico possui múltiplos sítios ativos de serina e treonina que habilitam a hidrólise de proteínas em peptídeos (Sauer et al. 2004).

Essa arquitetura de dois componentes das proteases Clps e a existência de dois centros proteolíticos e diferentes chaperonas resultam em vários possíveis complexos. A protease ClpP pode interagir com as chaperonas ClpA, ClpC, ClpE e ClpX, enquanto ClpQ interage exclusivamente com ClpY formando o complexo ClpYQ (também chamado HslUV).

Praticamente toda espécie bacteriana possui o complexo ClpXP e as proteases Lon e FtSH (Kress et al. 2009), isso torna o complexo ClpXP o mais ubíquo de todos os complexos proteolíticos. ClpA e ClpC são ortólogos e usualmente um ou outro estão presentes no genoma bacteriano. ClpA é encontrada em proteobactéria Gram-negativas enquanto ClpC é encontrado em bactérias Gram-positivas e cianobactérias. ClpYQ existe na maioria das proteobactérias podendo também ser encontrado em algumas bactérias Gram-positivas.

As proteínas que interagem com a peptidase ClpP apresentam um sítio de ancoragem a esta última que consiste de um tripeptídeo ([LIV]-G-[FL]) localizado dentro do domínio D2 (Kress et al. 2009). Interessantemente, essa região é ausente em todos ClpBs homólogos examinados, o que explica por que ClpB atua independentemente de ClpP apesar da grande similaridade que ClpB possui com ClpA. Ainda, ClpB age juntamente com a chaperona DnaK na desagregação e renovelamento de proteínas (Mogk et al. 1999).

As proteínas ClpA, ClpX e ClpC regulam a proteólise através de sua interação com ClpP e atuam também como chaperonas em várias reações celulares tais como a ativação da proteína RepA do fago P1 e a montagem da transposase Um (Kress et al. 2009). Em *E. coli*, ClpA e ClpX são as

proteínas reguladores de ClpP enquanto em outras bactérias ClpC é o equivalente evolucionário de ClpA (Mock et al. 2004). Na presença de ClpX, ClpP degrada proteínas envolvidas no controle de replicação, transcrição e tradução como as proteínas  $\sigma$ -O, Phd e fator  $\sigma$  RpoS (Mock et al. 2004). Na presença de ClpA, ClpP degrada proteínas fusionadas à proteína  $\beta$ -galactosidase através de um mecanismo que depende diretamente da natureza do aminoácido terminal (Mock et al. 2004). Como parte do complexo ClpAP, a proteína ClpA exerce múltiplas funções: reconhecimento do substrato, hidrólise de ATP, desnovelamento do substrato, translocação do substrato para o centro proteolítico e ativação alostérica da atividade da peptidase (Hoskins et al. 1998). ClpA reconhece sequências específicas no N e no C terminal dos seus substratos. Uma vez reconhecido, o substrato é desnovelado e translocado para a cavidade proteolítica de ClpP (Hoskins et al. 1998).

Como anteriormente mencionado, ClpB não está estruturalmente nem funcionalmente relacionada à peptidase ClpP e não direciona seus substratos para degradação (Kim et al. 2000). Pelo contrário, ClpB tem uma notável capacidade em resgatar agregados protéicos e mediar a sua desagregação (Kim et al. 2000), processo que requer a assistência do sistema DnaK (Mogk et al. 1999). A proteína ClpB distingue das demais HSP 100 por conter uma região central mais longa conhecida como “espaçador” que separa os domínios D1 e D2 e é essencial para a atividade chaperona e para desagregação protéica (Kim et al. 2000).

Outra proteína chave nos complexos proteolíticos bacterianos é a proteína adaptadora ClpS. Uma das formas de garantir a especificidade e a diversidade funcional das proteínas AAA+ é através de proteínas adaptadoras (Mogk et al. 2004). As proteínas adaptadoras constituem uma nova classe de proteínas que modulam a especificidade de ligação e a atividade de chaperona de proteínas AAA+. Estas proteínas não são relacionadas estruturalmente e variam consideravelmente de tamanho, embora tendam a ser pequenas na maioria dos casos (Dougan et al. 2002). As proteínas adaptadoras podem exercer os seus efeitos ligando-se diretamente aos seus substratos ou formando

complexos (Mogk et al. 2004). Várias proteínas adaptadoras foram caracterizadas nos últimos anos em procariotos e em organismos superiores (Dougan et al. 2002).

A proteína ClpS exerce atividade moduladora da atividade do complexo ClpAP (Dougan et al. 2002). O gene *clps* codifica uma proteína de 106 aminoácidos e, análises de bioinformática, revelaram que existem dois homólogos de ClpS distintos em bactérias (Lupas & Koretke, 2003). No primeiro grupo, *clpS* está presente ao lado ou próximo de *clpA*, e encontra-se universalmente distribuída em proteobactérias e em organismos superiores como fungos e animais. No segundo grupo, a proteína ClpS está presente em organismos que não possuem ClpA tais como actinobactérias e cloroplastos, sugerindo que esta proteína possui atividades moduladoras de outras proteínas. *A. ferrooxidans* se encontra no primeiro grupo.

A proteína ClpS apresenta dois resíduos (E79 e K84) envolvidos no contato com ClpA que são essenciais não apenas para a formação do complexo ClpAS mas também para a própria degradação do substrato (Dougan et al. 2002). Os resíduos correspondentes não estão presentes na chaperona ClpB (Kim et al. 2000) o que pode explicar porque ClpS modula apenas a atividade de ClpA apesar da elevada similaridade entre esta última e ClpB. Apesar da proteína ClpS ser necessária pra a degradação eficiente de proteínas agregadas pelo complexo ClpAP, ela não é essencial para que tal degradação ocorra *in vivo* (Dougan et al. 2002).

## **2.6 . Técnicas aplicadas no estudo**

### **2.6.1. PCR em tempo Real**

A técnica da RT-PCR em tempo real permite a quantificação da expressão de genes induzidos em resposta a diferentes condições. A quantificação é baseada no número de transcritos de um dado

gene presente no cDNA em estudo, pois a quantidade de mRNA, produto direto da expressão gênica, é diretamente proporcional à atividade da célula. Isso permite quantificar a expressão de genes relacionados a diferentes processos fisiológicos e/ou metabólicos em uma dada condição de cultivo (Huggett et al., 2005).

Para se obter a quantificação relativa de genes de interesse se torna necessário a utilização de “*housekeeping genes*” ou controles endógenos. Os controles endógenos são assim chamados porque são expressos constitutivamente e são necessários para sobrevivência da célula (Huggett et al., 2005). O controle endógeno escolhido neste trabalho foi gene *alaS* que codifica uma Alanil tRNA sintetase. Este mesmo controle endógeno foi usado com sucesso em um estudo sobre a regulação da expressão gênica do operon *rus* em *A. ferrooxidans* (Yarzabal et al. 2004).

O ensaio realizado no presente trabalho foi baseado no sistema de detecção com o marcador *SYBRGreen*, em combinação com um sistema analítico de PCR em tempo real. Esta molécula, quando livre não emite fluorescência, mas quando ligada a cadeias duplas de DNA emite um forte sinal luminoso. O fluoróforo tem a capacidade de se ligar às cadeias duplas de DNA que, com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. À medida que se vão formando mais cadeias duplas de DNA por reação em cadeia de polimerase, mais moléculas de *SYBRGreen* se vão ligando a estas. A reação é monitorizada continuamente, sendo o aumento da fluorescência observado em tempo real. Durante as etapas de desnaturação, devido à quebra das cadeias duplas de DNA, as moléculas de *SYBRGreen* libertam-se, diminuindo a fluorescência. Uma vez que a detecção da fluorescência ocorre no final de cada etapa de extensão de cada ciclo de PCR, é possível monitorizar a quantidade crescente de DNA amplificado, sendo que a intensidade do sinal gerado é diretamente proporcional à quantidade de produto formado.

Em análises de PCR em tempo real, a quantificação da expressão é baseada no ciclo limiar ou ciclo “*threshold*” (CT). O CT é definido como o primeiro ciclo de amplificação, no qual o sinal de



fluorescência é maior que o nível mínimo de detecção, indicando que os produtos de PCR tornam-se detectáveis (Huggett et al. 2005). No final das reações de amplificação é também determinado o “*melting temperature*”, ou seja, a temperatura à qual ocorre a quebra da cadeia dupla de DNA. Para um dado par de “*primers*”, a temperatura de desnaturação é sempre igual. Assim, é possível determinar se a fluorescência lida se deve à amplificação do DNA alvo ou, por exemplo, à formação de dímeros de “*primers*”.

### **2.6.2. Proteômica**

A proteômica é definida como a análise sistemática do proteoma, em que Mark Wilkins e Keith Williams (1994), definiram como do conjunto de proteínas expressas por um genoma, célula ou tecido em uma condição específica. A proteômica permite identificar e quantificar o número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular e prover uma análise do estado celular, ou mudanças que ocorrem durante o crescimento, desenvolvimento ou resposta a fatores ambientais mostrando-se como uma tecnologia útil no estudo de sistemas biológicos altamente dinâmicos e complexos.

A proteômica é uma ferramenta que vem complementar o estudo do genoma. O sequenciamento completo do genoma de um organismo gera os chamados quadros abertos de leitura ou ORFs (Open Reading Frames), que são sequências de bases que tem o potencial de codificar proteínas. Algumas destas ORF's codificam proteínas hipotéticas, que são proteínas que não apresentam ainda uma anotação funcional confiável. Aproximadamente 30% das ORF's de organismos já sequenciados codificam para proteínas hipotéticas e, portanto a confirmação de um produto gênico através da análise proteômica é um passo importante complementar à anotação do genoma.

Inúmeras possibilidades de interações entre as proteínas tornam o proteoma ainda mais complexo, uma vez que a função molecular de uma proteína isolada pode não ser a mesma que a função dessa proteína num ambiente celular complexo. A estrutura tridimensional da proteína também vai interferir no papel funcional que desempenha (Kress et al. 2009). Desta forma, a proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios. Uma descrição completa do proteoma de um organismo pode fornecer não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições definidas e a distribuição dessas proteínas na célula.

### **2.6.3. FTIR - Infravermelho com transformada de Fourier**

A habilidade dos micro-organismos de se adaptarem a diferentes temperaturas tem atraído considerável atenção. Neste contexto é proposto que as propriedades das membranas biológicas são fundamentais para a sobrevivência e crescimento em diferentes temperaturas (Arthur & Watson 1976). De uma forma geral, os componentes do envoltório celular (parede e membrana celulares) estão fortemente sujeitos a modificações de acordo com condições ambientais e/ou de cultivo (Arthur & Watson 1976). As membranas celulares são consideradas estruturas macromoleculares termo-sensíveis e sinalizam quando ocorre acúmulo de proteínas desnaturadas e/ou danificadas na célula, ativando genes de choque térmico, os “*heat shock genes*” (Cordwell 2006). Esta sinalização se dá principalmente por eventos de fosforilação de proteínas (Kennelly & Potts 1996).

Tendo em vista que a técnica de FTIR (*Infravermelho com transformada de Fourier - do inglês Fourier transformed infrared*) é uma técnica utilizada há mais de 40 anos para a caracterização de micro-organismos baseando-se em seus diferentes espectros de infravermelho (Norris 1959) e tem se

mostrado uma ferramenta útil para avaliar a diferença da composição química de bactérias em diferentes estágios de crescimento, em diferentes meios de cultura e na classificação em espécies e em subespécies (Naumann et al. 1991), ela foi adotada neste trabalho como uma estratégia para avaliar as modificações sofridas por *A. ferrooxidans* quando submetida ao aumento da temperatura ótima de crescimento e à privação de fosfato. O uso desta abordagem foi encorajado pelo trabalho desenvolvido por Yu e Irudayaraj (2004) onde mostraram que o citoplasma e o envelope celular bacteriano apresentam características espectroscópicas diferentes. Desta forma, o FTIR neste estudo foi usado para investigar se e em que proporção o envelope celular de *A. ferrooxidans* é afetado mediante os estresses propostos.

A espectroscopia de infravermelho é uma radiação eletromagnética que fornece uma impressão digital da amostra. As bandas de absorção no espectro são causadas por movimentos de rotação, vibração ou rotação-vibração das moléculas em análise. Como cada composto é uma combinação única de átomos, dois compostos distintos nunca apresentam o mesmo espectro (Schmitt & Flemming 1998).

A região do espectro entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$  detêm bandas características e úteis na caracterização de micro-organismos, sendo que, a região abaixo de 1500  $\text{cm}^{-1}$  tem sido referida como região do *fingerprint* metabólico (Schmitt & Flemming 1998). O *fingerprint* metabólico detecta possíveis mudanças decorrentes da resposta a um determinado fator (Gidman et al. 2003) podendo elucidar alterações metabólicas, sem, contudo detalhar vias bioquímicas (Gidman et al. 2003).

Em diferentes bactérias, os grupos funcionais são bastante parecidos e geram sinais muito semelhantes. Contudo, a quantidade e a distribuição de tais grupos funcionais são altamente variáveis, permitindo uma análise eficiente (Naumann et al. 1991). Em *A. ferrooxidans*, a técnica de FTIR por reflectância difusa foi utilizada para caracterizar células cultivadas na presença de ferro e

enxofre, tendo sido demonstrado que as propriedades de superfície desta bactéria são afetadas pelas condições de cultivo (Sharma et al. 2003).

A espectroscopia por refletância difusa é principalmente observada em amostras sólidas pulverizadas, sendo sua aplicação prática muito difundida na literatura, podendo ser utilizada em equipamentos que operam na região do infravermelho próximo (Pasquini 2003), associada à sigla NIRRS, *Near Infrared Reflectance Spectroscopy*, ou simplesmente NIRS. A refletância difusa é observada quando uma luz incide em uma matriz descontínua, penetra na amostra (amostras do tipo pó, sólido, placa ou filme) e reflete trazendo informações espectrais. O caminho percorrido pela luz no interior da matriz pode ser considerado aleatório devido a múltiplas reflexões, algumas das quais após percorrer o interior de algumas partículas que constituem a amostra. Desta forma a luz refletida pode ser atenuada por absorção e o espectro resultante é similar ao obtido através da técnica no infravermelho por transmissão utilizando KBr (brometo de potássio). Uma importante diferença entre a transmissão e a refletância se dá devido o diferente caminho óptico percorrido pela luz. Enquanto que na transmissão o caminho óptico é constante para todo número de onda, na refletância por sua vez, o caminho pode ser variável.

#### **2.6.3.1. Análise multivariada**

A análise multivariada é a rigor, qualquer abordagem analítica que considere o comportamento de duas ou mais variáveis simultaneamente, num vasto campo do conhecimento que envolve uma grande multiplicidade de conceitos estatísticos e matemáticos (Pereira, 1999). Os métodos de análise multivariada aplicados na modelagem de informações químicas fazem parte da área da quimiometria, e são assim denominados, pois no caso da espectroscopia permitem manipular dados de absorbância espectrais associadas a uma ou mais frequências ao mesmo tempo. Estes métodos

têm recentemente tornado possível modelar propriedades químicas e físicas de dados simples e complexos, a partir de dados espectroscópicos.

### **2.6.3.2. Análise por Componentes principais (PCA)**

A análise por componentes principais (PCA) é um dos métodos mais comuns empregados na análise de informações (Brown 1995; Ferreira 2002), a qual tem por objetivo reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, a partir de combinações lineares dessas variáveis, preservando a maior quantidade de informação possível (variância). Esta análise vetorial permite descrever a variação ou dispersão de um determinado conjunto de dados.

Quando aplicamos um algoritmo de PCA num conjunto de variáveis, como por exemplo, espectros no infravermelho, o conjunto original destas variáveis é substituído por um novo conjunto de variáveis denominado de Componentes Principais (CPs). As novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das CP são denominadas de “*scores*” e “*loadings*”.

A principal característica do CPs é a ortogonalidade, porém o mesmo é facilmente reconstruído a partir da combinação linear das variáveis originais (espectros). Como vantagem, o novo conjunto de variáveis (CPs), geralmente concentra a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, diminuindo assim a dimensionalidade dos dados, sem perda significativa da informação química. A maioria dos aplicativos disponíveis utilizam a técnica de decomposição do valor singular (SDV) para obter as CPs, sendo neste caso a primeira componente principal (CP1) definida na direção (eixo) de maior variância do conjunto de variáveis originais. De forma decrescente em termos de variação são definidas as demais componentes principais, porém estas serão sempre ortogonais a CP1 e entre si. Por exemplo, um sistema que seja reduzido a 3 CPs (CP1, CP2 e CP3) se assemelha ao sistema cartesiano de coordenadas, em que todos os eixos são linearmente

independentes, isto é, ortogonais entre si. Para os casos de conjuntos de espectros consideramos inicialmente matriz de dados  $X$  ( $m \times n$ ), sendo que  $m$  corresponde ao número de amostras (espectros) e  $n$  o número de variáveis (frequências do espectro), que pode ser decomposta em 3 outras matrizes,  $U$ ,  $S$  e  $V$  (Ferreira, 2002), conforme expressão:  $X = USV^t$ .

As colunas de  $U$  e  $V$  são ortogonais. A matriz  $V$  é a matriz dos pesos, em que a primeira coluna contém os pesos de PC1 e assim por diante. O produto  $U \times S$  corresponde à matriz  $T$  dos escores. Por fim,  $S$  é matriz diagonal, cujos elementos (valores singulares) contém informações sobre a quantidade de variância que cada componente principal descreve. A matriz  $S$  é importante na determinação da dimensionalidade intrínseca da matriz de dados, podendo os analistas definir quantas CPs ou fatores devem ser utilizados para análises posteriores. Os autovalores que forem pequenos serão excluídos e as informações relevantes podem, de alguma maneira, ser separadas, eliminando-se, assim, os ruídos experimentais.

#### **2.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A morfologia dos micro-organismos usualmente sofre mudanças em decorrência de variações no ambiente. A maioria das bactérias termofílicas é pequena e apresenta forma filiforme, aumentando assim a superfície área-volume e melhorando a velocidade de troca de substâncias entre as células e o meio externo (Allen, 1953). Em bactérias mesofílicas, como *A. ferrooxidans*, a influência da temperatura no tamanho das células varia entre as espécies; Costa e Anton (1999) relataram uma diminuição no tamanho das células de *Salmonella typhimurium* com o aumento da temperatura de incubação, contudo, um aumento celular foi observado em levedura, *Bacillus* e *E. coli* (Christophersen, 1973). A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tem sido largamente usada no estudo de efeitos de ambientes estressantes em células bacterianas, como por

exemplo, na análise de alterações morfológicas em *Pseudomonas pseudoalcaligenes* submetida a temperaturas elevadas (Shi & Xia, 2003) e, desta forma, foi utilizada nesta tese para avaliar as modificações sofridas por *A. ferrooxidans* sob estresse.

#### 2.6.5. Bioinformática

Apesar do crescente avanço das técnicas experimentais em biologia molecular, caracterizar e identificar um número considerável de promotores, presentes em um dado genoma, continua sendo uma tarefa demorada e cara. Abordagens *in silico* são bastante utilizadas para reconhecer essas regiões em procariotos. *In silico* é uma expressão usada no âmbito da simulação computacional e áreas correlatas para indicar algo ocorrido "em ou através de uma simulação computacional". A expressão foi cunhada a partir das expressões latinas *in vivo* e *in vitro*, frequentemente usadas na Biologia. Análises *in silico* se tornam cada vez mais comum no campo da biologia graças aos avanços da bioinformática.

Bioinformática é o estudo e a aplicação de modelos e técnicas computacionais aos problemas de biologia molecular e consiste no desenvolvimento de ferramentas para a manipulação e análise de biossequências (DNA ou proteína). Um dos desafios da bioinformática é o estudo da regulação gênica e o conhecimento da região promotora de um dado gene. Um gene, em bactérias, é composto basicamente por uma região codificadora, por uma região promotora e por outras regiões, também importantes. A região codificadora é bem conhecida, mas sobre a região promotora não é trivial indicar com precisão a sua localização. Em contraste com regiões expressas de sequências de DNA, cuja função se torna aparente quando são traduzidas para proteínas ou para outras sequências de DNA, a função de um promotor é dada diretamente pela sua sequência de nucleotídeos. Além disso, as sequências que definem os vários promotores de um organismo podem apresentar variação

relativamente pequena entre si, mesmo entre organismos diferentes, mas pertencentes a um mesmo grupo. Quando esse fenômeno ocorre diz-se que ele se conserva (Almeida & Setubal 1998). Com base em promotores procarióticos conhecidos, basicamente, é possível prever três regiões características:

- uma sequência de 6 bases de nucleotídeos (hexâmero) centrada em  $-35$  do sítio inicial de transcrição  $+1$ ;
- um hexâmero centrado a  $-10$ ;
- e a região que separa os dois hexâmeros (distância).

Nos casos conhecidos, a principal característica do promotor consiste no fato de que cada posição de ambos os hexâmeros obedece a algum tipo de conservação. Por outro lado, o tamanho (número de bases) da região entre eles, que é variável, é relevante, enquanto que as suas bases parecem não ter qualquer conservação (Qiu, 2003). Ainda que os promotores sejam estruturas de importância indiscutível, a habilidade em identificá-los é menos desenvolvida comparada à de regiões codificantes de um gene. Isso acontece porque os promotores são muito divergentes e, até os seus padrões mais característicos, como os hexâmeros centrados nos sítios  $-35$  e  $-10$ , nem sempre são conservados (Qiu, 2003).

O uso de ferramentas computacionais tem se mostrado importante para inferir funções e estruturas de sequências e proteínas regulatórias. Dentre estas ferramentas, os Modelos Ocultos de Markov (“Hidden Markov Models” – HMM) constituem a mais utilizada atualmente e que tem dado melhores resultados no estudo de promotores. Essa preferência está firmada na hipótese de que regiões características de promotores, relevantes para que a RNA polimerase se direcione



corretamente ao sítio +1, devem se apresentar conservadas entre os promotores de um genoma ou até mesmo entre promotores de genomas de organismos próximos evolutivamente (Almeida & Setubal 1998). Um HMM descreve uma série de observações através de um processo estocástico oculto, tendo uma sequência de DNA como uma série de símbolos observados e as posições do promotor como a componente oculta do modelo. Com HMM é possível tratar de forma probabilística a variação estrutural dos elementos de uma mesma classe biológica, apontando regiões conservadas em sequências envolvidas na regulação da expressão gênica de organismos procarióticos (Reis, 2005).

Os métodos computacionais são uma poderosa ferramenta para a resolução de problemas biológicos. Assim, análises *in silico* foram usadas neste trabalho para predição de sítios de ligação para o fator  $\sigma^{32}$  da RNA polimerase em alguns genes do genoma de *A. ferrooxidans*.

## CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de resposta de *A. ferrooxidans* à condições de estresse utilizando diferentes metodologias como, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), PCR em tempo real, MALDI TOF-TOF-MS/MS e FTIR.

### 3.2. Objetivos específicos:

- Caracterização morfológica das células de *A. ferrooxidans*, através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), mediante ao aumento da temperatura ideal de cultivo e sob a privação de fosfato.
- Identificação de alterações no envelope celular através de FTIR – infravermelho com transformada de Fourier.
- Identificação e análise de proteínas expressas diferencialmente por *A. ferrooxidans*, submetida a alterações na temperatura e sob privação de fosfato.
- Análise, através de PCR em tempo real, da expressão de genes de diversas categorias funcionais e genes do choque térmico em *A. ferrooxidans* submetida às condições mencionadas acima.

CAPÍTULO 4 - Artigo: Heat and phosphate starvation effects on the proteome, morphology and chemical composition of the biomining bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*

# Heat and phosphate starvation effects on the proteome, morphology and chemical composition of the biomining bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Daniela A. Ribeiro · Danilo A. Maretto · Fábio C. S. Nogueira ·  
Márcio J. Silva · Francisco A. P. Campos · Gilberto B. Domont ·  
Ronei J. Poppi · Laura M. M. Ottoboni

Received: 3 August 2010 / Accepted: 19 October 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** *Acidithiobacillus ferrooxidans* is a Gram negative, acidophilic, chemolithoautotrophic bacterium that plays an important role in metal bioleaching. During bioleaching, the cells are subjected to changes in the growth temperature and nutrients starvation. The aim of this study was to gather information about the response of the *A. ferrooxidans* Brazilian strain LR to  $K_2HPO_4$  starvation and heat stress through investigation of cellular morphology, chemical composition and differential proteome. The scanning electron microscopic results showed that under the tested stress conditions, *A. ferrooxidans* cells became elongated while the Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis showed alterations in the wavenumbers between 850 and  $1,275\text{ cm}^{-1}$ , which are related to carbohydrates, phospholipids and phosphoproteins. These findings indicate that the bacterial cell surface is affected by the tested stress conditions. A proteomic analysis, using 2-DE and tandem mass spectrometry,

enabled the identification of 44 differentially expressed protein spots, being 30 due to heat stress ( $40^\circ\text{C}$ ) and 14 due to  $K_2HPO_4$  starvation. The identified proteins belonged to 11 different functional categories, including protein fate, energy metabolism and cellular processes. The upregulated proteins were mainly from protein fate and energy metabolism categories. The obtained results provide evidences that *A. ferrooxidans* LR responds to heat stress and  $K_2HPO_4$  starvation by inducing alterations in cellular morphology and chemical composition of the cell surface. Also, the identification of several proteins involved in protein fate suggests that the bacteria cellular homeostasis was affected. In addition, the identification of proteins from different functional categories indicates that the *A. ferrooxidans* response to higher than optimal temperatures and phosphate starvation involves global changes in its physiology.

**Keywords** *Acidithiobacillus ferrooxidans* · Scanning electron microscopy · Fourier transform infrared spectroscopy · Proteome · Stress

D. A. Ribeiro · M. J. Silva · L. M. M. Ottoboni (✉)  
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG),  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010,  
Campinas, SP 13083-875, Brazil  
e-mail: ottoboni@unicamp.br

D. A. Maretto · R. J. Poppi  
Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas  
(UNICAMP), CP 6154, Campinas, SP 13083-970, Brazil

F. C. S. Nogueira · G. B. Domont  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ),  
Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil

F. A. P. Campos  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,  
Universidade Federal do Ceará (UFC), CP 6039,  
Fortaleza, CE 60455-900, Brazil

## Introduction

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a Gram-negative, chemolithoautotrophic, acidophilic bacterium that thrives optimally around pH 2.0 and  $30^\circ\text{C}$ . It derives energy from the oxidation of ferrous iron or reduced sulphur compounds, and is used industrially in metal bioleaching, a process in which metal sulphides are converted to water-soluble metal sulphates (Rawlings 2005). During the bioleaching process, *A. ferrooxidans* is often subjected to changes in the ideal growth pH and temperature, and to nutrients starvation (Rawlings 2005). These changes can affect the bacterial

physiology and as a consequence, the efficiency of bioleaching.

*Acidithiobacillus ferrooxidans* respond to high temperatures by synthesizing several heat shock proteins (HSPs) (Jerez 1988, Xiao et al. 2009). This bacterium is also able to acquire thermotolerance (Hubert et al. 1995), which indicates that it has developed protective mechanisms to deal with heat stress. This fact is particularly important since temperature is one of the main factors affecting metals solubilization during bioleaching (Modak et al. 1996). Indeed, Modak et al. (1996) reported that a temperature-adapted strain of *A. ferrooxidans* was more efficient during pyrite bioleaching than non-adapted ones.

Regarding phosphate starvation, Seeger and Jerez (1993) showed a reduction in the *A. ferrooxidans* growth rate as well as in its capacity to oxidize ferrous iron and to fix CO<sub>2</sub>. Seeger et al. (1996) observed a protein phosphorylation increase in *A. ferrooxidans* cells submitted to phosphate starvation. Also, the chaperones DnaK and GroEL are phosphorylated when this bacterium is subjected to phosphate starvation (Seeger et al. 1996), suggesting the activation of a general stress response. Moreover, the lipopolysaccharides production is altered in phosphate starved *A. ferrooxidans* cells (Farah et al. 2005), which may affect bioleaching since lipopolysaccharides are part of the polysaccharide matrix involved in ore colonization.

Little is known about the *A. ferrooxidans* response to phosphate starvation and heat stress. Thus, in this work, three different approaches, namely, scanning electronic microscopy, FT-IR spectroscopy and proteome analysis, were used to investigate morphological changes, alterations in the chemical composition and in the protein profile of *A. ferrooxidans* LR cells subjected to such conditions. These analyses rely on the possibility of bacterial cell shape being affected by stress, which indicates that morphological changes are correlated to adaptive mechanisms that enable the cells to survive (Pianetti et al. 2009). Additionally, FT-IR, a method which measures the overall composition of a sample by detecting the molecular vibrations and other motions of chemical bonds, can be used to characterize modifications in cells grown in different conditions. Finally, the proteome analysis explore the alterations in the protein profile of the cell.

## Materials and methods

### Bacterial strain and growth conditions

The *A. ferrooxidans* Brazilian strain LR (Garcia Jr 1991) was used for the experiments. The bacteria were grown at 250 rpm in modified T&K liquid medium (Tuovinen and

Kelly 1972) containing: 0.4 g/l 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> and 33.4 g/l FeS·O<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 1.8, adjusted with sulfuric acid. The bacteria were grown under control conditions (30°C and presence of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in the medium), under heat stress (40°C) and under phosphate-limiting conditions (absence of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in the medium), as described by Knecht et al. (2008). The bacteria were grown until 50% of ferrous iron oxidation in the medium. The growth curve experiments were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of T&K medium, pH 1.8, inoculated with  $0.75 \times 10^9$  cells, on a rotatory shaker at 250 rpm. Bacterial growth was monitored by ferrous iron titration with potassium dichromate.

### Scanning electron microscopy (SEM)

Sample preparation for SEM was carried out in duplicate as described by Shi and Xia (2003), with minor modifications. Briefly, strain LR was grown at 30°C in the presence of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (control), at 40°C and in the absence of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, as described above. Cells were harvested, washed and resuspended in water, pH 1.8. The suspension (approximately  $1 \times 10^6$  cells) was filtered through a 0.45 µm Millipore membrane (Millipore, Ireland). The cells in the Millipore membrane were immersed in 2.5% glutaraldehyde/0.1 M sodium cacodylate buffer for 4 h, washed three times with 0.1 M sodium cacodylate buffer, treated for 3 h with 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M sodium cacodylate buffer and washed three times with sodium cacodylate buffer and deionised water. Cells were dehydrated by an ethanol series (30, 50, 70, 90 and 100% ethanol) and stored in 100% ethanol. Cells were critical-point-dried in a CO<sub>2</sub> atmosphere (Balzers Critical Point Dryer), mounted on aluminium stubs and gold-coated for 3 min in a Sputter Coater (Balzers, SCD050). They were examined under a JEOL 5800LV scanning electron microscope. Cell dimensions were measured using the ImageJ software (available at <http://rsb.info.nih.gov/ij>). The average cellular dimensions were calculated using 100 individual cells per treatment. The statistical significance of the observed differences in length, width and area was verified using one-way ANOVA.

### Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

*Acidithiobacillus ferrooxidans* cells that received different growth treatments were frozen in liquid nitrogen and lyophilized. The infrared spectra of the cells were recorded in an ABB-Bomem MB Series Fourier spectrometer with a diffuse reflectance attachment. Spectra were collected using a scan range of 400–3,800 cm<sup>-1</sup> at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. The data were imported into a PLS-Toolbox 4.21

for Matlab 6.5, and a baseline correction of the data was performed. In order to decrease concentration effects on the model, the first derivative spectra were used for the principal component analysis (PCA) model development. The data were also mean-centred.

### Protein extraction

*Acidithiobacillus ferrooxidans* whole cell protein extracts were obtained as described by Smolka et al. (2003). Briefly, bacterial cells (~100 mg, wet weight) were washed three times in 1 ml of washing buffer (10 mM Tris, pH 8.8, 3 mM KCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1 mM PMSF) and centrifuged for 2 min at  $5,400 \times g$  in a microcentrifuge (Beckman). The cells were lysed in 200  $\mu$ l of 10 mM Tris (pH 8.8), 0.5% (w/v) SDS, 5 mM EDTA and 1 mM PMSF. Dithiothreitol was added to a final concentration of 100 mM, and the samples were boiled for 3 min and centrifuged for 2 min at  $5,400 \times g$ . The protein concentration in the samples was determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The protein samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

2-DE gels and image analysis were performed as described by Vasconcelos et al. (2005). Briefly, approximately 200  $\mu$ g of total protein was loaded onto a rehydrated 11-cm Immobiline DryStrip pH 3–10 or pH 4–10 (GE Healthcare, USA). Isoelectric focusing was carried out in an Ettan IPGPhor isoelectric focusing system (GE Healthcare, USA). The second-dimension separation was carried out on a 15% acrylamide gel containing SDS. Gels were stained with 0.1% Coomassie PhastGel Blue R-350. The Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, USA) was used to detect and quantify protein spots in the gels. The experiments were performed in triplicate. The statistical significance of the observed spots differences was determined using the Student *t* test (*P* value  $\leq 0.05$ ).

### Mass spectrometry

The differentially displayed protein spots were excised from the acrylamide gels, destained and digested with sequencing-grade modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA), as described by Vasconcelos et al. (2005). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-tandem mass spectrometry (MALDI TOF-TOF-MS/MS) acquisition was performed in an ABI 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) using 3,5 dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid as the matrix. The obtained tandem mass spectra were searched against the NCBI nr database and the *A. ferrooxidans* ORFs database (J. Craig Venter

Institute) using the Mascot (version 2.1) MS/MS ion search tool (<http://www.matrixscience.com>). Cysteine residues were reduced and alkylated by iodoacetamide to carboxyamidomethyl cysteine, and methionine residues were modified to methionine sulfoxide wherever necessary. Peptide mass tolerance in the searches was 100 ppm for MS and 0.6 Da for MS/MS spectra. Peptides were considered identified when the score value exceeded the identity or extensive homology threshold value calculated by Mascot.

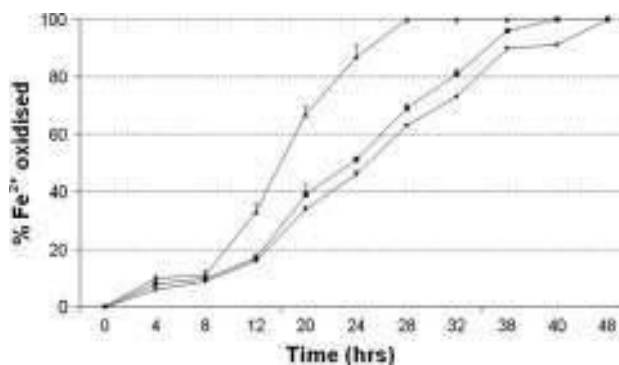
## Results and discussion

### Growth at $40^{\circ}\text{C}$ and in the absence of $\text{K}_2\text{HPO}_4$

As shown in Fig. 1, the lag phase was practically the same for *A. ferrooxidans* LR control ( $30^{\circ}\text{C}$  and presence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) cells and cells submitted to stress ( $40^{\circ}\text{C}$  and absence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). During the log phase, the control cells were able to oxidize the available ferrous iron in 28 h, whereas the cells submitted to heat stress oxidized the ferrous iron in 40 h and cells submitted to phosphate limiting conditions in 48 h. These results indicate that growth was differentially inhibited by heat and phosphate limitation.

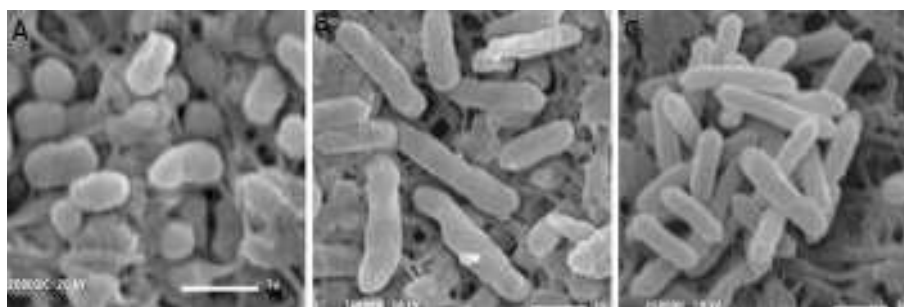
### Morphological changes in *A. ferrooxidans* due to temperature elevation and phosphate starvation

Temperature elevation and phosphate starvation are two environmental factors that affect microbial survival and growth. In order to investigate the effects of these conditions on *A. ferrooxidans* LR cell morphology, the bacteria were grown at  $30^{\circ}\text{C}$  in the presence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (control), at  $40^{\circ}\text{C}$  or in the absence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . After growth, the



**Fig. 1** Growth curves of *A. ferrooxidans* LR at  $40^{\circ}\text{C}$  (squares), without  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in the culture medium (circles) and at control conditions  $-30^{\circ}\text{C}$  and presence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (triangles). The error bars show the standard deviation

**Fig. 2** SEM images of *A. ferrooxidans* LR cells. Bacterial samples were cultured until 50% of oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$ . **a** Control. **b** 40°C. **c** Phosphate starvation. Bar = 1  $\mu\text{m}$ . Magnification: 20,000 (**a**); 15,000 (**b**, **c**)



**Table 1** The mean cell size of *A. ferrooxidans* cells grown under normal conditions (control), at 40°C and under phosphate starvation

|              | Control                  |                         |                          | Temperature (40°C)       |                         |                          | Phosphate starvation     |                         |                          |
|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|              | Length ( $\mu\text{m}$ ) | Width ( $\mu\text{m}$ ) | Area ( $\mu\text{m}^2$ ) | Length ( $\mu\text{m}$ ) | Width ( $\mu\text{m}$ ) | Area ( $\mu\text{m}^2$ ) | Length ( $\mu\text{m}$ ) | Width ( $\mu\text{m}$ ) | Area ( $\mu\text{m}^2$ ) |
| Mean         | 1.05                     | 0.50                    | 0.45                     | 1.90                     | 0.49                    | 0.86                     | 1.77                     | 0.47                    | 0.77                     |
| SD ( $\pm$ ) | 0.20                     | 0.05                    | 0.09                     | 0.36                     | 0.07                    | 0.19                     | 0.24                     | 0.05                    | 0.14                     |

The values represent the means and standard deviations of the measurements obtained from 100 cells in two independent experiments

cells were analysed by SEM (Fig. 2). Table 1 shows the means of the measurements for cellular dimensions from each experiment. The mean cell length and area increased significantly under both heat (40°C) stress ( $F_{\text{length}} = 417.2$ ,  $F_{\text{area}} = 388.9$ , 199 *df*,  $P < 0.01$ ) and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  starvation ( $F_{\text{length}} = 525.6$ ,  $F_{\text{area}} = 343.8$ , 199 *df*,  $P < 0.01$ ). The mean cell width was also significantly altered by  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  starvation ( $F_{\text{width}} = 24.3$ , 199 *df*,  $P < 0.01$ ), but it was not significantly changed during growth at 40°C ( $F_{\text{width}} = 1.7$ , 199 *df*,  $P = 0.1903$ ).

As shown in Table 1, the most affected parameter was the cell length, which increased from 1.05  $\mu\text{m}$  in control cells to 1.9  $\mu\text{m}$  in cells grown at 40°C and 1.77  $\mu\text{m}$  in cells grown in the absence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Elongation is a widespread phenomenon in bacteria exposed to temperatures near their upper limit, and has been reported in a number of microbes, including *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Shi and Xia 2003). In cells undergoing phosphate starvation, however, the morphological changes seem to be species specific, since *Pseudomonas putida* forms small, almost spherical cells (Eberl et al. 1996), while *Vibrio* sp. form filaments (Holmquist and Kjelleberg 1993). In agreement with our work, Seeger and Jerez (1993) showed that *A. ferrooxidans* strain R2 also forms filaments under phosphate starvation conditions. The mechanisms responsible for the elongation that occurs when bacterial cells are subjected to non-optimal temperatures and to phosphate starvation are not clear. According to van der Veen et al. (2010), a possible explanation for bacteria cell elongation is that cell division is blocked due to DNA damage and induction of SOS response.

The morphological alterations observed in *A. ferrooxidans* LR cells grown at 40°C and under phosphate

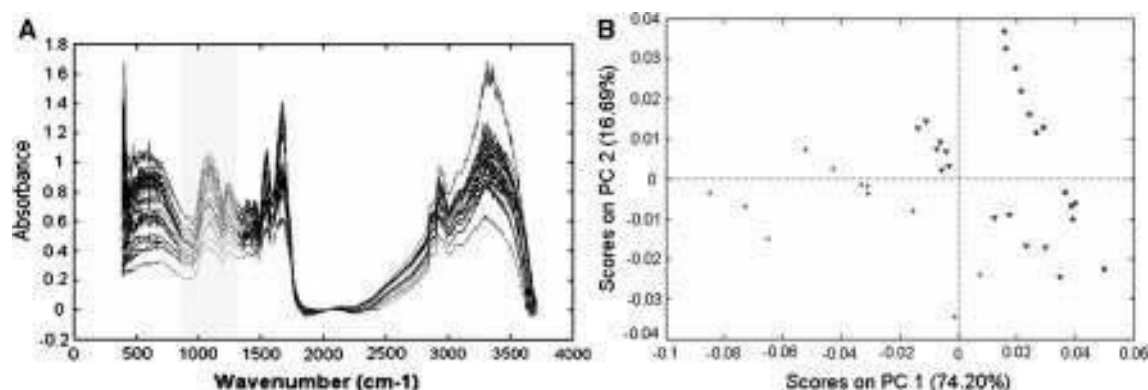
starvation suggest possible alterations in the membrane, as well as in the cell wall. These external components of the bacterial cell are composed mainly of phospholipids and polysaccharides (Yu and Irudayaraj 2004). To investigate whether these compounds were affected by the tested stress conditions, *A. ferrooxidans* LR cells were analysed by FT-IR.

FT-IR analysis of *A. ferrooxidans* cells grown at 40°C and in the absence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

The FT-IR technique was used to evaluate differences among *A. ferrooxidans* LR cells grown under control conditions (30°C with  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), at 40°C and in the absence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Typical FT-IR spectra for *A. ferrooxidans* LR are shown in Fig. 3a. The obtained spectra were analysed using principal component analysis (PCA). In order to investigate qualitative differences between the samples in the principal component (PC) space, PCA was performed on the first-derivative spectra. Several models were developed based on the first derivative of the full spectra. Since none of these models yielded a good separation between the groups, the spectra were divided into different regions, and models were built using the mean-centred first derivative spectra as a data input in the PCA. The region between 850 and 1,275  $\text{cm}^{-1}$ , highlighted in Fig. 3a, presented the best results. Figure 3b shows the scores of a PCA model built by combining all of the samples. In this model, three different groups were observed, showing that the different growth conditions caused distinct differences in the *A. ferrooxidans* LR cells.

Figure 4 shows the mean spectra between 850 and 1,275  $\text{cm}^{-1}$  for control samples and for samples grown





**Fig. 3** FT-IR results. **a** FT-IR spectra of *A. ferrooxidans* cells cultivated under control conditions, 40°C and phosphate starvation. The part of the spectrum used to build the model is highlighted. **b** PC1

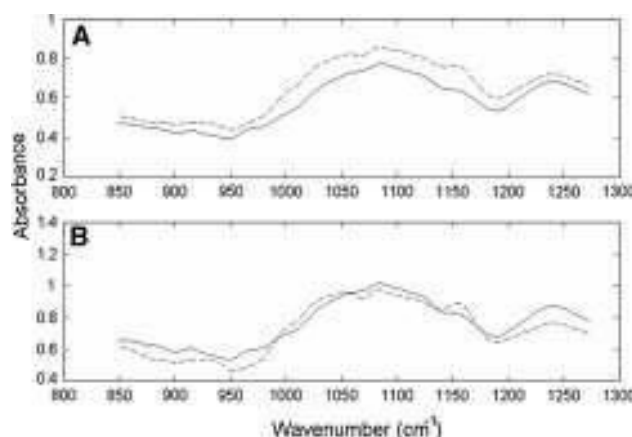
versus PC2 of PCA model built with control samples (circles), samples grown at 40°C (triangles) and samples grown under phosphate starvation (stars)

under the different stress conditions. This region of the spectrum reflects the metabolic fingerprint, which enables the acquisition of sufficient information to elucidate metabolic changes without detailing biochemical pathways, and can indicate whether changes are occurring in response to a particular factor (Chalmers and Griffiths 2002). According to Chalmers and Griffiths (2002), the wavenumbers between 850 and 1,275  $\text{cm}^{-1}$  reflect C–O and C–C stretching and C–O–H and C–O–C deformation of carbohydrates, except for the band between 1,220 and 1,260  $\text{cm}^{-1}$ , which is referred to as  $\text{P}=\text{O}$  stretching of  $\text{PO}_2^-$  from phosphoproteins and phospholipids.

In Fig. 4, it can be observed that *A. ferrooxidans* LR seems to produce a higher amount of carbohydrates at 40°C than at 30°C. Since the carbohydrate region of the FT-IR spectra mainly consists of wavelengths reflected from compounds present near the bacteria cell surface (Yu and Irudayaraj 2004), this result indicates that the higher temperature affects the *A. ferrooxidans* cell wall. In contrast,

when the bacteria were grown in the absence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , a slight decrease in carbohydrates was observed. According to Seeger and Jerez (1993), *A. ferrooxidans* cells under phosphate starvation reduce their capacity to fix  $\text{CO}_2$ . It is possible that under such conditions the bacteria have less carbon to supply their needs, and this could be a possible explanation for the observed decrease in carbohydrates.

As stated above, changes in the 1,220–1,260  $\text{cm}^{-1}$  region correspond to asymmetric stretching vibrations of phosphoproteins and phospholipids. As shown in Fig. 4, *A. ferrooxidans* cells grown at 40°C showed an increase in this region, while cells grown in the absence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  showed a decrease when compared to the control cells. The increase of  $\text{P}=\text{O}$  at 40°C might have occurred due to the effect of temperature on parameters related to cellular membrane structure, including fatty acid biosynthesis and lipid-protein interactions. In *Bacillus megaterium*, Rilfors et al. (1978) demonstrated that, as temperature increases, glycerophospholipids with higher melting points and greater packing densities are incorporated into the membrane. The decrease in  $\text{P}=\text{O}$  in the absence of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  might occur due to low levels of fixed  $\text{CO}_2$ , resulting in lower levels of phosphoenolpyruvate and cyclic AMP, thus keeping most proteins in the dephosphorylated form (Valdes et al. 2008). The results obtained by FT-IR corroborate the morphological alterations observed by SEM.



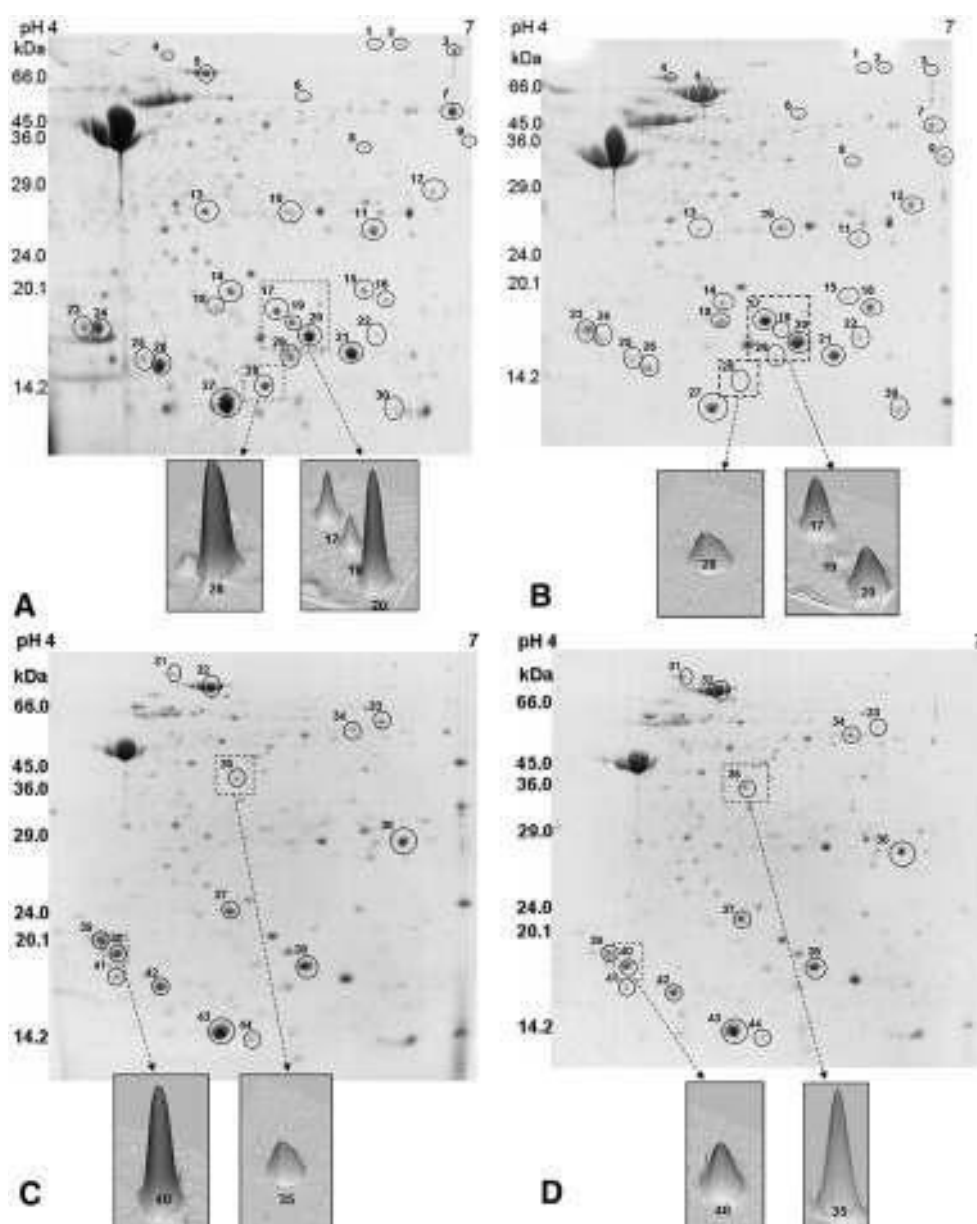
**Fig. 4** The mean spectrum of control samples (solid line) and samples grown at 40°C (a) and under phosphate starvation (b) (dashed line)

#### Proteomic analysis

To detect alterations at the protein level, the protein profile of *A. ferrooxidans* LR was investigated, using 2-DE and mass spectrometry, in cells submitted to heat stress and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  starvation. The gels with a pH range of 4–7 presented the best resolutions and were selected to act as reference maps (Fig. 5a–d). The analytical and biological variances were calculated from protein extracts obtained from three independent bacterial cultures and triplicate



**Fig. 5** The reference gel of *A. ferrooxidans* cells cultivated under different conditions. **a** control of the temperature experiment; **b** 40°C; **c** control of the phosphate starvation experiment; **d** phosphate starvation. Total protein (200 µg) was subjected to 2-DE electrophoresis (11-cm IPG strips with pH range 4–7; 15% SDS–PAGE). Proteins were visualised by Coomassie Brilliant Blue staining. Circles represent differential proteins with at least twofold expression. The enlarged areas show the relative volumes in a three-dimensional representation



2-DE gels. For protein comparison, gel images of each treatment were calibrated with the correspondent control gel image using the Image Master 2D Platinum software. Spots showing at least a twofold change in their expression level were considered for analysis, resulting in 44 differentially expressed proteins on the tested stress conditions.

#### Differentially expressed proteins in *A. ferrooxidans* cells submitted to heat stress

Thirty protein spots were significantly changed by a temperature shift from 30 to 40°C. Under these conditions, 12 proteins were upregulated and 18 were downregulated (Table 2; Fig. 5a, b).

#### Upregulated proteins

The upregulated proteins belong to the energy metabolism and protein fate categories, and includes a subunit of the enzyme NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1; spot 1), which catalyses electrons transfer in the NADH-quinone oxidoreductase complex in a proton pump associated reaction. In bacteria this complex usually includes 14 subunits. In *A. ferrooxidans*, this biochemical pathway is important, since this bacterium gains energy by a reverse electron flow from Fe(II) to NADH (Valdes et al. 2008). The expression of NDH-1 was 2.8 fold-higher at 40°C, suggesting that proton translocation across the membrane raised during heat stress.

**Table 2** Proteins regulated by heat stress in *A. ferrooxidans* LR cells

| Spot number | Protein                                       | ID (JCVI) | Functional category <sup>a</sup> | Theoretical MW (kDa)/pI | Matched peptides | Total ion score | Expression | Fold changes <sup>b</sup> (P value) |
|-------------|-----------------------------------------------|-----------|----------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------|------------|-------------------------------------|
| 1           | NADH-quinone oxidoreductase, G subunit        | AFE_0480  | EM                               | 83.9/6.3                | 14               | 89              | Up         | 2.8 (0.006763)                      |
| 2           | TonB-dependent receptor                       | AFE_1054  | TBP                              | 85.2/6.53               | 11               | 100             | Down       | 4.5 (0.000289)                      |
| 3           | DNA ligase, NAD-dependent (ligA)              | AFE_2283  | DM                               | 74.4/6.9                | 15               | 66              | Down       | 3.5 (0.02)                          |
| 4           | ATP-dependent Clp protease- subunit (ClpA)    | AFE_2518  | PF                               | 79.4/4.4                | 5                | 75              | Up         | 8.6 (0.000263)                      |
| 5           | Chaperone protein DnaK                        | AFE_0440  | PF                               | 68.3/5.0                | 25               | 245             | Up         | 5.4 (0.000603)                      |
| 6           | Chaperonin, 60 kDa (GroEL)                    | AFE_2496  | PF                               | 58.7/5.4                | 22               | 248             | Up         | 2.9 (0.003833)                      |
| 7           | Pyruvate kinase barrel domain protein         | AFE_2290  | U                                | 63.4/6.9                | 16               | 33              | Down       | 3 (8.185E−07)                       |
| 8           | Type I secretion outer membrane protein, TolC | AFE_2463  | PF                               | 48.0/6.4                | 4                | 116             | Up         | 2.1 (0.001984)                      |
| 9           | Serine protease, DO/DeqQ family               | AFE_1685  | PF                               | 49.7/7.0                | 8                | 166             | Up         | 2.9 (9.74E−05)                      |
| 10          | Fructose -1-6-bisphosphatase                  | AFE_2837  | EM                               | 37.3/5.5                | 11               | 217             | Up         | 3.8 (0.001046)                      |
| 11          | Carboxymethyleneutanolidase                   | AFE_0887  | CP                               | 26.4/6.22               | 10               | 70              | Down       | 4.7 (0.000755)                      |
| 12          | Phosphoglycerate kinase pgk                   | AFE_3083  | EM                               | 42.1/6.45               | 15               | 199             | Up         | 3.1 (0.002303)                      |
| 13          | Mrp protein                                   | AFE_0444  | U                                | 38.2/5.07               | 4                | 91              | Down       | 3.0 (0.0092623)                     |
| 14          | Translation elongation factor P (efp)         | AFE_2190  | PS                               | 20.8/4.98               | 3                | 70              | Down       | 2.0 (0.022795)                      |
| 15          | Ribose 5-phosphate isomerase A (rpiA)         | AFE_2410  | EM                               | 23.3/6.25               | 8                | 324             | Down       | 2.3 (0.000239)                      |
| 16          | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (ppiB)  | AFE_1106  | PF                               | 18.4/6.95               | 3                | 209             | Up         | 4.7 (1.348E−06)                     |
| 17          | Heat shock protein, Hsp20 family              | AFE_1437  | PF                               | 16.7/5.43               | 9                | 155             | Up         | 4.4 (0.000103)                      |
| 18          | Co-chaperone GrpE                             | AFE_0439  | PF                               | 18.9/4.12               | 7                | 84              | Up         | 3.8 (0.002834)                      |
| 19          | FeS cluster assembly scaffold protein IscU    | AFE_2366  | BC                               | 15.2/5.33               | 4                | 59              | Down       | 3.8 (2.132E−06)                     |
| 20          | Ribulose biphosphate carboxylase, rubisco     | AFE_1395  | EM                               | 13.9/5.9                | 5                | 250             | Down       | 2.0 (5.232E−05)                     |
| 21          | Ribulose bisphosphate cbbS1                   | AFE_0058  | EM                               | 12.6/6.41               | 5                | 70              | Down       | 2.0 (0.000239)                      |
| 22          | Glycine cleavage system H protein             | AFE_2067  | EM                               | 13.6/5.29               | 4                | 120             | Up         | 2.5 (0.000772)                      |
| 23          | ACT domain protein                            | AFE_2600  | U                                | 18.4/4.29               | 5                | 220             | Down       | 2.3 (0.000407)                      |
| 24          | Transcription elongation factor GreA (greA)   | AFE_2401  | T                                | 17.4/4.20               | 4                | 87              | Down       | 2.5 (0.0007724)                     |
| 25          | Ferredoxin                                    | AFE_2063  | EM                               | 13.6/4.11               | 4                | 159             | Down       | 2.6 (0.000263)                      |
| 26          | Thioredoxin                                   | AFE_1113  | EM                               | 12.7/4.25               | 5                | 164             | Down       | 6.5 (1.770E−05)                     |
| 27          | Ccarboxysome shell peptide                    | AFE_1400  | CP                               | 9.9/5.23                | 6                | 273             | Down       | 4.8 (1.215E−07)                     |
| 28          | Carboxysome shell peptide                     | AFE_1402  | CP                               | 11.4/5.2                | 10               | 188             | Down       | 3.2 (1.668E−07)                     |
| 29          | Thioredoxin (trx)                             | AFE_2383  | EM                               | 12.1/5.59               | 5                | 290             | Down       | 3.0 (0.002663)                      |
| 30          | Conserved hypothetical protein                | AFE_2669  | U                                | 9.4/6.86                | 4                | 90              | Down       | 2.5 (0.000610)                      |

<sup>a</sup> BC biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers, CP cellular process, DM DNA metabolism, EM energy metabolism, PF protein fate, PS protein synthesis, T transcription, TBP transport and binding proteins, U unknown function and enzymes of unknown specificity

<sup>b</sup> Fold changes of expression levels of differential proteins after heat stress (40°C)

The overexpression of proteins involved in energy metabolism (spots 10, 12 and 22) could have occurred due to the necessity to generate ATP for the synthesis of proteins that can deal with heat stress, such as the heat shock proteins (HSPs).

Most of the overexpressed proteins from the protein fate category were HSPs and molecular chaperones (Table 2). Heat shock proteins expression is induced when bacteria

are exposed to several stress conditions, such as heating, starvation, presence of toxic elements like heavy metals, for example, and others. Jerez (1988) showed that DnaK and GroEL are part of the *A. ferrooxidans* response to heat shock. Seeger et al. (1996) demonstrated that these proteins are induced and have their level of phosphorylation increased when *A. ferrooxidans* cells are exposed to several stress conditions, suggesting that these chaperones could be

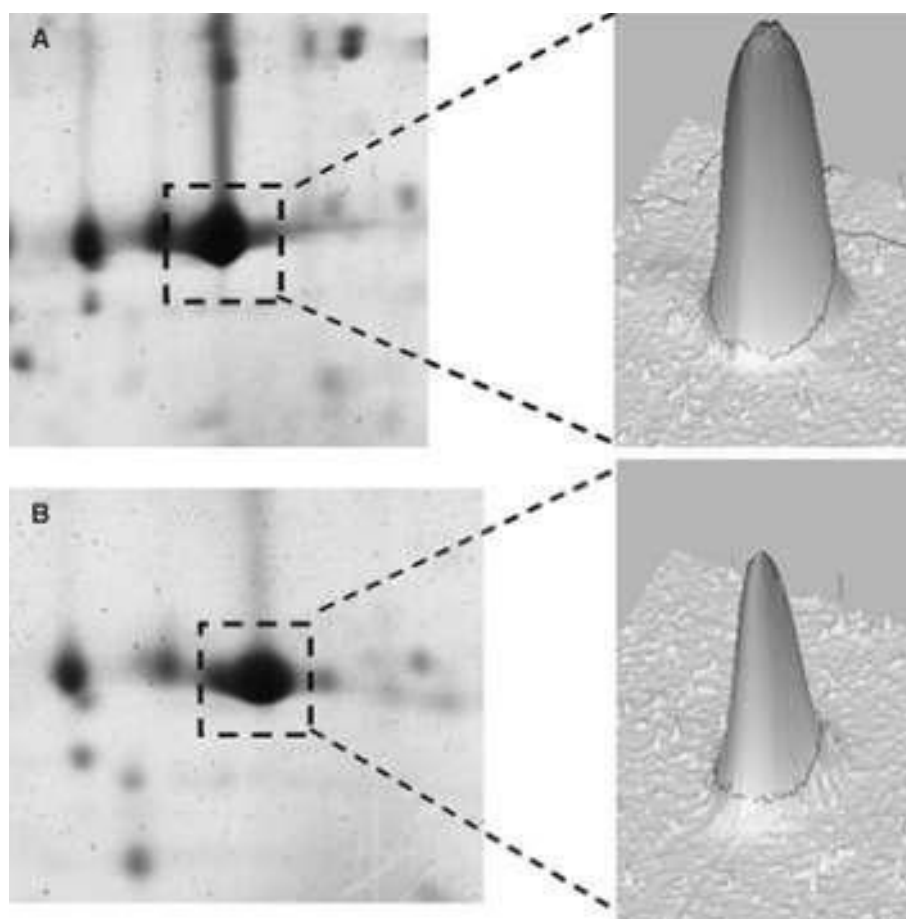
considered a “stress sensor”. In this work, the molecular chaperones DnaK and GroEL, and the co-chaperone GrpE (spots 5, 6 and 18) showed an expression 5.4, 2.9 and 3.8 fold-higher at 40°C, respectively. Also, a small heat shock protein from the HSP 20 family (spot 17) had its expression increased 4.4 fold at 40°C. According to Kitagawa et al. (2000), bacterial survival is enhanced by the overexpression of sHSPs, probably due to a reduction in protein aggregation. In extremophiles, such as *A. ferrooxidans*, the sHSPs are particularly important to assist the protein repertoire to maintain their proper fold and structure under the harsh conditions faced by these microorganisms (Laksanalamai and Robb, 2004).

The chaperone subunit ClpA (spot 4) was also induced (8.6 fold) by heating. ClpA can interact with the protease subunit ClpP, resulting in an ATP-dependent protease complex. ATP-dependent proteases are responsible for the selective degradation of several cellular proteins, influencing protein quality control and regulation of many cellular processes. Another proteolytic enzyme that showed an increased expression under heat was the serine protease from the DO/DeqQ family (spot 9; 2.9 fold). Proteins from

this family are located in the periplasm, and have both protease and chaperone functions, however, apparently, the chaperone function is dominant at low temperatures and the proteolytic activity is turned on at elevated temperatures (Kim et al. 2003).

Spot 8 was identified as a type I secretion outer membrane protein, TolC, which transports large proteins and smaller toxic compounds from inside to outside the cell. Changes in the environment induce variations in the membrane fluidity, leading to changes in the membrane's structural and dynamic characteristics, affecting the membrane proteins functions (Beney and Gervais 2001). Spot 16 was identified as the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (PPIB). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (PPIases) have been shown to facilitate the cis-trans isomerization of proline residues both in vitro and in vivo, and can contribute to the correct folding of damaged and newly synthesised proteins (Hesterkamp et al. 1996). The expression of spots 8 and 16 was 2.1 and 4.7 fold-higher in the stress condition. This expression increase was expected due to the importance of these proteins in the cellular response to stress.

**Fig. 6** Segment of the 2D gel map of pH range 3–10 showing the spot of the downregulated protein rusticyanin. The *enlarged* area shows the relative volumes in a three-dimensional representation. **a** Control and **b** 40°C



**Table 3** Proteins regulated by K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> starvation in *A. ferrooxidans* LR cells

| Spot number | Protein                                              | ID (JCVI) | Functional category <sup>a</sup> | Theoretical MW (kDa)/pI | Matched peptides | Total ion score | Expression | Fold changes <sup>b</sup> (P value) |
|-------------|------------------------------------------------------|-----------|----------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------|------------|-------------------------------------|
| 31          | ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpA | AFE_2518  | PF                               | 79.4/4.4                | 5                | 75              | Up         | 3.0 (0.002657)                      |
| 32          | Chaperone protein DnaK                               | AFE_0440  | PF                               | 68.3/5.0                | 25               | 245             | Up         | 2.1 (0.000279)                      |
| 33          | Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein          | AFE_1343  | EM                               | 52.7/6.75               | 11               | 68              | Down       | 6.8 (0.002809)                      |
| 34          | ATP synthase F1, alpha subunit (atpA)                | AFE_3127  | EM                               | 55.7/6.28               | 12               | 101             | Up         | 2.0 (0.002017)                      |
| 35          | Survival protein SurA (surA)                         | AFE_0075  | PF                               | 48.1/5.28               | 3                | 83              | Up         | 3.2 (0.000144)                      |
| 36          | Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (fabD) | AFE_1180  | FPM                              | 33.6/6.42               | 1                | 37              | Down       | 2.4 (1.91E−05)                      |
| 37          | Translation elongation factor P (efp)                | AFE_2190  | PS                               | 20.8/4.98               | 3                | 70              | Down       | 2.1 (0.004346)                      |
| 38          | Ribulose biphosphate carboxylase, rubisco            | AFE_1395  | EM                               | 13.9/5.9                | 5                | 250             | Down       | 2.8 (0.006388)                      |
| 39          | ACT domain protein                                   | AFE_2600  | U                                | 18.4/4.29               | 5                | 220             | Down       | 2.8 (0.008397)                      |
| 40          | Transcription elongation factor GreA (greA)          | AFE_2401  | T                                | 17.4/4.20               | 4                | 87              | Down       | 2.2 (0.00632)                       |
| 41          | Ribosomal protein L7-L12 (rplL)                      | AFE_2147  | PS                               | 12.8/4.28               | 5                | 31              | Down       | 2.3 (0.018389)                      |
| 42          | FeS cluster assembly scaffold protein IscU           | AFE_2366  | BC                               | 15.2/4.23               | 4                | 59              | Down       | 2.0 (0.004833)                      |
| 43          | Carboxysome shell peptide                            | AFE_1400  | CP                               | 9.9/5.23                | 6                | 273             | Down       | 2.3 (1.77E−07)                      |
| 44          | RNA chaperone Hfq                                    | AFE_1202  | RF                               | 9.8/5.23                | 8                | 87              | Down       | 2.6 (0.005433)                      |

<sup>a</sup> BC biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers, CP cellular process, EM energy metabolism, FPM fatty acid and phospholipid metabolism, PF protein fate, PS protein synthesis, RF regulatory functions, T transcription, U unknown function and enzymes of unknown specificity

<sup>b</sup> Fold changes of expression levels of differential proteins after phosphate starvation stress

### Downregulated proteins

The expressions of the translation elongation factor P (EFP; spot 14) and the transcription elongation factor GreA (spot 24) were 2.0 and 2.5 fold smaller at 40°C, respectively. This result suggests a decrease in the metabolic rate of the stressed cells, which can be a strategy that enables the bacteria to survive under stress. According to van der Veen et al. (2010), EFP is important for the *Listeria monocytogenes* growth at high temperatures. These authors demonstrated that a mutant *efp* gene insertion into *L. monocytogenes* resulted in reduced growth and cell length, indicating that the *efp*-encoded protein may affect bacterial growth and length. EFP affects the peptidyltransferase activity of ribosomes and is universally conserved in bacteria (Kyrpides and Woese 1998). This protein was found to be essential for *E. coli* viability (Aoki et al. 1997).

The small subunits of the proteins ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco; spots 20 and 21) and the carboxysome shell peptides (spots 27 and 28) had their expression reduced at 40°C. These proteins are involved in CO<sub>2</sub> fixation, and the decreased expression of these proteins at 40°C suggests that the ability of *A. ferrooxidans* to fix CO<sub>2</sub> may be affected by this stress condition, as previously observed by Seeger and Jerez (1993). Since carbon dioxide

serves as the sole source of carbon for a diverse array of obligate chemolithoautotroph bacteria, alterations in carbon metabolism are expected to be related to CO<sub>2</sub> fixation.

Two thioredoxins presented a decreased expression (spot 26; 6.5 fold and spot 29; 3.0 fold) at 40°C. Thioredoxin, an important protein from energy metabolism, is commonly found in bacteria exposed to oxidative stress (Wang et al. 2009). The decreased expression of this protein suggests that the heat stress did not lead to an oxidative stress in the *A. ferrooxidans* LR cells.

Gels with a pH range of 3–10 were also included in this work. From these gels it was noticed that the synthesis of the protein rusticyanin was reduced (4.3 fold—data not shown) at 40°C (Fig. 6). Rusticyanin is the most abundant protein in *A. ferrooxidans* iron-grown cells (Cox and Boxer 1978), and this protein low expression is correlated with low iron availability. Indeed, Yarzabal et al. (2003) demonstrated a correlation between iron oxidation and the expression of rusticyanin, and Carlos et al. (2008) showed a decreased expression of *rus* (rusticyanin-encoding gene) when *A. ferrooxidans* was maintained in contact with chalcophyrite. Therefore, we can suggest that high temperatures may interfere with the capability of the bacterium to use iron as the energy source. The down-regulation of the predicted iron-sulfur cluster scaffold protein (spot 19; 3.8



fold) suggests a decrease in the capacity of the cells to acquire iron from the medium, suggesting that the stress is interfering with the energy metabolism. Also, the synthesis of the iron-sulfur protein ferredoxin (spot 25; 2.6 fold) and the TonB-dependent receptor (spot 2; 4.5 fold) showed a decrease in *A. ferrooxidans* cells grown at 40°C. These results suggest that growth at 40°C could have affected the iron metabolism in *A. ferrooxidans* LR.

Differentially expressed proteins in *A. ferrooxidans* cells submitted to phosphate starvation

Fourteen proteins had their expression changed in the absence of  $K_2HPO_4$  (Table 3; Fig. 5c, d). Among the proteins whose synthesis increased were the molecular chaperone DnaK (spot 31; 3.0 fold) and the chaperone subunit ClpA (spot 32; 2.6 fold), suggesting that the absence of  $K_2HPO_4$  in the medium activates a stress response in *A. ferrooxidans*, despite the bacteria capability to accumulate polyphosphate granules in high amounts (Alvarez and Jerez 2004). This is emphasized by the increased synthesis of the survival protein SurA (spot 35; 4.6 fold). In *E. coli*, SurA is a periplasmic protein required for the proper assembly of several outer membrane proteins (Lazar and Kolter 1996). This result may also indicate that phosphate starvation damages the outer membrane proteins. In fact, outer membrane proteins have previously been found to change due to phosphate starvation (Jerez et al. 1992, Seeger and Jerez 1993) or alterations in other growth conditions, such as pH (Amaro et al. 1991).

The translation elongation factor P (spot 37; 2.1 fold), the transcription elongation factor GreA (spot 40; 2.2 fold) and the ribosomal protein L7-L12 (spot 41; 2.3) had their synthesis decreased in the absence of  $K_2HPO_4$ . This result may be attributed to a decrease in the metabolic rate of the cells submitted to this stress. A metabolic rate decrease was also observed for cell submitted to heat stress. The proteins Rubisco (spot 38; 2.8 fold) and carboxysome shell peptide (spot 43, 2.3 fold) also had their synthesis decreased indicating that the carbon metabolism was also affected by phosphate starvation.

**Acknowledgments** This work was supported by grant 02/07642-3 from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). DAR received a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). LMMO received a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

Alvarez S, Jerez CA (2004) Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl Environ Microbiol 70:5177–5182

- Amaro AM, Chamorro D, Seeger M, Arredondo R, Peirano I, Jerez CA (1991) Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. J Bacteriol 173:910–915
- Aoki H, Dekany K, Adams SL, Ganoza MC (1997) The gene encoding the elongation factor P protein is essential for viability and is required for protein synthesis. J Biol Chem 272:32254–32259
- Beney L, Gervais P (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. Appl Microbiol Biotechnol 57:34–42
- Carlos C, Reis FC, Vicentini R, Madureira DJ, Ottoboni LMM (2008) The *rus* operon genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. Curr Microbiol 57:375–380
- Chalmers JM, Griffiths PR (2002) Handbook of vibrational spectroscopy, vol 5. Wiley, Chichester
- Cox JC, Boxer DH (1978) The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron (II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. Biochem J 174:497–502
- Eberl L, Givskov M, Sternberg C, Morller S, Christiansen G, Molin S (1996) Physiological responses of *Pseudomonas putida* KT2442 to phosphate starvation. Microbiol 142:51–63
- Farah C, Vera M, Morin D, Haras D, Jerez CA, Guiliani N (2005) Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl Environ Microbiol 71:7033–7040
- Garcia O Jr (1991) Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. Braz J Microbiol 20:1–6
- Hestekamp T, Hauser S, Lutcke H, Bukau B (1996) *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. Proc Natl Acad Sci 93:4437–4441
- Holmquist L, Kjelleberg S (1993) Changes in viability, respiratory activity and morphology of the marine *Vibrio* sp. strain S14 during starvation of individual nutrients and subsequent recovery. FEMS Microbiol Ecol 12:215–224
- Hubert WA, Leduc LG, Ferroni GD (1995) Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. Curr Microbiol 31:10–14
- Jerez CA (1988) The heat shock response in meso- and thermoacidophilic chemolithotrophic bacteria. FEMS Microbiol Lett 56:289–294
- Jerez CA, Seeger M, Amaro AM (1992) Phosphate starvation affects the synthesis of outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol Lett 98:29–34
- Kim DY, Kim DR, Ha SC, Lokanath NK, Lee CJ, Hwang HY, Kim KK (2003) Crystal structure of the protease domain of a heat-shock protein HtrA from *Thermotoga maritima*. J Biol Chem 278:6543–6551
- Kitagawa M, Matsumura Y, Tsuchido T (2000) Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 184:165–171
- Knegt FHP, Mello LV, Reis FC, Santos MT, Vicentini R, Ferraz FC, Ottoboni LMM (2008) *ribB* and *ribBA* genes from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: expression levels under different growth conditions and phylogenetic analysis. Res Microbiol 159:423–431
- Kyrpides NC, Woese CR (1998) Universally conserved translation initiation factors. Proc Natl Acad Sci USA 95:224–228
- Laksanalamai P, Robb FT (2004) Small heat shock proteins from extremophiles: a review. Extremophiles 8:1–11
- Lazar S, Kolter R (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. J Bacteriol 178:1770–1773

- Modak JM, Natarajan KA, Mukhopadhyay S (1996) Development of temperature-tolerant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* to improve bioleaching kinetics. *Hydrometallurgy* 42:51–61
- Pianetti A, Battistelli M, Citterio B, Parlani C, Falcieri E, Bruscolini F (2009) Morphological changes of *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. *Micron* 40:426–433
- Rawlings DE (2005) Characteristics and adaptability of iron and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb Cell Fact* 4:1–15
- Rilfors L, Wieslander A, Stahl S (1978) Lipid and protein composition of membranes of *Bacillus megaterium* variants in the temperature range of 5 to 70 degrees C. *J Bacteriol* 135: 1043–1052
- Seeger M, Jerez CA (1993) Responses of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. *FEMS Microbiol Rev* 11:37–42
- Seeger M, Osorio G, Jerez CA (1996) Phosphorylation of GroEL, DnaK and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiol Lett* 138:129–134
- Shi B, Xia X (2003) Morphological changes of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in response to temperature selection. *Curr Microbiol* 46:120–123
- Smolka MB, Martins D, Winck FV, Santoro CE, Castellari RR, Ferrari F et al (2003) Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics* 3: 224–237
- Tuovinen OH, Kelly DP (1972) Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ores. *Z Allg Mikrobiol* 12:311–346
- Valdes J, Pedrosa I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, Blake R II, Eisen JA, Holmes DS (2008) *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9:597–621
- van der Veen S, van Schalkwijk S, Molenaar D, De vos W, Abee T, Wells-Bennik MHJ (2010) The SOS response of *Listeria monocytogenes* is involved in stress resistance and mutagenesis. *Microbiol* 156:374–384
- Vasconcelos AR, Nogueira FCS, Abreu EFM, Gonçalves EFP, Souza AS, Campos FAP (2005) Protein extraction from cowpea tissues for 2D electrophoresis and MS analysis. *Chromatographia* 62:447–450
- Wang Y, Zhang X, Liu Q, Ai C, Mo H, Zeng J (2009) Expression, purification and molecular structure modeling of thioredoxin (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR) from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr Microbiol* 59:35–41
- Xiao S, Chao J, Wang W, Fang F, Qiu G, Liu X (2009) Real-time PCR analysis of the heat-shock response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Folia Biol* 55:1–6
- Yarzabal A, Duquesne K, Bonnefoy V (2003) Rusticyanin gene expression of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 in sulfur- and in ferrous iron media. *Hydrometallurgy* 71:107–114
- Yu C, Irudayaraj J (2004) Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers* 77:368–377

**CAPÍTULO 5 - Artigo: Modulação da expressão gênica por estresse térmico em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR** (*Gene expression modulation by heat stress in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR*)

## Introdução

*Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria Gram-negativa, mesofílica e quimiolitotrófica que obtém energia através da oxidação de íons ferrosos e compostos reduzidos de enxofre (Kelly and Wood, 2000). Esta bactéria exerce uma importante contribuição no ciclo biogeoquímico da natureza e pode ajudar na recuperação de áreas contaminadas com metais devido à sua habilidade em oxidar e reduzir metais. *A. ferrooxidans* é largamente empregada na biolixiviação de metais, um processo usado para recuperação de metais, em que os sulfetos metálicos são convertidos em sulfatos metálicos solúveis. Este micro-organismo é também usado em outros processos economicamente importantes como o pré-tratamento de minérios de ouro e desulfurização de carvão (Hutchins et al. 1986), e remoção de metais de efluentes (Tyagi et al. 1996).

Durante a biolixiviação, *A. ferrooxidans* é exposta a alterações nas condições ideais de crescimento como pH, temperatura e privação de nutrientes (Rawlings, 2005). No que diz respeito ao estresse térmico, Hubert et al. (1995) demonstraram que a linhagem A1 de *A. ferrooxidans* adquiriu termotolerância e, Jerez (1998) demonstrou que mudanças no perfil de proteínas ocorreram após crescimento em altas temperaturas. Mais recentemente, Xiao et al. (2009) mostraram que alguns genes de choque térmico eram induzidos quando *A. ferrooxidans* ATCC foi submetida a um choque térmico.

A resposta ao choque térmico é caracterizada por um aumento na síntese das proteínas de choque térmico (HSP), que atuam como chaperonas moleculares ou proteases, e também, por uma diminuição na síntese de outras proteínas (Lindquist 1986). A síntese de HSPs, em *Escherichia coli*, é transcricionalmente regulada por sigma 32 ( $\sigma^{32}$ ), que é codificada pelo gene *rpoH* (Yamamori e Yura, 1980). Sob condições normais de crescimento,  $\sigma^{32}$  é muito instável, mas aumenta sua meia-vida na presença de um estresse térmico (Straus et al. 1987). Além disso, em *E. coli*,  $\sigma^{32}$  tem sua



atividade, estabilidade e síntese controlada por *feedback* (Nonaka et al. 2006). Os membros do regulon  $\sigma^{32}$  medeiam esses loops de *feedback* ou seja, FtsH, uma metaloprotease dependentes de ATP associada à membrana interna, controla a estabilidade e as chaperonas DnaK / DnaJ e GroEL / GroES controlam a atividade do fator sigma 32 (Yura, 1996).

Neste estudo, a expressão relativa de vários genes de *A. ferrooxidans* LR foi analisada mediante um aumento na temperatura ótima de crescimento e a um choque térmico. Ferramentas de bioinformática foram usadas para predizer sítios de ligação do fator  $\sigma^{32}$  na região promotora destes genes.

## **Materiais e métodos**

### *Linhagem bacteriana e condições de crescimento*

A linhagem brasileira denominada LR de *A. ferrooxidans* (Garcia Jr e Silva, 1991) foi cultivada em 250 rpm em meio T&K (Tuovinen e Kelly, 1972), contendo 0,4 g/L  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0,4 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,4 g/L  $(NH_4)_2SO_4$  e 33,4 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH 1,8, ajustado com ácido sulfúrico. As bactérias foram cultivadas até 50% de oxidação do íon ferroso. Para o experimento de crescimento até a fase logarítmica, as células foram cultivadas a 30°C (controle) e 40°C. Estas células foram coletadas por filtração em membrana Millipore (0,45 mm) e lavadas com água ácida para eliminar precipitações de ferro. Para os experimentos de choque térmico, as células foram cultivadas a 30°C e coletadas nas mesmas condições mencionadas acima. Posteriormente, elas foram mantidos a 40°C durante os seguintes intervalos de tempo: 15, 30 e 60 min e coletadas novamente por filtração em membrana Millipore (0,45 m).

## *Isolamento do RNA*

O RNA total foi isolado a partir de três culturas independente de *A. ferrooxidans*, de acordo com Paulino et al. (2002). As células foram suspensas em uma solução contendo EDTA 1 mM, 100 mM de LiCl e 100 mM de Tris-HCl, pH 7,5. A fração de RNA foi extraído com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1, v/v/v) contendo 10% (w/v) de SDS, precipitado a -20°C, com 2% (w/v) de acetato de potássio pH 5,5 e 100% (v/v) de etanol. O RNA foi ressuspendido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA foi tratado com DNase (Invitrogen) por 1 hora a 37°C e armazenado a -70°C.

## *PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)*

A expressão relativa dos genes listados na Tabela 1 foi determinada por qRT-PCR (Carlos et al. 2008). Os cDNAs foram sintetizados com o kit *ThermoScript RT-PCR system* (Invitrogen). O gene *alaS* foi utilizado como controle endógeno (Yarzabal et al. 2004). Os *primers* utilizados nos experimentos (Tabela 1) foram projetados com o software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3www.cgi>), utilizando toda a região codificante dos genes selecionados do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (J. Craig Venter Institute - JCVI, <http://cmr.jcvi.org>). A especificidade de cada *primer* foi confirmada por PCR utilizando o DNA genômico de *A. ferrooxidans* LR.

Os experimentos de qRT-PCR foram realizadas em triplicata em um 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems) e os números de ciclo *threshold* (Ct) foram determinados usando o programa *Real Time System RQ Study* v. 1.3.1 (Applied Biosystems). As reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicata, utilizando o kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). Após os ciclos de PCR, uma análise da curva de dissociação foi realizada para garantir

a especificidade de cada amplificação, bem como a ausência de dímeros de *primer* e amplificações inespecíficas. A expressão gênica relativa foi calculada de acordo com o método comparativo do limiar crítico ( $\Delta\Delta TC$ ), descrito por Livak e Schmittgen (2001). A significância estatística para os dados de qRT-PCR foi feita utilizando o teste *t* de *Student* (valor- $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 1.**Primers usados nos experimentos de PCR.

| Gene     | Forward primer         | Reverse primer        | Tamanho do Amplicon (pb) |
|----------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| AFE_0439 | GGAAACCTACCGCAACGAT    | CGCATAATTACGGGCATCTT  | 97                       |
| AFE_0440 | CTGGCAGATTCCCTCAAAGC   | CAACTCGATCTTCGCCTTCT  | 85                       |
| AFE_0441 | GTCAGGTCCGGATGGTACAG   | CTTGATGACCTTGCCGCTAC  | 80                       |
| AFE_2495 | CCATGGCAAAATTCTCGAAG   | GCATATTTGGCGAAGAGCAC  | 81                       |
| AFE_2496 | TAGGTACCATCTCCGCCAAC   | TTCTTCCACGGTGATGACG   | 98                       |
| AFE_2517 | GGTCATGGGTAGAACGCAAC   | CCATGGGAGTGAAATCATCA  | 111                      |
| AFE_2518 | GCTACTGCGTTTCGACATGA   | GATCATGCCCCGACATATCCT | 96                       |
| AFE_1122 | GGCCTGAAAGAACGCTATGA   | TCGGTGATATAGCGGTGTGA  | 92                       |
| AFE_2133 | GACAAGATCACCCGCAAGTC   | ACCGTCCCTTCAATCAGCTT  | 102                      |
| AFE_2134 | TTACTCCCGTCTGCTCAAGG   | CGCCTCCAGAAAAAGCAACT  | 98                       |
| AFE_1395 | GATCGCCTATCTCGTGAACC   | GGGCAGTTTCCACATGTACC  | 97                       |
| AFE_0003 | CATCCAGTCCGCAAGTAACA   | AACTACCACTCCACCGTTGC  | 91                       |
| AFE_3047 | TGTACTCTCCGCCCTCCA     | ACGGGTGAACTTGTCTTCA   | 118                      |
| AFE_3048 | GAAATATCCCCAGTCCATCG   | CGAACATGCTGAAATTGGTG  | 107                      |
| AFE_2891 | ATCGAGGTGAATACGGCATC   | GATGCTGATGCGGTTGAAG   | 95                       |
| AFE_1217 | ACGCAAGGATCAGAATACGC   | CGCCACTGGACATCTTGTAG  | 101                      |
| AFE_3203 | TTTTTCAAGCACGATTTTCGAT | CAGAACACCTATGCGGAACA  | 120                      |
| AFE_0123 | GGGCAGCGTCTTCAGTTTAC   | CCAGTCCGCTTTCAACATTT  | 84                       |
| AFE_0125 | TGATGGTCAGGACGTCAGAG   | TGTCGACCATAACGCACATT  | 120                      |
| AFE_0990 | GGTGTTATTGTTGGCGCTCT   | GTGAAATTGGGAGCGTCTGT  | 91                       |
| AFE_0993 | TGATTCAAAAAGGCCAGCTT   | TTGTTGCTGAGCGATTTTAC  | 104                      |
| AFE_0112 | GGTCATCGCTTATGCCAGTT   | TCAGGTCCAGGAGCAAGAGT  | 102                      |
| AFE_0173 | GCGTAAAGGTAGGCTGGTCA   | TCAGGTTGTTTCATGGGGATT | 90                       |
| AFE_0174 | GCATCTGGTTCGTCGGTATT   | AGTGGCCTTCTCGAAACTCA  | 102                      |
| AFE_0796 | AACGCCAATCTCAAGCTCTC   | GGAGGGCACATAAGGGGTAT  | 102                      |
| AFE_0800 | CCTATGTCTGGCTCCAGCTAC  | GCGCTGAATTTGAGGCTATC  | 100                      |
| AFE_0806 | GGCGGATGGACACTTAAAAA   | CTCTGCCGCTTCTGGATTAT  | 105                      |
| AFE_0810 | ATCATTTGTCGAACCGGCTAA  | CTACCAATCAGACGGGCATT  | 95                       |
| AFE_1054 | GTCCAATCCGAAGAACCTC    | CACGTCCACGTCATTGTAGG  | 104                      |
| AFE_1592 | GTGACTCCATCCAGCCCATT   | TATTTCTCCGCTATTGATGAC | 96                       |
| AFE_1601 | CGGCAGAAATTCCAGGATTA   | TGGCTGTAGAAGGGCTTGAT  | 92                       |
| AFE_0169 | CAGCCTTGGGATAAAAAACGA  | CGCGCATCAAAGAGATTGTA  | 96                       |
| AFE_2277 | GCTTCAGGACGCACATTACA   | CCACACCCGCAAGATAAGTT  | 104                      |
| AFE_3103 | ATGAACTCGGGATGCGTTAC   | ATTGGTGTTTCGTGAGGAAGG | 95                       |

|           |                      |                      |     |
|-----------|----------------------|----------------------|-----|
| AFE_2747  | TGGTGTGTACTGCCTGTGGT | GGCTGTGGTCGCTGATAAAG | 108 |
| AFE_2238  | CGGATATTTGCGCTGAACTT | TGGCAAAGGGGAACTCATAC | 105 |
| AlaS13/S3 | GTGCCTTTCCCGAACTCACG | TCCTCCAGCAGACTGAGTCC | 108 |

---

### *Análises de Bioinformática*

O software BPROM (Softberry, Inc.) foi utilizado para predizer o sítio de início da transcrição dos genes selecionados neste estudo. BPROM é um programa que reconhece a região promotora dos genes alvo da RNA polimerase com o fator sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ), com cerca de 80% de precisão e especificidade. Para identificar potenciais sítios de ligação ao  $\sigma^{32}$ , uma abordagem amplamente aceita de informações teóricas (Schneider, 1997) foi adotada. Desde que os sítios para ligação do  $\sigma^{32}$  são compostos por dois blocos conservados (-35 e -10) separados por um intervalo (*gap*) de tamanho variável, duas matrizes de peso (PWM) foram geradas, cada uma com base nas informações complementares dos elementos -35 e -10. A frequência da matriz foi baseada em um conjunto de 18 promotores para  $\sigma^{32}$  em *Vibrio cholerae* (Slamti et al. 2007). Utilizamos a estrutura do promotor  $\sigma^{32}$  com 6 posições no elemento -35 e 8 posições no elemento -10 separados por um espaçador de tamanho variável. Usando as PWMs como uma função de pontuação, a presença de supostos sítios de ligação para  $\sigma^{32}$  foi verificada em uma região composta por 200 bases amontante ao códon de iniciação nos genes de *A. ferrooxidans*. Cada local foi marcado pelo seu grau de correspondência para  $\sigma^{32}$  entre as PWMs -35 e -10.

## Resultados e Discussão

A técnica de PCR quantitativo em tempo real foi utilizada para analisar as mudanças nos níveis de transcrição de 40 genes selecionados em *A. ferrooxidans* LR submetida ao crescimento a 40°C e a um choque térmico também a 40°C. Os resultados mostraram que 31 dos 40 genes analisados foram diferencialmente induzidos ou reprimidos pelo menos 1,5 vezes. Segundo Gao et al. (2004) esta variação é biologicamente significativa. A Tabela 2 resume os níveis de expressão dos 31 genes, bem como suas categorias funcionais de acordo com JCVI. Os genes cuja expressão permaneceu inalterada durante o estresse térmico foram AFE\_3047, AFE\_0123, AFE\_0125 AFE\_0993 e AFE\_0112.

**Tabela 2.** Expressão relativa dos genes em *A. ferrooxidans* LR cultivada a 40°C e submetida ao choque térmico. A significância estatística dos resultados de qRT-PCR foi baseada no teste *t-Student* ( $p$  value  $\leq 0.05$ ). A identidade protéica (ID) e categoria funcional foram baseadas no JCVI.

| Locus/Gene                 | ID (JCVI)                                              | Functional category                                       | Expression under heat shock - Fold changes (p value) |                              |                           | Expression under long-term growth - Fold changes (p value) |
|----------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------|
|                            |                                                        |                                                           | 15                                                   | 30                           | 60                        |                                                            |
| AFE_0439                   | <i>Chaperone protein GrpE</i>                          | Processamento de Proteínas                                | Induzido<br>6.4 (0.005)                              | Induzido<br>9.2 (0.000)      | Induzido<br>16.4 (0.006)  | Inalterado (0.684)                                         |
| AFE_0440                   | <i>Chaperone protein DnaK</i>                          |                                                           | Induzido<br>9.3 (0.001)                              | Induzido<br>18 (0.001)       | Induzido<br>28 (0.029)    | Inalterado (0.784)                                         |
| AFE_0441                   | <i>Chaperone protein DnaJ</i>                          |                                                           | Induzido<br>4 (0.001)                                | Induzido<br>5.5 (0.001)      | Induzido<br>7.2 (0.017)   | Inalterado (0.531)                                         |
| AFE_2495                   | <i>Chaperonin protein GroES</i>                        |                                                           | Induzido<br>13 (0.001)                               | Induzido<br>23.61 (8.74E-07) | Induzido<br>77.78 (0.000) | Inalterado (0.245)                                         |
| AFE_2496                   | <i>Chaperonin protein GroEL</i>                        |                                                           | Induzido<br>10.2 (0.000)                             | Induzido<br>15.6 (0.000)     | Induzido<br>61 (0.000)    | Inalterado (0.212)                                         |
| AFE_2517                   | <i>Protease clpS</i>                                   |                                                           | Induzido<br>3.1 (0.004)                              | Induzido<br>4.0 (0.042)      | Induzido<br>6.9 (3.69E-7) | Reprimido 2.0 (0.014)                                      |
| AFE_2518                   | <i>Protease clpA</i>                                   |                                                           | Induzido<br>2.8 (0.003)                              | Induzido<br>3.7 (0.005)      | Induzido<br>5.5 (0.000)   | Reprimido 2.1 (0.001)                                      |
| AFE_1122                   | <i>Protease clpB</i>                                   |                                                           | Induzido<br>14 (0.001)                               | Induzido<br>22 (0.007)       | Induzido<br>44 (0.000)    | Inalterado (0.092)                                         |
| AFE_2133                   | <i>Protease clpX</i>                                   |                                                           | Inalterado<br>(0.128)                                | Induzido<br>1.5 (0.015)      | Induzido<br>2.6 (0.001)   | Reprimido 1.5 (0.022)                                      |
| AFE_2134                   | <i>Protease clpP</i>                                   |                                                           | Induzido<br>1.5 (0.078)                              | Induzido<br>1.7 (0.014)      | Induzido<br>3.8 (0.001)   | Reprimido 3.5 (0.019)                                      |
| AFE_1395 ( <i>cbhS</i> -2) | <i>Ribulose biphosphate carboxylase, small subunit</i> | Metabolismo energético                                    | Inalterado<br>(0.365)                                | Induzido<br>6.6 (0.003)      | Induzido<br>22 (2.49E-5)  | Reprimido 1.2 (0.052)                                      |
| AFE_0003 ( <i>resB</i> )   | <i>cytochrome c-type biogenesis protein ResB</i>       |                                                           | Inalterado (0.413)                                   | Induzido<br>1.6 (0.008)      | Induzido<br>2.2 (0.002)   | Inalterado (0.985)                                         |
| AFE_3048                   | <i>iron-sulfur cluster-binding protein</i>             |                                                           | Inalterado<br>(0.48905)                              | Induzido (0.053)             | Induzido (0.008)          | Inalterado (0.911)                                         |
| AFE_2891 ( <i>hemN</i> )   | <i>oxygen-independent coproporphyrinogen oxidase</i>   | Biosíntese de cofatores, carreadores e grupos prostéticos | Inalterado (0.665)                                   | Induzido<br>1.5 (0.046)      | Induzido<br>2.7 (0.009)   | Reprimido 2.4 (0.001)                                      |
| AFE_1217                   | <i>Cell division inhibitor</i>                         | Processos celulares                                       | Induzido<br>2.5 (0.008)                              | Induzido<br>2.8 (0.005)      | Induzido<br>3.8 (0.001)   | Inalterado (0.743)                                         |

|          |                                               |                                                         |                      |                      |                      |                              |
|----------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|
| AFE_3203 | <i>voltage-gated chloride channel</i>         | Transporte e ligação de proteínas                       | Induzido 2.8 (0.041) | Induzido 2.1 (0.02)  | Induzido 3.7 (0.002) | Inalterado (0.900)           |
| AFE_0990 | <i>ABC transporter, permease protein</i>      |                                                         | Inalterado (0.180)   | Inalterado (0.119)   | Induzido 2.9 (0.000) |                              |
| AFE_0173 | <i>TonB-dependent receptor</i>                | Transporte e ligação de proteínas: carreadores de ferro | Inalterado (0.774)   | Inalterado (0.174)   | Reprimido (0.000)    | 2.5 Reprimido 4.1 (9.03E-06) |
| AFE_0174 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Inalterado (0.074)   | Inalterado (0.203)   | Reprimido (0.001)    | 2.2 Reprimido 11.0 (0.001)   |
| AFE_0796 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Induzido 1.5 (0.011) | Induzido 3.2 (0.001) | Induzido 5.0 (0.001) | Inalterado (0.753)           |
| AFE_0800 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Induzido 2.3 (0.000) | Induzido 3.7 (0.001) | Induzido 5.2 (0.000) | Inalterado (0.929)           |
| AFE_0806 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Induzido 3.0 (0.012) | Induzido 3.8 (0.002) | Induzido 4.5 (0.000) | Inalterado (0.267)           |
| AFE_0810 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Inalterado (0.176)   | Induzido (0.034)     | Induzido 2.6 (0.001) | Inalterado (0.898)           |
| AFE_1054 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Inalterado (0.116)   | Inalterado (0.004)   | Reprimido (0.000)    | 7.1 Reprimido 18.0 (0.000)   |
| AFE_1592 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Inalterado (0.453)   | Induzido 1.8 (0.002) | Induzido 4.0 (0.013) | Inalterado (0.323)           |
| AFE_1601 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Induzido 1.6 (0.023) | Induzido 3.0 (0.018) | Induzido 7.5 (0.001) | Inalterado (0.122)           |
| AFE_0169 | <i>TonB-dependent receptor domain protein</i> |                                                         | Inalterado (0.053)   | Inalterado (0.403)   | Inalterado (0.059)   | Reprimido 20.0 (0.000)       |
| AFE_2277 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Inalterado (0.063)   | Inalterado (0.101)   | Induzido 2.2 (0.015) | Inalterado (0.174)           |
| AFE_3103 | <i>TonB-dependent receptor</i>                |                                                         | Inalterado (0.231)   | Inalterado (0.401)   | Induzido 3.4 (0.003) | Reprimido 13.0 (0.000)       |
| AFE_2747 | <i>ferric uptake regulation protein</i>       | Funções regulatórias                                    | Inalterado (0.461)   | Induzido 2.5 (0.005) | Induzido 3.1 (0.011) | Inalterado (0.181)           |
| AFE_2238 | <i>AMP-binding protein</i>                    | Função desconhecida                                     | Inalterado (0.159)   | Inalterado (0.917)   | Induzido 9.7 (0.002) | Inalterado (0.974)           |



### *Expressão dos genes que codificam proteínas de transporte após a exposição ao estresse térmico*

Alterações na temperatura de crescimento podem afetar a permeabilidade das membranas externa e interna de bactérias, permitindo um aumento no fluxo de substâncias entre essas membranas (Konings, 2006). Assim, não surpreende que os resultados deste estudo mostraram um número considerável de genes que codificam proteínas de transporte, cuja expressão foi modulada pelo estresse térmico (Tabela 2). Os genes que codificam receptores de membrana dependentes da energia do sistema Tonb foram na sua maioria alterados, a saber: AFE\_0173, AFE\_0174, AFE\_0796, AFE\_0800, AFE\_0806, AFE\_0810, AFE\_1054, AFE\_1592, AFE\_1601, AFE\_0169, AFE\_2277 e AFE\_3103. Com exceção dos genes AFE\_0173, AFE\_0174, AFE\_1054 e AFE\_0169, todos os outros genes foram induzidos durante o choque térmico. Os receptores dependentes de Tonb estão relacionados a um sistema de aquisição de alta afinidade de ferro mediado por sideróforos e a expressão desses genes geralmente aumenta em condições de limitação de ferro (Higgs et al. 2002). Isto sugere que o aumento da temperatura pode interferir com a capacidade de *A. ferrooxidans* usar o ferro como fonte de energia, como já foi sugerido por Ribeiro et al. (2010). Além disso, os genes AFE\_3203 (3,7 vezes) e AFE\_0990 (2,9 vezes), que codificam, respectivamente, uma proteína de canal de cloro, cuja expressão é controlada por íons cloreto tanto em ambientes internos quanto externos (Chen et al. 2003), e um transportador ABC do tipo permease, cuja expressão foi demonstrada mudar em resposta a flutuações na temperatura e pH (Antelmann et al 2000; Ojaimi et al 2003), também foram induzidos.

A diminuição (AFE\_0173, AFE\_0174 e AFE\_1054) e o aumento (AFE\_3203 e AFE\_0990) na expressão de alguns genes envolvidos no transporte sugere que os sistemas de transportes são afetados quando *A. ferrooxidans* é submetida ao estresse térmico. Por outro lado, os níveis de

expressão da maioria dos genes de transporte não se alterou durante o crescimento a 40°C, com exceção de AFE\_0173, AFE\_0174, AFE\_1054 AFE\_3103, que foram fortemente reprimidos.

O gene localizado no locus AFE\_2747, que codifica o regulador global FUR (*Ferric Uptake Regulation*), teve sua expressão aumentada após 30 (2,5 vezes) e 60 (3,1 vezes) minutos, de choque térmico, mas não se alterou após o crescimento até a fase logarítmica a 40°C . Fur controla a assimilação do ferro mediada por sideróforos e modula vários processos, tais como estresse oxidativo e tolerância ácida (Thompson et al. 2002). FUR tem um duplo mecanismo de ação, agindo como um repressor ou como um indutor (Quatrini et al. 2005), de acordo com a disponibilidade de ferro. Foi demonstrado que, após tratamento com ácido, ocorreu um aumento da transcrição de reguladores da família FUR em *A. ferrooxidans* (Chao et al. 2008), sugerindo que os sistemas de transporte, incluindo o ferro, são afetados por diversos fatores ambientais.

#### *Expressão de genes que codificam proteínas pertencentes ao metabolismo energético, biosíntese de cofatores e processos celulares*

Os genes do metabolismo energético, biossíntese de cofator e processo celular - divisão celular, foram induzidos após 60 minutos de choque térmico. Desde que sob condições de estresse a maquinaria de síntese de proteínas é restrita apenas para produzir proteínas importantes ou críticas para a sobrevivência da célula e/ou proteínas de manutenção (Lindquist 1986), o aumento da regulação dos genes AFE\_1395 (cbbS-2), AFE\_0003 (RESB), AFE\_3048, AFE\_2891 (hemN) e AFE\_1217 parece indicar que estes genes são essenciais para a sobrevivência de *A. ferrooxidans* durante o choque térmico. Curiosamente, a maioria dos genes tiveram os níveis de expressão

alterados somente após 60 minutos de choque térmico. Isso pode acontecer como uma consequência da lenta taxa de crescimento de *A. ferrooxidans*.

A expressão do gene *cbbS-2*, que codifica a subunidade menor da enzima ribulose-bifosfato-carboxilase/oxigenase-1,5-bifosfato/oxigenase (Rubisco), aumentou significativamente após 60 minutos de choque térmico (22 vezes - tabela 2). Além do efeito direto da temperatura nos processos biológicos, ela também pode afetar de forma indireta a expressão gênica por interferir em alguns parâmetros físico-químicos como, solubilidade de gases (Stintzi, 2003) ou estabilidade do ferro (Wang et al. 2007) então, podemos especular que o aumento na expressão de *cbbS-2* pode ter ocorrido em virtude de alterações na  $pCO_2$ , uma vez que a concentração de  $CO_2$  pode afetar a transcrição de genes do operon Rubisco (Caldwell et al. 2007; Wei et al. 2008). Da mesma forma, o gene *resB* que codifica a proteína ResB, envolvida na maturação de citocromos tipo *c*, foi demonstrado ser sensível a baixas concentrações de  $O_2$  (Mukhopadhyay et al. 2007). Esta pode ser uma explicação plausível para a expressão afetada deste último gene. Quanto ao gene *hemN*, há evidências que a concentração de  $O_2$  também pode afetar sua expressão na bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (Fischer et al. 2001).

O gene localizado no *locus* AFE\_3048 codifica uma proteína de ligação ao enxofre (*iron-sulfur binding protein*; Fe-S). Proteínas Fe-S atuam como sensores celulares e são requeridas para a maioria dos processos celulares incluindo transferência de elétrons, catálise redox e não-redox e regulação da expressão gênica (Beinert et al. 1997). Mudanças na expressão destes genes tem sido principalmente relacionadas a estresses oxidativos (Takahashi & Tokumoto, 2002; Thorgersen & Downs, 2009). Contudo, Nonaka et al. (2006) mostraram que o regulon  $\sigma^{32}$  de *E. coli* codifica muitas proteínas Fe-S, sugerindo que um fornecimento adequado de tais proteínas contribui para a homeostase celular em diferentes situações de estresse.

O único gene pertencente à categoria de divisão celular está localizado no locus AFE\_1217 e codifica uma proteína putativa que atua na inibição da divisão celular. A sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene AFE\_1217 mostrou um domínio comum com as proteínas conservadas Sula (dados não mostrdos). O gene *sulA* é induzido durante a resposta SOS e tem como alvo a proteína essencial divisão FtsZ (Bi e Lutkenhaus, 1993). O aumento dos níveis deste gene após o choque térmico pode ter ocorrido para diminuir ou até mesmo interromper a divisão celular, já que este é um processo energético altamente caro (Mazia, 1961) e, portanto, reduziria a demanda energética imposta às células durante o estresse térmico. Na verdade, Sula está fortemente relacionado com a resposta ao choque térmico em bactérias (Parsell e Lindquist, 1993), o que corrobora com a expressão aumentada do gene AFE\_1217 durante o choque térmico e seus níveis inalterados de expressão no experimento onde as células foram mantidas até a fase logarítmica a 40°C.

#### *Indução de genes de choque térmico após estresse térmico*

Em *A. ferrooxidans*, a resposta ao choque térmico foi caracterizada pela identificação de duas proteínas típicas de choque térmico, ou chaperona moleculares, chamadas DnaK e GroEL (Jerez, 1988). Seeger et al. (1996) demonstraram que essas proteínas são induzidas e têm seus níveis de fosforilação aumentada quando as células de *A. ferrooxidans* são expostas a várias condições de estresse, indicando que estas chaperonas poderiam diretamente sentir não só a temperatura, mas também a várias outras condições de estresse, sendo um “sensor de estresse” (Seeger et al. 1996). De fato, existem evidências que suportam a hipótese de que o operon DnaK, que consiste nas proteínas DnaK, DnaJ e GrpE, é o primeiro sensor celular monitorando mudanças na concentração celular de

proteínas danificadas ou desnaturadas, atuando como um "termômetro" celular (Craig e Gross, 1991; Tomoyasu et al 1998).

Os genes HSPs analisados foram induzidos durante o choque térmico, mas tiveram sua expressão diminuída ao longo do tempo, como mostrado pelos resultados do experimento de cultivo 40°C (Tabela 2). De fato, é sabido que na resposta ao choque térmico uma rápida acumulação de HSPs ocorre, seguido por um período de adaptação, durante o qual os níveis de HSPs são reajustados para as novas condições de crescimento (Richmond et al. 1999). Este resultado é uma evidência de que *A. ferrooxidans* foi capaz de ajustar seu metabolismo a 40°C, após ter vencido um período de estresse térmico.

Chaperonas e proteases trabalham juntas para combater os efeitos do estresse celular. Proteases dependentes de ATP, são responsáveis pela degradação seletiva de diversas proteínas, que influenciam no controle da qualidade protéica e na regulação de muitos processos celulares. Essas tarefas são realizadas por um repertório de proteases, incluindo Lon e as proteases FtsH (Striebel et al. 2009), bem como por membros da família das proteases Clp (ClpAP, ClpCP, ClpEP, ClpXP, HslUV). Aqui, foram investigados o nível de expressão de genes que codificam as proteases ClpA, ClpB, ClpP, CLPs e ClpX e, como mostrado na Tabela 2, todos estes genes apresentaram um aumento nos seus níveis de expressão durante o choque térmico. Curiosamente, o nível mais elevado de expressão foi encontrada para o gene ClpB (44 vezes em 60 minutos de choque térmico). Os complexos de degradação Clp apresenta uma arquitetura do tipo "pilha de anéis", composta por dois elementos funcionais: um núcleo proteolítico em forma de cilindro (ClpP) e um núcleo de chaperonas ATPase-ativo, que é responsável pelo reconhecimento do substrato e redobramento do segmento da cadeia polipeptídica estendida. No entanto, ClpB pode agir independentemente da peptidase ClpP (Dougan et al. 2002), o que pode explicar os resultados obtidos.

### *Predição in silico de sítios de motivo consenso para $\sigma^{32}$ em *A. ferrooxidans**

Para prever quais genes são regulados pelo o fator de transcrição  $\sigma^{32}$ , as sequências de DNA a montante dos genes induzidos pelo estresse térmico foram analisadas, a fim de identificar supostas sequências consenso de ligação ao  $\sigma^{32}$ . Conforme mostrado na Tabela 3, as regiões -10 e -35 deduzida dos genes localizados nos loci AFE\_0003, AFE\_2891, AFE\_1217, AFE\_2238, AFE\_0439, AFE\_0440, AFE\_2495, AFE\_1122, AFE\_2134, AFE\_2517, AFE\_0796 e AFE\_1054 mostrou um elevado conteúdo informativo, com base na PWMs para  $\sigma^{32}$ , indicando que esses genes possuem promotores dependentes de  $\sigma^{32}$ . Uma região com 12-17 nucleotídeos separando as regiões -10 e -35 foi observada, e a sequência da região -35 se mostrou mais conservada do que para a região -10 (Figura 1). A sequência consenso  $\sigma^{32}$  de *A. ferrooxidans* é semelhante àquela relatada para *E. coli* (Nonaka et al. 2006) e *Vibrio cholerae* (Slamti et al. 2007). Nonaka et al. (2006) mostraram que 66% dos promotores de  $\sigma^{32}$  em *E. coli* foram localizados dentro de 100 nt do adjacente do início da transcrição do gene, o que corrobora com nossos resultados (Tabela 3). Além disso, as previsões para o regulon  $\sigma^{32}$  de *E. coli* (Nonaka et al. 2006) e *Vibrio cholerae* (Slamti et al. 2007) abriga membros das diferentes categorias funcionais, como o metabolismo energético, o processamento de proteínas, reguladores de transcrição, proteínas de transporte e biossíntese de cofatores, entre os outros.

Sequências consenso de ligação ao  $\sigma^{32}$  não foram observadas para os genes AFE\_0041 (*dnaJ*), AFE\_2496 (*groEL*), AFE\_2518 (*clpA*), AFE\_2133 (*clpX*), AFE\_1395 (*resB*), AFE\_3048, AFE\_3203, AFE\_0990, AFE\_0173, AFE\_0174, AFE\_0800, AFE\_0806, AFE\_0810, AFE\_1592, AFE\_1601, AFE\_0169, AFE\_2277, AFE\_3103 e AFE\_2747. A sequência consenso de ligação ao  $\sigma^{32}$  foi ausente nos genes de choque térmico *dnaJ*, *groEL*, *clpA* e *clpX*; contudo, estes genes são organizados em operon adjacente aos genes que apresentaram sítios de ligação ao  $\sigma^{32}$ , o que poderia

explicar a ausência de tais sítios nestes genes. Já a ausência dos sítios de ligação do  $\sigma^{32}$  nos demais genes induzidos pode indicar a existência de mecanismos regulatórios alternativos.



**Fig.1.** Logotipo da sequência de um sítio de ligação ao fator  $\sigma^{32}$  a montante dos genes de *A. ferrooxidans*. A altura de cada coluna indica a conservação da sequência em cada posição, enquanto que a altura dos símbolos na pilha indica a frequência relativa de cada ácido nucléico nessa posição. O número de vezes que cada nucleotídeo é encontrado em cada posição na sequência consenso é mostrado abaixo da sequência. N (12-17) indica o intervalo entre os dois blocos.

**Tabela 3.** Sítios de ligação do fator  $\sigma^{32}$  e sítios de início da transcrição (TIS) nos genes de *A. ferrooxidans* analisados. Para o gene marcado (\*), não foi possível prever TIS, e nestes casos os sítios de  $\sigma^{32}$  foram selecionados pelo maior conteúdo de informação. Sítios de início de transcrição e promotores reconhecidos por  $\sigma^{32}$  são indicados pela seta (▼) e por letras sublinhadas, respectivamente. O conteúdo total de informação de cada sítio  $\sigma^{32}$  (-35 and -10) é mostrado em bits.

| Locus                      | $\sigma^{32}$ distance from TIS (bp) | TIS position from ATG (bp) | Sequence                                                                                           |     |
|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| AFE_0439 ( <i>grpE</i> )   | 39                                   | 26                         | -35 (11.3 bits) -10 (5.4 bits) ▼<br><u>CTTGAA</u> ATACCCTGGTCCTT <u>TCCCAT</u> ATGGTCTTGGACT(n)ATG | Met |
| AFE_0440 ( <i>dnaK</i> )   | 38                                   | 17                         | -35 (7.3 bits) -10 (5.9 bits) ▼<br><u>GCACA</u> ATGATACCACGCAGGGCAGACAAATTTGCATATC(n)ATG           | Met |
| AFE_2495 ( <i>groES</i> )* |                                      | 107                        | -35 (9.4 bits) -10 (6.1 bits) ▼<br><u>GCACA</u> CTTGACAGGGCATTCTCAGCGCCTATGCATTTCGT(n)ATG          | Met |
| AFE_2517 ( <i>clpS</i> )   | 39                                   | 150                        | -35 (5.3 bits) -10 (6.9 bits) ▼<br><u>CTTCGC</u> ACCAAGTAATTCTGGTATCGCCAAACACATGCGT(n)ATG          | Met |
| AFE_1122 ( <i>clpB</i> )   | 60                                   | 47                         | -35 (11.4 bits) -10 (6.9 bits) ▼<br><u>CTTGAAAA</u> GAGGCCGATTAAT <u>CCCAT</u> TACCGATGCGTT(n)ATG  | Met |
| AFE_2134 ( <i>clpP</i> )   | 66                                   | 38                         | -35 (7.3 bits) -10 (5.2 bits) ▼<br><u>GGTGA</u> ACAAACGCGGAATAAC <u>CGGTGT</u> CGCCAATCGATT(n)ATG  | Met |
| AFE_0003( <i>resB</i> )    | 38                                   | 57                         | -35 (5.3 bits) -10 (7.2 bits) ▼<br><u>CGGGC</u> ATAAACATGCATTGTTATCTTATTATAGAACTATTT(n)TTG         | Leu |
| AFE_2891 ( <i>hemN</i> )   | 38                                   | 30                         | -35 (7.4 bits) -10 (5.0 bits) ▼<br><u>CTTGGG</u> GTAAGGATATTTCA <u>GGCT</u> TATGATCGCCCTG(n)ATG    | Met |
| AFE_1217                   | 41                                   | 42                         | -35 (5.3 bits) -10 (5.6 bits) ▼<br><u>CTCCTA</u> TTTCTGTGGATTTGCACGCGATAGTCTGACAATAG(n)ATG         | Met |
| AFE_2238                   | 36                                   | 18                         | -35 (5.3 bits) -10 (5.5 bits) ▼<br><u>ATAGCA</u> AACCCAGTCCACTACGGTAATATTCAGTCAATG(n)ATG           | Met |
| AFE_0796                   | 47                                   | 129                        | 35 (11.3 bits) -10 (5.5 bits) ▼<br><u>CTTGA</u> AGGCCCTGCGCGCCAGCCGCTTTGATTGATGCGTT(n)ATG          | Met |
| AFE_1054                   | 39                                   | 92                         | 35 (7.3 bits) -10 (9.7 bits) ▼<br><u>CGAGAA</u> AAACAGAGCCCGCCCATATCATTACCGATGCGTT(n)ATG           | Met |



Em conclusão, a indução dos genes analisados sugere que o choque térmico interfere com a homeostase celular em *A. ferrooxidans*. Em contraste, a expressão gênica inalterada ou reprimida no cultivo até a fase logarítmica de crescimento indica uma possível adaptação ou aquisição de tolerância térmica sob a nova temperatura (Parsell e Lindquist, 1993; Gao et al 2004). Os resultados indicam que as células de *A. ferrooxidans* lidam com o estresse térmico, modulando a expressão gênica até chegarem a um estado de tolerância. Desde que os genes de diferentes categorias funcionais tiveram sua expressão modulada pelo estresse térmico podemos especular que diferentes vias metabólicas, tais como o metabolismo do ferro, são afetados por esse estresse. Os resultados obtidos com esse trabalho mostram que o uso de células adaptadas a temperaturas acima da temperatura ótima de crescimento nos processos de biolixiviação poderia aumentar a eficiência do processo por evitar mudanças na fisiologia destas bactérias.

## Referências

- Antelmann H, Scharf C, Hecker M (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. J bacteriol 182 (16):4478-4490.
- Beinert H, Holm RH, Munck E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. Sci 277:653–659.
- Bi E, Lutkenhaus J (1993) Cell division Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. J Bacteriol 175 (4): 118-1125.
- Caldwell PE, MacLean MR Paul Norris PR (2007) Ribulose biphosphate carboxylase activity and a Calvin cycle gene cluster in *Sulfobacillus* species. Microbiol 153:2231–2240.
- Carlos C, Reis FC, Vicentini R, Madureira DJ, Ottoboni LMM (2008) The *rus* operon genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. Curr Microbiol 57:375-380
- Chao J, Wang W, Shuiming X, Liu X (2008) Response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 gene expression to acid stress. W J Microbiol Biotech
- Chen TY, Chen MF, Lin CW (2003) Eletrostatic control and chloride regulation of the fast gating of CLC chloride channels. J Gen Physiol 122:641-651.
- Craig EA, Gross CA (1991) Is hsp70 the cellular thermometer? Trends Biochem Sci 16: 135-140.
- Dougan DA, Mogk A, Bukau B (2002) Protein folding and degradation in bacteria: To degrade or not to degrade? That is the question. Cell Mol Life Sci 59:1607–1616
- Fischer HM, Velasco L, Delgado MJ, Bedmar EJ, Ren, SS, Zingg D, Ttfert MG, Hennecke AH (2001) One of two *hemN* genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis. J Bacteriol 183(4): 1300-1311

- Gao H, Wang Y, Xueduan L, Tingfen Y, Liyou W, Alm E, Arkin A, Thompson DK, Zhou J (2004) Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Shewanella oneidensis*. J Bacteriol 186(22): 7796-7803.
- Garcia Jr. O (1991) Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. Rev Microbiol 22:1-6.
- Higgs, PI, Lasen, RA, postle K (2002) Quantification of Known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. Mol microbial 44(1): 271-281
- Hubert WA, Leduc LG, Ferroni GD (1995) Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. Curr Microbiol 31:10-14
- Hutchins SR, Davidson MS, Brierley JA, Brierley CL (1986) Microorganisms in reclamation of metals. Ann Rev Microbial 40:311-36.
- Jerez CA (1988) The heat shock response in meso - and thermoacidophilic chemolithotrophic bacteria. FEMS Microbiol.Lett.56: 289-294.
- Kelly DP, Wood AP (2000) Re-classification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. Int J SystEvolMicrobiol50: 511-16.
- Konings WN (2006) Microbial transport: Adaptations to natural environments. Ant van Leeuw 90:325-342.
- Lindquist, S (1986) The heat-shock response. Ann. Rev. Biochem 55:1151-1191
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. Methods 25:402:408.
- Mazia D (1961) Biochemistry of the dividing cell. Annu Rev Biochem 30:669-688.

- Mukhopadhyay A, Redding AM, Joachimiak MP, Arkin AP, Borglin ES, Dehal PS, Chakraborty R, Geller JT (2007) Cell-Wide responses to low-oxygen exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol* 189(16): 5996-6010.
- Nonaka GM, Blankschien M, Herman C, Gross CA, Rhodius VA (2006) Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat shock factor,  $\sigma^{32}$ , reveals multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev* 20:1776-1789.
- Ojaimi C, Brooks C, Casjens S, Rosa P, Elias A, Barbour A, Jasinskas A, Benach J, et al (2003) Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect Immun* 71(4):1689-1705.
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27:437-496.
- Paulino LC, Mello MP, Ottoboni LMM (2002) Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electroph* 23:520-527.
- Quatrini R, Jedlicki E, Holmes DS (2005) Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganisms *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:606-614.
- Richmond CS, Glasner JD, Mau R, Jin H, Blattner FR (1999) Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27: 3821-3835.
- Rawlings DE (2005) Characteristics and adaptability of iron and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb cell fac* 4(13):1-15
- Ribeiro DA, Maretto DA, Nogueira FCS, Silva MJ, Campos FAP, Domont GB, Poppi RJ, Ottoboni, LMM (2010) Heat and phosphate starvation effects on the proteome, morphology and chemical composition of the biomining bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *W J Microbiol Biotech.*

- Schneider TD (1997) Information content of individual genetic sequences. *J Theor Biol* 189: 427-441.
- Seeger M, Osorio G, Jerez CA (1996) Phosphorylation of GroEL, DnaK other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiol Lett* 138(2-3): 129-134.
- Slamti L, Livny J, Waldor MK (2007) Global Gene Expression and Phenotypic Analysis of a *Vibrio cholerae* *rpoH* Deletion Mutant. *J Bacteriol* 189(2): 351-362.
- Stintzi A (2003) Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. *J Bacteriol* 185(6):2009–2016.
- Straus D B, Walter W A, Gross C A (1987) The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma^{32}$ . *Nature* 329:348–351.
- Striebel F, Kress W, Weber-Ban E. (2009) Controlled destruction: AAA $\beta$ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol* 19: 209-217.
- Thompson DK, Beliaev AS, Giometti CS, Tollaksen SL, Khare T, Lies DP, Nealson KH, Lim H, Yates III J, Braandt CC, Tiedje JM, Zhou J (2002) Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (Fur) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of Fur in energy metabolism, transcriptional regulation and oxidative stress. *App Environ Microbiol* 68(2):881-892.
- Takahashi Y, Tokumoto U (2002) A third bacterial system for the Assembly of iron – sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* 277 (32):28380–28383.
- Thorgersen MP, Downs DM (2009) Oxidative stress and disruption of labile iron generate specific auxotrophic requirements in *Salmonella enterica*. *Microbiology* 155: 295–304.
- Tomoyasu T, Ogura T, Tatsuta T, Bukau B (1998) Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 30:567–581.

- Tuovinen OH, Kelly, DP (1972) Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ores. *Z Allg Mikrobiol* 12(4):311-346.
- Tyagi RD, Blais, JF, Meunier N, Benmoussa H (1996) Simultaneous sewage sludge digestion and metal leaching—effect of temperature. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 422–431.
- Xiao S, Chao J, Wang W, Fang F, Qiu G, Liu X (2009) Real-time PCR analysis of the heat-shock response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Folia Biol* 55:1-6
- Wang H, Bigham JM, Jones FS, Tuovinen OH (2007) Synthesis and properties of ammonio jarosites prepared with iron-oxidizing acidophilic microorganisms at 22-65°C. *Geochim Cosmochim Acta* 71:55-164.
- Wei W, Xiao S, Chao J, Chen Q, Qiu G, Liu X (2008) Regulation of CO<sub>2</sub> fixation gene expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 by Lix984n Shock. *J Microbiol Biotechnol* 18(11): 1747-1754.
- Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V. (2004) Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* *rus* operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiol* 150: 2113-2123.
- Yamamori T, Yura T. (1980) Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: Evidence for transcriptional control. *J Bacteriol* 142: 843–851.
- Yura Takashi (1996) Regulation and conservation of the heat shock transcription factor  $\sigma_{32}$ . *Genes to Cell* 1: 277-284

**CAPÍTULO 6 - *Small heat shock proteins* em *A. ferrooxidans*: expressão gênica, análise estrutural e modelagem molecular** (The small heat shock proteins from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: gene expression, phylogenetic analysis and structural modeling)

## 1. Introdução

*Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria quimiolitotrófica e acidofílica que obtém energia a partir da oxidação de íons ferrosos e do enxofre elementar e de seus compostos reduzidos (Kelly and Wood 2000). Esta bactéria é aplicada com sucesso em biolixiviação de sulfetos metálicos com baixos teores de metal. Durante este processo, *A. ferrooxidans* é exposta a condições extremas de crescimento como variações na temperatura e pH, privação de nutrientes e presença de metais (Rawlings, 2005), o que pode afetar a eficiência da recuperação do metal.

Os estresses ambientais, como variações na temperatura, geralmente afetam processos essenciais para o crescimento e a sobrevivência do micro-organismo como a transferência de energia. Geralmente, todos os organismos respondem a estresses ambientais por meio de um rápido aumento na síntese de proteínas do choque térmico (HSP- *heat shock proteins*). HSPs atuam tanto como chaperonas moleculares, mediando o correto dobramento e montagem de proteínas, quanto como proteases, degradando proteínas danificadas irreversivelmente (Lindquist 1986). As HSPs usualmente são classificadas de acordo com seu peso molecular, incluindo HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP20 ou *small* HSPs (sHSPs).

Particularmente, as sHSPs são caracterizadas por possuírem um baixo peso molecular, entre 12 e 43 kDa e pela presença de um domínio conhecido como domínio  $\alpha$ -cristalino. Tal Domínio é composto por 80 a 100 resíduos de aminoácidos e é flanqueado por regiões C- e N-terminais de baixa similaridade. A região N-terminal é crítica para a atividade destas proteínas *in vivo*, pois exercem um papel na oligomerização e ligação ao substrato (Sun et al. 2005; Giese et al. 2005). O domínio  $\alpha$ -cristalino funciona como chaperona molecular (Horwitz 1992) e o C-terminal tem por função manter a solubilidade, estabilidade e atividade chaperonina (Sun et al. 2005).



As sHSPs são extensivamente estudadas devido a sua habilidade em proteger e manter a viabilidade celular em condições de estresse extremo. Esta característica é particularmente importante para micro-organismos extremófilos. Interessantemente, a maioria dos extremófilos possui uma ou duas sHSPs apenas e, espécies que apresentam pelo menos 3 sHSPs são geralmente aquelas do domínio Archea (Laksanalamai & Robb 2004). Contudo, três sHSPs foram identificadas no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Xiao et al. (2009) mostraram haver uma significativa diferença entre os níveis de expressão das sHSPs de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 em resposta a um choque térmico. Estes achados indicam que os genes sHSPs de *A. ferrooxidans* estão sob diferentes mecanismos de regulação e, suas proteínas podem exercer funções especializadas. Neste estudo, a expressão dos três genes codificantes de sHSPs (Afe\_1009, Afe\_1437 e Afe\_2172) foi investigada na linhagem Brasileira LR de *A. ferrooxidans* LR submetida a um choque térmico. Análises filogenéticas e por modelagem molecular comparativa foram feitas com o objetivo de prover novas informações estruturais e funcionais das sHSPs de *A. ferrooxidans*.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Linhagem bacteriana e condições de cultivo

A linhagem de *A. ferrooxidans* utilizada neste estudo foi a LR, isolada em efluente ácido de coluna de lixiviação de minério de urânio, em Lagoa Real, Brasil (Garcia, 1991). *A. ferrooxidans* LR foi cultivada em temperaturas de 30 e 40°C, em meio T&K, pH 1,8 (contendo 0.4 g/L  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.4 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.4 g/L  $(NH_4)_2SO_4$  e 33.4 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  Tuovinen & Kelly, 1972). O crescimento foi interrompido em 50% de oxidação do  $Fe^{2+}$ , o que foi acompanhado por titulação do  $Fe^{2+}$  com dicromato de potássio. As culturas obtidas foram filtradas em papel de filtro comum e a seguir, as células foram coletadas através de filtração em membrana Millipore (0,45  $\mu$ M). Para o experimento de choque térmico, as células foram cultivadas nas condições acima mencionadas e foram então mantidas a 40°C por 15, 30 e 60 minutos, em 100 mL de meio T&K. As células foram estocadas a -70°C e a massa celular obtida foi utilizada para o isolamento do RNA.

### 2.2 Isolamento de RNA

O RNA foi isolado segundo o método descrito por Paulino et al. (2002), com modificações. Para isto, as células de *A. ferrooxidans* foram lavadas várias vezes com TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) e uma vez com água tratada com DEPC e, posteriormente, ressuspensas em 1 mL de tampão de extração (EDTA 1 mM; LiCl 0,1 M; Tris 0,1 M) e a seguir, foi feita uma extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) contendo 100  $\mu$ L de SDS 10%. As amostras foram agitadas por 2 min em um vortex e centrifugadas a 8000 rpm por 3 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf novo e todo processo foi repetido

até que a interface não fosse mais visível. O RNA foi precipitado através da adição de acetato de sódio 40% (1/20 do volume) e etanol absoluto (2 volumes). O RNA foi mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 2 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas e o precipitado (RNA) lavado com etanol 70%. O RNA foi solubilizado em 100  $\mu\text{L}$  de água DEPC e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A concentração e a integridade do RNA isolado foram verificadas através de 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, procedeu-se o tratamento do RNA com DNase.

### 2.3. Quantificação da expressão relativa através de PCR em tempo real (qRT-PCR)

Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit *Thermoscript RT-PCR System* (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante. Para tanto foram utilizados 1  $\mu\text{L}$  do primer hexâmero randômico (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 500 ng de RNA (desnaturado pela incubação a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 min), 2  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10 mM) e água tratada com DEPC (quantidade suficiente para 12  $\mu\text{L}$ ). Para cada reação de síntese de cDNA, foi preparado um mix contendo 4  $\mu\text{L}$  do tampão de reação (5x), 1  $\mu\text{L}$  de DTT (0,1 M), 1  $\mu\text{L}$  de RNase OUT™, 1  $\mu\text{L}$  do Thermoscript RT™ (15 U/ $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de água DEPC. O cDNA sintetizado foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da expressão relativa através de PCR em tempo real.

As reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicada em um *Real-Time PCR System 7500* (Applied Biosystems), usando o corante *SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). conforme (Carlos et al. 2008). A reação foi normalizada através da amplificação do gene *alaS* (Yarzabal et al., 2004). A análise dos dados foi feita com o auxílio do software *Real-Time System RQ study software*

v.1.3.1 (Applied Biosystems). Dímeros de *primers* e outros artefatos foram avaliados pela curva de “melting” e somente reações livres de dímeros e artefatos foram consideradas válidas. Os primers usados nos experimentos foram desenhados utilizando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A expressão relativa de cada gene foi calculada de acordo com o método comparativo do limiar crítico threshold ( $\Delta\Delta TC$ ) descrito por Livak & Schmittgen (2001). A significância estatística foi determinada usando o teste *t-student* ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ).

**Tabela 1.** Primers usados nos experimentos de qRT-PCR.

| Gene alvo | <i>Forward primer</i> (5'→3') | <i>Reverse primer</i> (5'→3') | Tamanho do Amplicon (bp) |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Afe_1009  | CCGAAATACCTGAGGTCAA           | TCCCTTTCTCCTCCTTCTCC          | 91                       |
| Afe_1437  | GTATTGAAGGCGGAGATTGC          | TCTTCTTCCTTGACGCCACT          | 118                      |
| Afe_2172  | AGGTAATCTTCAGCGGCAAC          | TAGGGGATCTCCAGACGATG          | 97                       |

#### 2.4. Análise de bioinformática

O genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (J. Craig Venter Institute - <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/Genome>) foi usado para buscar genes codificantes para sHSPs. O programa CLUSTAL W foi utilizado para alinhar as sequências das sHSPs de *A. ferrooxidans* com sequências encontradas em outras bactérias. O alinhamento foi editado com o programa GeneDoc (Chenna et al. 2003).

Para predizer sítios de início da transcrição para os genes que codificam sHSPs (*small heat shock proteins*) em *A. ferrooxidans*, foi usado o software BPROM (Softberry, Inc.). BPROM é um

programa que reconhece a região promotora dos genes alvo da RNA polimerase com o fator sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ). Uma vez que esses promotores bacterianos se caracterizam por apresentarem posições conservadas em torno dos nucleotídeos -35 e -10, sendo estas posições separadas por uma sequência de tamanho variável, duas matrizes de peso (PWM) foram geradas, baseando-se em informações complementares de cada sítio de ligação, -10 e -35. A frequência da matriz foi baseada em um grupo de 18 promotores para  $\sigma^{32}$  em *Vibrio cholerae* (Slamti *et al.*, 2007). Usando essa PMW, possíveis regiões -10 e -35 foram buscadas em 200 pb amontante ao códon de início AUG dos genes de sHSPs de *A. ferrooxidans*. Cada sítio foi pontuado para seu grau de correspondência para as regiões -35 e -10 das matrizes.

## 2.5. Análise filogenética

Foi feita uma importação de todas as sequências de proteínas bacterianas que se encontram depositadas no *GeneBank*. As sequências protéicas codificadas pelos genes de sHSPs localizados nos *loci* Afe\_1009, Afe\_1437 e Afe\_2172, foram comparadas por blastp (Altschul *et al.*, 1997) e sequências duplicadas foram eliminadas. Os 20 melhores *hits* para cada sHSP de *A. ferrooxidans* foram usadas para construir um alinhamento usando MAFFT v6.717b (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>). Um alinhamento contendo 76 resíduos foi usado para construir, usando o software 3.0 software (<http://atgc.lirmm.fr/phym/>), uma árvore de máxima verossimilhança (*Maximum-likelihood - ML*). Uma matriz PAM (Dayhoff *et al.* 1978) foi gerada para calcular a distância genética e o programam *aLRT statistics* (Anisimova & Gascuel, 2006) foi empregado para obter os nós para análise estatística.

## 2.6. Modelagem Molecular

Primeiramente foi realizada uma busca por sequências similares com as sequências das sHSPs de *A. ferrooxidans* (Afe\_1009, Afe\_1437 and Afe\_2172) usando *PSI-BLAST* contra o PDB (*Protein Data Bank*). Esta busca resultou em apenas modelos com baixa identidade (<28%). Contudo, buscas usando o algoritmo pGenTHREADER implementado no servidor PSIPRED (McGuffin et al. 2000) retornou duas estruturas com *scores* significantes, as duas mostrando um domínio  $\alpha$ -cristalino bem conservado. A estrutura do cristal da HSP16.9 de trigo (van Montfort et al. 2001; wHSP16.9, código de entrada no PDB: 1GME) e HSP16.5 de *Methanococcus jannaschii* (MjHSP16.5, código de entrada no PDB: 1SHS) foram usadas como modelo tridimensional para a modelagem molecular do domínio  $\alpha$ -cristalino. A região N-terminal foi modelada usando como modelo somente a estrutura de wHSP16.9. As sequências modelo e alvo foram alinhadas usando o servidor mGenThreader (McGuffin and Jones, 2003) e foram cuidadosamente examinados para assegurar a precisão do alinhamento. Modelagem comparativa de proteínas pela satisfação de restrições espaciais foi realizada utilizando o programa MODELLER 9v7 (Fiser and Sali 2003). Quinze modelos foram construídos para cada sHSP de *A. ferrooxidans* e todos modelos foram avaliados com o programa DOPE. Modelos para cada proteína com baixo *score* global foram selecionados para explicitar a simulação da dinâmica molecular do solvente fazendo uso do programa GROMACS (Lindahl et al. 2001) para checar sua consistência e estabilidade. As análises de qualidade global e local do modelo final foram avaliados usando o programa VERIFY3D (Eisenberg et al. 1997), PROSA (Wiederstein and Sippl 2007) e VADAR (Willard et al. 2003). As estruturas tridimensionais foram visualizadas, analisadas e comparadas usando os programas COOT (Emsley and Cowtan, 2004) e PyMoL (DeLano, 2002).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. sHSPs de *A. ferrooxidans*

Por meio de uma busca no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, três genes para sHSPs, Afe\_1009, Afe\_1437 e Afe\_2172 foram localizados. De acordo com Han e co-laboradores (2008), cerca de 71% dos micro-organismos que possuem genomas completamente anotados possuem um ou dois genes codificantes para sHSP e 10% dos micro-organismos pertencentes ao domínio Archaea possuem mais que 3 genes relacionados a sHSP. Notavelmente, *Bradyrhizobium japonicum* (uma espécie de rizóbio) apresenta 13 genes codificantes de sHSP (Münchbach et al. 1999).

Laksanalamai & Robb (2004) mostraram que a identidade de sHSPs de vários micro-organismos extremófilicos que possuem apenas um gene para sHSP foi de 75% e a identidade de sHSPs em um mesmo organismo varia entre 20 a 50%. Desta forma, a baixa identidade entre as sequências de sHSP em *A. ferrooxidans* é intrigante.

Os genes Afe\_1009, Afe\_1437 and Afe\_2172 não são organizados em um operon no genoma de *A. ferrooxidans*. De fato, a maioria dos genes de sHSP conhecidos não estão organizados em operon (Roy et al. 1999; Tomoyasu et al. 2003), com algumas exceções como o operon *ibpAB* de *Escherichia coli* que contem dois genes, *ibpA* and *ibpB* (Allen et al. 1992; Kuczynska-Wisnik et al. 2001) e *Bradyrhizobium japonicum* que possui genes de sHSP em unidades independentes e outros agrupados no mesmo operon (Münchbach et al. 1999).

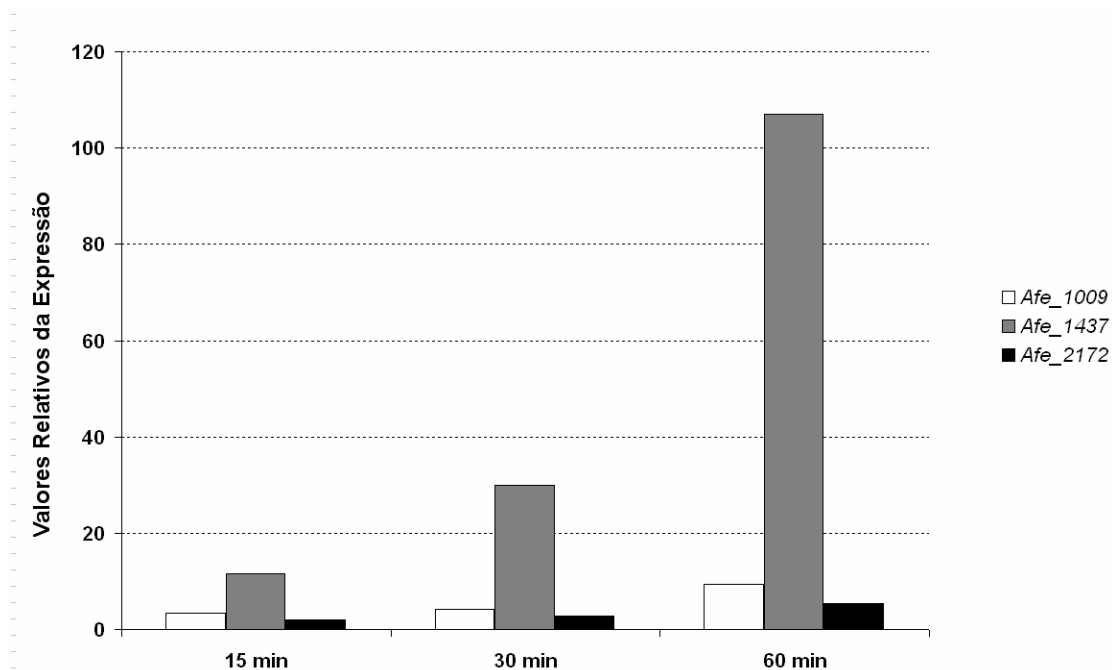
**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos dos três genes de sHSPs em *A. ferrooxidans*.

| Gene     | Tamanho | Pesp<br>Molecular<br>(Da) | pI teórico | Identidade/<br>similaridade<br>com Afe_1009 | Identidade/<br>similaridade<br>com Afe_1437 | Identidade/<br>similaridade<br>com Afe_2172 |
|----------|---------|---------------------------|------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Afe_1009 | 145     | 16934                     | 6.20       | —                                           | 29/58%                                      | 26/47%                                      |
| Afe_1437 | 148     | 16680                     | 5.43       | 29/58%                                      | —                                           | 22/53%                                      |
| Afe_2172 | 134     | 16401                     | 5.60       | 26/47%                                      | 22/53%                                      | —                                           |

### 3.2. Análise da expressão gênica das sHSP em *A. ferrooxidans* LR submetida a um choque térmico

Os níveis dos transcritos dos genes Afe\_1009, Afe\_1437 and Afe\_2172 foram avaliados por RTq-PCR em *A. ferrooxidans* LR crescida a 30°C (controle) e submetida a um choque térmico a 40°C durante 15, 30 and 60 minutos (Figura 1). Os resultados de RTq-PCR indicaram que após 60 minutos, os três genes analisados foram significativamente induzidos ( $P < 0.05$  e *fold change*  $\geq 2.0$ ) apesar de que o nível de expressão do gene Afe\_2172 foi consideravelmente menor em relação aos demais. O maior nível de expressão foi observado para Afe\_1437, que foi 20 vezes maior do que Afe\_2172 e 11.5 vezes maior do que o nível de expressão encontrado para o gene Afe\_1009. Um padrão de expressão semelhante foi observado para o gene Afe\_1437 no trabalho desenvolvido por Xiao et al. (2009). Contudo, nossos resultados de expressão para os genes Afe\_1009 e Afe\_2172 e os resultados obtidos por Xiao et al. (2009) foram bastante diferentes. Contudo, este tipo de comparação pode não ser confiável devido às diferentes linhagens utilizadas nos dois trabalhos e também às diferenças na abordagem experimental.





**Fig 1.** Análise de PCR quantitativo em tempo real para os genes localizados nos locus Afe\_1009, Afe\_1437 and Afe\_2172. Para tanto, as células de *A. ferrooxidans* LR foram submetidas a um choque térmico a 40°C durante 15, 30 e 60 minutos. Os valores de expressão são relativos aqueles obtidos com as células mantidas a 30°C.

Em adição, as diferenças observadas na expressão dos genes sHSPs em *A. ferrooxidans* LR sugerem mecanismos de regulação diferentes. Em um grande número de bactérias, o fator da RNA polimerase sigma 32 ( $\sigma^{32}$ ) regula a expressão de genes que codificam para proteínas do choque térmico de forma temperatura dependente (Allen et al. 1992). Sob outras condições de estresse, a transcrição dos genes de choque térmico é induzida seguida a um rápido e transiente aumento deste fator (Gao et al. 2004). Em decorrência deste fato, uma análise *in silico* foi realizada para deduzir as regiões -10 e -35 dos três genes sHSPs. Os resultados indicaram que os três genes apresentam

possíveis promotores para  $\sigma^{32}$  (Figura 2). No trabalho conduzido por Xiao et al. (2009), promotores para  $\sigma^{32}$  foram encontrados apenas para os genes Afe\_1437 e Afe\_2172. Contudo, as diferenças obtidas por ambos os trabalhos podem ser explicadas pelas distintas estratégias de análise *in silico* escolhidas.

Em *A. ferrooxidans*, a região -35 do sítio de ligação ao  $\sigma^{32}$  parece ser mais onservado do que a região -10. Esta mesma característica dos sítios de ligação ao  $\sigma^{32}$  é vista em *V. cholerae* e *E. coli* (Slamti et al. 2007). Apesar das diferenças nos níveis de expressão observadas para os genes *sHSPs*, as análises de bioinformática não revelaram nenhum outro tipo de mecanismos de regulação (resultados não mostrados). Contudo, mecanismos de regulação alternativos são possíveis para genes *sHSPs*. Munchbach e co-autores (1999) identificaram, através de eletroforese subtrativa um grupo de 10 sHSPs em *B. japonicum* submetido a um aumento na temperatura de 28°C para 43°C. Estes autores observaram que a quantidade de sHSP observada foi bastante diferente, sugerindo um repertório de mecanismos regulatórios para genes que codificam sHSP.

AFE\_1009:

-35 (7.3 bits)                      -10 (3.8 bits)

TGCGGGAATCCATTGCTATAATGAAATGGACTGGCGTTGAGATTCAACA

▼

GCGCAGCGCCAGGCCTTGCCGGACAGAACGCGGGCGATCCTGCAAGGTG

Met

AGGGCCCCGTCCCGCATCATTGAGGAGCAATAACATG

AFE\_1437:

-35 (7.3 bits)                      -10 (3.4 bits) ▼

ACTCGTACCCATAACGTTGCATGCCAGAGTCCAGGCGTACAGTCGCTTG

Met

GCTGGCGTCCTATTGATGCCCGTGAAGGAGGTGTAAATG

AFE\_2172:

-35 (5.4 bits)                      -10 (4.5 bits)

CCCGGCGTCAGCCTGGTTGTCGCCGCCAGGCTGGAGAGGTATAGCCGCA

▼

AAAATACGCTACAATATTGGGACGTCATGGACGCCGATCAGGGGGAGTG

Met

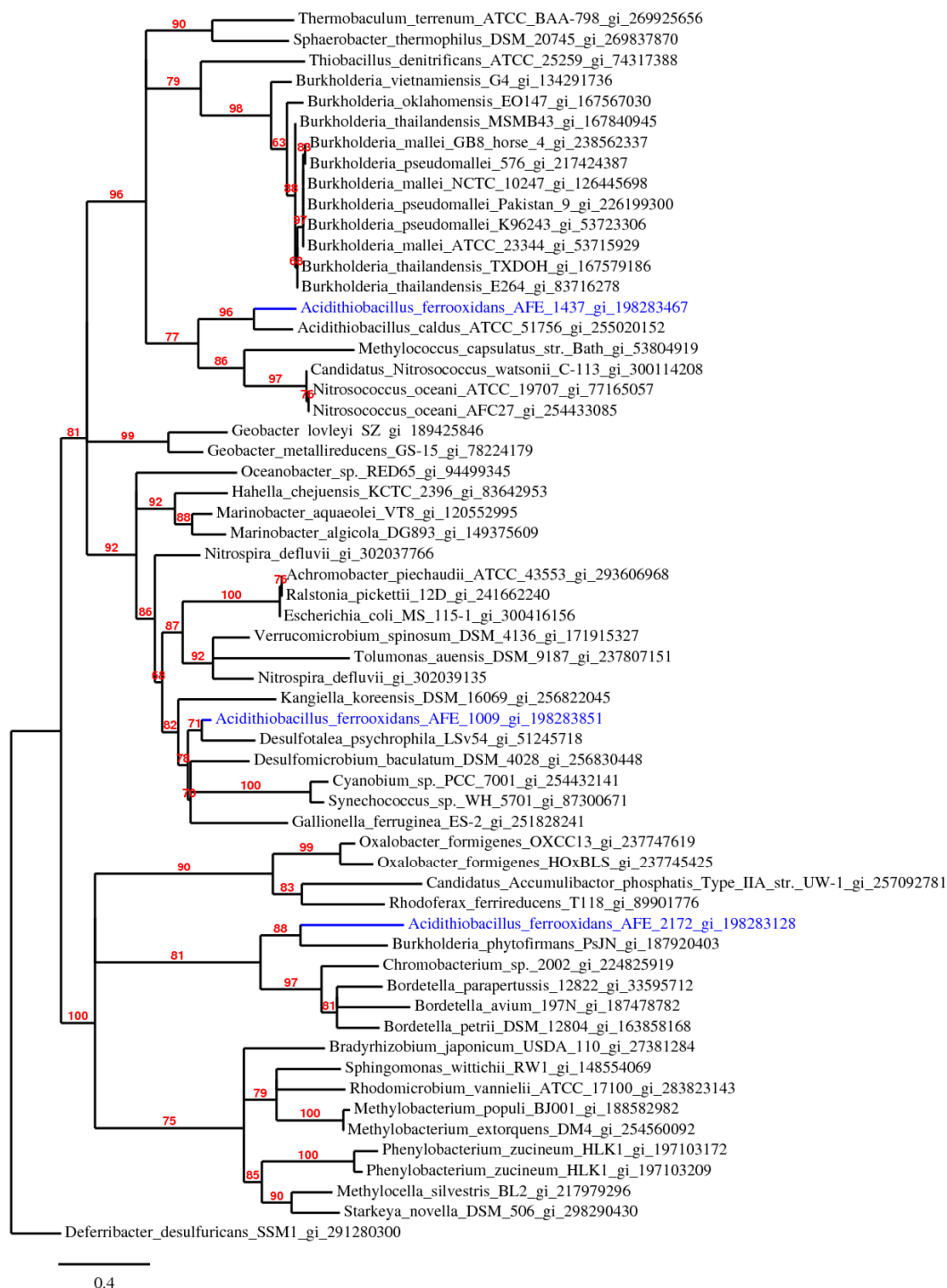
GGGGATG

**Fig 2** Sequência de nucleotídeos da região 5'-amontante dos genes Afe\_1009, Afe\_1437 e Afe\_2172, que codificam sHSPs em *A. ferrooxidans*. Sítios de início da transcrição foram preditos pelo programa BPROM e as são indicados pelas letras sombreadas. Sequências promotoras reconhecidas por  $\sigma^{32}$  são indicadas pelo triângulo (▼). O primeiro códon da sequência é indicado pelas letras nas caixas. O conteúdo total de informação dos sítios para ligação do  $\sigma^{32}$  (-35 e -10) é mostrado em *bits*.

### 3.3. Análise filogenética e análise comparativa das sequências

A análise filogenética de máxima verossimilhança (MV) sugere que as *small heat proteins* estudadas neste trabalho não são parálogos recentes (Figura 3). Este achado está de acordo com a baixa similaridade entre as sequências das sHSPs de *A. ferrooxidans* (Tabela 2 e Figura 3). A divergência de sequências entre as sHSPs de *A. ferrooxidans* pode ser uma consequência de uma evento de transferência horizontal de um gene ou mesmo de dois; contudo, a possibilidade de uma divergência evolutiva (Ingram 1961) causada por diferentes pressões evolutivas não pode ser

descartada. Para obter mais informações a respeito da origem das sHSPs de *A. ferrooxidans* sHSPs foi comparado o conteúdo de CG de cada gene com a média do conteúdo de CG do genoma de *A. ferrooxidans* (~59% of CG). O Conteúdo de CG do gene Afe\_1437 (46.53%) e Afe\_1009 (47.71%) foram estatisticamente diferentes da média do genoma ( $p < 0.01$ ;  $\chi^2 = 11.7766$  and  $\chi^2 = 9.4510$ , respectivamente) enquanto que para gene Afe\_2172 (58.76%) a diferença não foi significativa ( $\chi^2 = 0.1025$ ). Estes achados sugerem que os genes Afe\_1437 e Afe\_1009 podem ter sido herdados horizontalmente por *A. ferrooxidans*. Interessantemente, a espécie *A. caldus*, pertencente ao mesmo gênero que *A. ferrooxidans* possui apenas um gene sHSP que representa um possível ortólogo do gene Afe\_1437 de *A. ferrooxidans*. Considerando a hipótese da origem por transferência horizontal dos genes Afe\_1437 e Afe\_1009 é possível que *A. caldus* tenha perdido o ortólogo Afe\_2172 (possível sHSP original) e teria mantido o ortólogo Afe\_1437. Neste cenário, a transferência horizontal que teria originado o gene Afe\_1437 ocorreu antes da divergência entre as duas espécies.



**Fig 3** Relações filogenéticas deduzidas entre sHSP de *A. ferrooxidans* e sHSP de bactérias relacionadas. As 20 sequências protéicas mais relacionadas para cada sHSP de *A. ferrooxidans* sHSP foram recuperadas por blastp contra 1295 genomas completos de bactérias. A topologia foi obtida por MV usando 76 resíduos de aminoácidos. Distâncias foram calculadas pela matriz PAM matrix e a confiança estatística dos nós foi calculada com o teste aLRT. Ramos com valores de aLRT

menores que 50% foram colapsados. Números de acesso ao GeneBank são mostrados em frente a cada espécie.

Figura 4 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos das três sHSP de *A. ferrooxidans* com outras sequências de sHSP, incluindo sequências da subdivisão gama-proteobacteria. Como mostrado na Figura 4, as sHSPs de *A. ferrooxidans* carregam um domínio  $\alpha$ -crystalino bem conservado e todos os elementos considerados essenciais para sua oligomerização e, portanto, para a atividade chaperona. Contudo, a proteína Afe\_2172 tem uma região C-terminal muito curta o que é observado raramente em sHSPs de outras bactérias. A única exceção é uma sHSP de *Bordetella avium*, uma bactéria que causa doença do trato respiratório superior em aves (Figura 4). Esta característica pode tanto diminuir a habilidade desta proteína em formar oligômeros ou diminuir a habilidade em modular sua atividade chaperona. Contudo, a região C-terminal das sHSPs de algumas bactérias apresenta resíduos de cisteína bastante conservados. Estes resíduos parecem habilitar as sHSPs em detectar mudanças sob condições oxidantes e traduzir essas mudanças em diferentes conformações protéicas e atividade chaperona (Graf and Jacob 2002). Em adição, em algumas espécies de plantas, uma sequência rica em metionina na região N-terminal vem sendo correlacionando com um controle redox da atividade chaperona e da dinâmica do oligômero (Gustavsson et al. 2001). Contudo, estes resíduos de metionina no C-terminal não foram encontrados nas sHSPs filogeneticamente relacionados com *A. ferrooxidans* (Figura 4), o que sugere ausência deste tipo de controle das sHSPs pertencentes a subdivisão gama-proteobacteria.

A região N-terminal não mostrou identidade de sequência com outras sHSPs com atividade chaperona bem definida (grupos C e D), mas ferramentas de predição de estrutura secundária indicaram que todas as sequências analisadas possuem uma propensão em formar  $\alpha$ -helices que são consideradas elementos chaves para a ligação do substrato e estabilização da estrutura oligomérica. Além do mais, a região N-terminal sozinha foi capaz de interagir com proteínas denaturadas (Fu et



### 3.4. Modelagem estrutural das sHSPs de *A. ferrooxidans*

Modelos tridimensionais das proteínas codificadas pelos genes Afe\_1009, Afe\_1437 e Afe\_2172 mostraram excelente propriedades esteroquímicas global e local com *Z-score* (PROSA server) de aproximadamente -3.5 e todos os resíduos encontrados dentro da região permitida do gráfico de Ramachandran.. Um bom *Z-score* significa que está dentro de um intervalo de scores tipicamente encontrado para proteínas nativas de tamanho similar. Análises de RMSD entre um modelo estrutural e os modelos resultantes resultaram em valores abaixo 0.5 Å para a cadeia principal do domínio  $\alpha$ -crystalino, sugerindo que esses modelos são adequados para análise estrutural e comparativa.

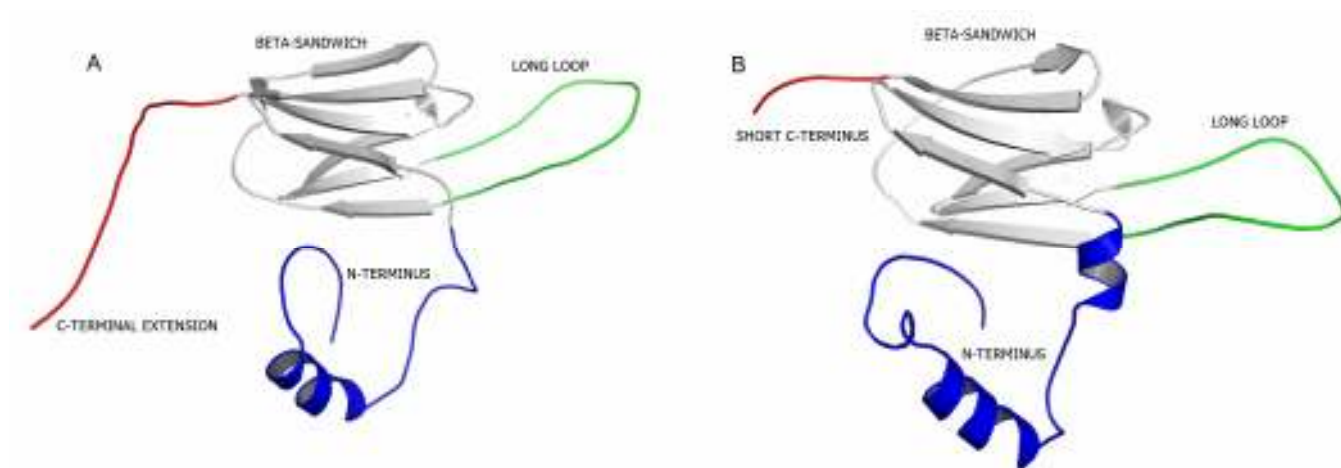
Os modelos do domínio  $\alpha$ -crystalino das proteínas codificadas pelos genes Afe\_1009, Afe\_1437 e Afe\_2172 dividem características estruturais similares com outras sHSPs de organismos procariotos e eucariotos. Este domínio (resíduos 46-135) mostra uma estrutura de  $\beta$ -sanduiche composta por 7 fitas  $\beta$  em duas folhas (Figura 5). A região N-terminal (resíduos 1-45) engloba duas hélices, somente observada na estrutura do trigo - wHSP16.9 (van Montfort et al. 2001). Na estrutura wSHP16.9, as hélices N-terminal participam na estabilização da estrutura oligomérica fazendo interações com o domínio  $\alpha$ -crystalino adjacente (van Montfort et al. 2001). A extensão C-terminal (136-148) apresenta uma conformação helicoidal aleatória e tem um papel fundamental na formação do estado oligomérico. Contudo, diferentemente das proteínas codificadas pelos genes Afe\_1437 e Afe\_1009, a proteína codificada pelo gene Afe\_2172 tem um C-terminal encurtado raro que pode prevenir a formação de um oligômero estável e pode estar envolvido na modulação da atividade chaperona. Canonicamente, a alça longa, que é responsável pela dimerização, é totalmente preservada e a identificação das regiões funcionais por mapeamento de superfície de informações filogenéticas, como implementado no servidor ConSurf Web (Goldenberg et al. 2009),



indica que todos resíduos considerados essenciais para dimerização são bem conservados nas três sHSPs de *A. ferrooxidans*.

A fim de obter informações sobre o estado oligomérico das proteínas codificadas pelos genes Afe\_1437 e Afe\_1009, que possuem o C-terminal estendidos, foi realizada uma análise acurada dos determinantes para a montagem do disco dublo dodecâmero (wHSP16.9) ou da concha esférica composta por 24 monômeros (MjHSP16.5). Em ambas as estruturas wHSP16.9 e MjHSP16.5, as interações intermoleculares feita pela extensão C-terminal são virtualmente idênticas, apesar do fato de que o C-terminal de wHSP16.9 requer duas orientações diferentes para formar o oligômero. Esta capacidade do C-terminal adotar duas conformações reside nos segmentos de aminoácidos entre as folhas  $\beta$  9 e  $\beta$  10 que permitem o movimento de uma dobradiça. Analisando os contatos do C-terminal na estrutura MjHSP16.5, observamos que o segmento entre as vertentes  $\beta$  9 e 10  $\beta$  adota uma conformação estabilizada por ligações de hidrogênio entre os átomos O $\epsilon$ Glu137 e N $\epsilon$ Gln52, e do oxigênio da carbonila do átomo Glu137 e N $\zeta$ Lys142. Surpreendentemente, estes contatos não são encontradas na estrutura wHSP16.9 por causa da presença de um segundo resíduo de Prolina na posição 142, o que incapacita o dobramento do segmento em um motivo estável gerando um resíduo do segmento 6 (KAEVKK), com alta flexibilidade, que é o que permite a articulação do movimento. Nas sequências proteicas de Afe\_1437 e Afe\_1009, este segmento não contém tal resíduo de prolina na mesma posição relativa e os resíduos que povoam este segmento tem todos os requisitos para formar um motivo estável, da mesma forma que a estrutura MjHSP16.5. Assim, com base em nossos achados estruturais, sugerimos que tanto a proteína Afe\_1437 quanto a Afe\_1009 se comportam como a sHSP procariótica de *M. jannaschii* que adota uma configuração de 24 moléculas esféricas em forma de concha. No entanto, alguns dados experimentais obtidos por qualquer técnica que forneça informações sobre o comportamento hidrodinâmico como espalhamento de luz dinâmico,

análise de ultra-centrifugação, cromatografia por exclusão de tamanho e de espalhamento de raios-X são necessários para confirmar nossas previsões *in silico*.



**Fig. 5** Representação da estrutura modelada da proteína codificada pelo gene Afe\_1009 e Afe\_1437 (A) e Afe\_2172 (B). O domínio do B- sanduíche, alça longa, as regiões N- e C-terminais são coloridos de cinza-claro, verde, azul escuro e vermelho, respectivamente.

## Referências

- Allen SP, Polazzi JO, Gierse JK, Easton AM (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol 174(21):6938-6947
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate and powerful alternative. Syst Biol 55:539-552
- Carlos C, Reis FC, Vicentini R, Madureira DJ, Ottoboni LMM (2008) The *rus operon* genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. Curr Microbiol 57:375–380
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DJ, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series programs. Nucleic Acids Res 31:3497-3500
- DeLano WL The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San Carlos CA USA
- Dayhoff MO, Schwartz RC, Orcutt BC (1978) A model of evolutionary change in proteins. In: M.O.Dayhoff (ed) Atlas of protein sequence and structure, 5(3), Silver Spring,pp 301-310
- Eisenberg D, Lüthy R, Bowie JU (1997) VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Methods Enzymol 277:396-404
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60:2126-2132
- Fiser A, Sali A (2003) Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. Methods Enzymol 374:461-491

- Fu X, Zhang H, Zhang X, Cao Y, Jiǎo W, liu C, Song Y, Abulimiti A, Chang Z (2005) A dual role for the N-terminal region of *Mycobacterium tuberculosis* Hsp 16.3 in self-oligomerization and binding denaturing substrate proteins. J Biol Chem 280:6337-6384
- Gao H, Wang Y, Liu X, Yan T, Wu L, Alm E, Arkin A, Thompson DK, Zhou J (2004) Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Shewanella oneidensis*. J Bacteriol 186 (22):7796-7803
- Garcia Jr O, da Silva LL (1991) Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. Biotechnol Lett 13:567-570
- Giese KC, Basha E, Catague BY, Vierling E (2005) Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein *in vivo*, independent of *in vitro* chaperone activity. Proc Natl Acad Sci USA 102(52):18896-18901.
- Goldenberg O, Erez E, Nimrod G, Ben-Tal N (2009) The ConSurf-DB: pre-calculated evolutionary conservation profiles of protein structures. Nucleic Acids Res 37:D323–D327
- Graf PCF, Jakob U (2002) Redox-regulated molecular chaperones. Cell Mol Life Sci 59:1624-1631
- Gustavsson N, Kokke BP, Anzeilius AB, Boelens WC, Sundby C (2001) Substitution of conserved methionines by leucines in chloroplast small heat shock protein results in loss of redox-response but retained chaperone-like activity. Protein Sci 10:1785–1793
- Han MJ, Yun H, Lee SY (2008) Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. Biotechnol Adv 26:591-609
- He Z, Zhong H, Hu Y, Xiao S, Liu J, Xu J, Li G (2005) Analysis of differential-expressed proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under phosphate starvation. J Biochem Mol Biol 38(5):545-549
- Horwitz J (1992) Alpha-crystallin can function as molecular chaperone. Proc Natl Acad Sci USA 89:10449-10453

- Ingram VM (1961) Gene evolution and the haemoglobins. *Nature* 4(189):704-708
- Kelly DP, Wood AP (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:511-516
- Kuczynska-Wisnik D, Laskowska E, Taylor A (2001) Transcription of the *ibpB* heat-shock gene is under control of  $\sigma^{32}$  and  $\sigma^{34}$  promoters, a third regulon of heat-shock response. *Biochem Biophys Res Commun* 284:57-64
- Laksanalamai P, Robb FT (2004) Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles* 8(1):1-11
- Lindahl E, Hess B, van der Spoel D (2001) GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model* 7:306-317
- Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 55:1151-1191
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative RTq-PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  method. *Methods* 25:402-408
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16(4):404-405
- McGuffin LJ, Jones DT (2003) Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition *Bioinformatics* 19(7):874-881
- Münchbach M, Nocker A, Narberhaus F (1999) Multiple small heat shock proteins in Rhizobia. *J Bacteriol* 181(1):83-90
- Paulino LC, Mello MP, Ottoboni LMM (2002) Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 23:520-527

- Rawlings DE (2005) Characteristics and adaptability of iron and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb cell fac* 4(13):1-15
- Reents H, Münch R, Dammeyer T, Jahn D, Härtig E (2006) The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188:1103-1112
- Roy SK, Hiyama T, Nakamoto H (1999) Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an alpha-crystallin-related, small heat shock protein. *Eur J Biochem* 262(2):406-416
- Schneider TD (1997) Information content of individual genetic sequences. *J Theor Biol* 189:427-441
- Slamti L, Livny J, Waldor MK (2007) Global gene expression and phenotypic analysis of a *Vibrio cholerae* *rpoH* deletion mutant. *J Bacteriol* 189(2):351-362
- Sun Y and MacRae TH (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci*, 62: 2460-2476
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599
- Tomoyasu T, Takaya A, Sasaki T, Nagase T, Kikuno R, Morioka M, Yamamoto T (2003) A new heat shock gene, *AgsA*, which encodes a small chaperone involved in suppressing protein aggregation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 185(21):6331-6339
- Tuovinen OH, Kelly DP (1972) Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. *Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie* 12:311-346
- Usui K, Hatipoglu OF, Ishii N, Yohda M (2004) Role of the N-terminal region of the crenarchaeal sHSP, Sthsp14.0, in thermal-induced disassembly of the complex and molecular chaperone activity. *Biochem Biophys Res Commun* 315:113-118
- van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Mol Biol* 8(12):1025-30

- Xiao S, Chao J, Wang W, Fang F, Qui G, Liu X (2009) Real-time RTq-PCR analysis of the heat-shock response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Folia Biol (Praha)* 55(1):1-6
- Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V (2004) Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiol* 150:2113-2123
- Wiederstein M, Sippl MJ (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 35: W407-W410
- Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, Sykes BD, Wishar DS (2003) VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res* 31(13):3316-3319

## CAPÍTULO 7 - DISCUSSÃO

Nos últimos tempos, questões relacionadas à preservação ambiental tem ganhado muita importância em todo o mundo. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, por ser um microrganismo extremamente versátil, vem sendo alvo de muitos estudos que visam o seu emprego em processos que prometem amenizar os prejuízos ambientais, como a biolixiviação. O grande desafio é tornar tais processos economicamente viáveis. Para tanto, a detenção de conhecimento sobre todos os parâmetros que envolvem tais processos se torna imprescindível. Assim, a metodologia de estudo aqui proposta, combina técnicas que permitem uma boa avaliação sobre a resposta da bactéria *A. ferrooxidans* a fatores estressantes encontrados em seu ambiente.

Com base em dados proteômicos, obtidos por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, verificamos que o perfil protéico de *A. ferrooxidans* foi significativamente afetado mediante o crescimento sob uma temperatura mais elevada e sob privação de um nutriente essencial como o fósforo. Seguindo-se à separação das proteínas por eletroforese bidimensional, foi realizada uma análise da variância biológica utilizando o software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, USA) e o número de proteínas identificadas com nível de confiança de pelo menos 95% ( $p \text{ value} \geq 0.05$ ) foi reduzido para 44 (~28%).

Dentre as 44 proteínas significativamente alteradas, 30 foram identificadas em células de *A. ferrooxidans* crescidas a 40°C, sendo que 18 mostraram-se reprimidas (Tabela 2 – capítulo 4). As proteínas reprimidas foram identificadas como fazendo parte de diferentes categorias funcionais o que pode ser um reflexo de uma homeostasia celular afetada e, de uma atividade metabólica diminuída em decorrência do esforço para reverter o estresse através da ativação da “*heat shock*”



*response*”. Esta resposta pode ser observada pela indução de proteínas como DnaK e GroEL, identificadas no crescimento a 40°C (Lindquist, 1986).

De forma semelhante, o crescimento de *A. ferrooxidans* mediante a privação de fosfato provocou a redução da síntese de 10 das 14 proteínas identificadas, mais uma vez indicando um desvio do metabolismo bacteriano em prol da síntese de proteínas envolvidas na resposta ao estresse.

Como uma forma de verificar a condição afetada de *A. ferrooxidans* pelos estresses estudados nesta tese, uma análise da morfologia das células foi empregada visto que a morfologia dos micro-organismos usualmente sofre mudanças em decorrência de variações no ambiente. Para tanto, foi empregada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). MEV é uma técnica que tem sido largamente usada no estudo de efeitos de ambientes estressantes em células bacterianas (Ritz *et al.*, 2001), como por exemplo, na análise de alterações morfológicas em *Pseudomonas pseudoalcaligenes* submetida a temperaturas elevadas (Shi & Xia, 2003). As diferenças observadas para *A. ferrooxidans* foram confirmadas pelo teste estatístico de Hotelling, mostrando que as células crescidas a 40°C e sob privação de fosfato diferem significativamente das células controle, assim como diferem entre si. Esse resultado está de acordo com Shi & Xia (2003), ao verificarem células alongadas e deformadas de *P. pseudoalcaligene* após o cultivo em temperaturas elevadas e com Seeger e Jerez (1993) que mostraram células alongadas de *A. ferrooxidans* em consequência do crescimento na ausência de fosfato.

Em acréscimo, foi realizada uma análise discriminante ou análise dos componentes principais para detectar variações dos parâmetros avaliados (Daly, 1985). A análise de componentes principais consiste basicamente em resumir um conjunto grande de medidas, em poucos componentes principais, que podem informar a maior parte da variabilidade da amostra e, quando esses componentes são plotados um contra o outro, pode ocorrer a formação de grupos. As funções discriminantes (ou canônicas) são combinações de variáveis que melhor discriminam grupos

definidos a priori (Reis, 1988). Portanto, a análise discriminante é uma técnica confirmatória, tendo sido capaz, no presente estudo, de definir dois grupos: controle e tratamentos. Assim, as imagens obtidas mostraram haver uma forte evidência de que o crescimento a 40°C e sob a privação de fosfato representam fatores de estresse à *A. ferrooxidans*. De fato, a morfologia celular foi um dos fatores demonstrados influenciarem na termoresistência adquirida por *Listeria monocitogenes* (Rowan & Anderson, 1998). É possível propor que o alongamento celular seja uma resposta generalizada a situações de estresse.

As alterações morfológicas observadas em *A. ferrooxidans* possivelmente derivam de alterações na membrana bem como na parede celular. Estes componentes externos são principalmente constituídos por fosfolípidos e polissacarídeos (Yu and Irudayaraj 2004). Uma ferramenta que vem sendo muito utilizada na microbiologia para o estudo de componentes celulares é o FTIR. Assim, o FTIR por reflectância difusa foi utilizado para verificar se, de fato, tais componentes celulares são afetados pelas condições de estresse estudadas.

Análises preliminares dos espectros obtidos mostraram não haver nenhuma distinção aparente entre os espectros obtidos para o grupo controle e os grupos tratamentos - 40°C e privação de fosfato. Para detectar diferenças entre esses grupos de amostras, foi utilizada uma análise por componentes principais (PCA). Assim, foram construídos modelos baseados na primeira derivada do espectro inteiro. Porém, não foram obtidos bons resultados para a separação dos dois grupos. Então, os espectros foram divididos em regiões e a região que apresentou melhores resultados foi a região situada entre 850 e 1275 cm<sup>-1</sup>, que é a região referente ao “*fingerprint*” metabólico. Foi realizada, também, a primeira derivada desta região e o PCA se mostrou capaz de fazer uma excelente separação entre os dois grupos de amostras, evidenciando alterações nas regiões correspondentes a carboidratos, fosfoproteínas e fosfolípidos, que constituem os principais componentes das paredes celulares (Yu and Irudayaraj 2004). Sendo *A. ferrooxidans* uma bactéria quimiolitotrófica,

as modificações observadas nos comprimentos de onda relativos a carboidratos podem indicar que a fixação de carbono é afetada quando *A. ferrooxidans* é mantida em temperatura elevada e sob privação de fosfato, como já havia sido observado por Seeger and Jerez (1993). Estes resultados confirmam as alterações morfológicas observadas pela MEV.

Como mencionado acima e anteriormente proposto por Jerez (1988) e Xiao et al. (2009), *A. ferrooxidans* desenvolve uma resposta ao estresse através da indução da expressão de genes que compõem a resposta ao choque térmico (*heat shock response*). Com o objetivo de verificar a modulação desta resposta em decorrência de um estresse térmico, alguns genes codificantes de proteínas do choque térmico foram estudados nesta tese através de qPCR. Esses genes foram escolhidos devido ao fato de que proteínas do choque térmico (HSP) funcionam como termosensores celulares, havendo uma superprodução das mesmas em momentos críticos para a sobrevivência da célula e uma queda a níveis normais ou mesmo uma repressão quando essa situação é vencida, caracterizando um estado de termotolerância e/ou adaptação (Craig & Gross 1991). Conforme esperado, os genes que codificam HSPs analisados apresentaram um alto nível de indução mediante o choque térmico e foram ou reprimidos ou inalterados mediante o crescimento prolongado a 40°C, indicando que *A. ferrooxidans* consegue, rapidamente, se adaptar a um aumento de 10°C na temperatura ótima de crescimento.

Com o intuito de averiguar outras funções do metabolismo de *A. ferrooxidans*, genes de diversas categorias funcionais também foram submetidos ao mesmo tipo de análise e, foi verificado que genes pertencentes às categorias relacionadas ao metabolismo energético, biosíntese de cofatores, divisão celular e transporte de substâncias foram, de alguma forma, afetados pelo estresse térmico, sugerindo certa “essencialidade” destes genes na sobrevivência da bactéria. Interessantemente vários genes relacionados ao sistema de transporte de ferro, os receptores de Fe<sup>3+</sup> dependentes da energia do sistema TonB, foram afetados pela temperatura, sugerindo que o

crescimento em temperaturas elevadas pode afetar a capacidade de *A. ferrooxidans* utilizar ferro. Resultados da análise proteômica já haviam sugerido essa condição afetada em *A. ferrooxidans* ao identificarmos que a proteína rusticianina foi reprimida mediante o crescimento a 40°C. Rusticianina é a proteína mais abundante em células de *A. ferrooxidans* crescidas em ferro (Cox and Boxer 1978) e baixos níveis de produção desta proteína foram justamente correlacionados com um baixo nível de ferro (Yarzabal et al., 2004; Carlos et al., 2008).

Voltando aos resultados de qRT-PCR, os dados obtidos para expressão dos 40 genes analisados mostrou que 31 deles responderam positivamente ou negativamente à temperatura. Buscando um melhor entendimento desta resposta, iniciou-se uma busca por possíveis reguladores desses genes através de análises de bioinformática. Pelo menos três diferentes mecanismos podem regular a expressão de HSPs em bactérias. Na maioria dos organismos, fatores sigma alternativos, como  $\sigma^{32}$  e/ou  $\sigma^{54}$ , induzem a transcrição desses genes sob condições de estresse (Kuczyanska-Wisnik *et al.*, 2001). Controle negativo da transcrição, como o repressor RheA, foi demonstrado em *Streptomyces albus albus* (Servant *et al.*, 1999) e um controle pós-transcricional através de uma sequência conservada na região 5' não-traduzida (5'-UTRs) de genes que codificam sHSPs foi demonstrado em rizóbios (Nocker *et al.* 2001). Essa sequência, denominada ROSE (*Repression Of heat Shock gene Expression*), é um sistema de regulação que funciona como um elemento *cis* que bloqueia o sítio de ligação ao ribossomo pela formação de uma alça (Nocker *et al.* 2001). Os resultados da análise de bioinformática foram positivos apenas para os sítios de ligação para  $\sigma^{32}$  e somente para os genes AFE\_0003, AFE\_2891, AFE\_1217, AFE\_2238, AFE\_0439, AFE\_0440, AFE\_2495, AFE\_1122, AFE\_2134, AFE\_2517, AFE\_0796, e AFE\_1054. Assim, os mecanismos que regulam a resposta de *A. ferrooxidans* ao aumento da temperatura ainda precisam ser melhor elucidados.

No entanto, apesar de termos encontrado sítios de ligação para  $\sigma^{32}$  nos genes que codificam sHSPs (*small heat shock protein*), AFE\_1009, AFE\_1437 e AFE\_1272 e nenhum outro tipo de regulação ter sido encontrado pelas análises de bioinformática, uma investigação filogenética foi realizada para se obter informações que ajudassem a entender a diferença na expressão dos genes em questão.

Análises da árvore filogenética construída usando as sequências de aminoácidos das sHSPs em estudo sugerem que os genes que as codificam são não-parálogos. Assim, é possível que estes genes não tenham se originado de uma recente e exclusiva duplicação em *A. ferrooxidans*. Isso reflete a baixa similaridade entre as sequências protéicas dessas sHSPs. Esse dado está de acordo com relatos prévios da literatura de que sHSPs de um mesmo organismo apresentam baixo nível de similaridade (Laksanalamai & Robb, 2004). Aparentemente, os genes localizados nos *loci* AFE\_1437 e AFE\_1009 são mais relacionados entre si do que com o gene localizado no *locus* AFE\_2172. Essa divergência das sequências pode ser atribuída a uma evolução divergente (Ingraham, 1961) ocasionada por diferentes pressões evolutivas em *A. ferrooxidans*. Uma consequência desse evento poderia ser uma especialização funcional destas proteínas, o que explicaria os diferentes níveis de mRNA para os respectivos genes. Porém, transferência horizontal de genes pode, também, ter sido a origem desses genes em *A. ferrooxidans*. Neste caso, os genes em questão teriam origens filogenéticas diferentes o que poderia explicar a divergência observada. Corroborando esses dados, nós desenvolvemos modelos estruturais teóricos das proteínas codificadas pelos genes em questão e verificamos uma grande similaridade entre as proteínas codificadas pelos genes AFE\_1437 e AFE\_1009. O modelo obtido para a proteína codificada por AFE\_2172, mostrou uma região c-terminal bastante curta. A região c-terminal é proposta estar envolvida na atividade de chaperona (Sun et al. 2005), sugerindo uma ação diminuída desta proteína na proteção contra o estresse térmico o que explicaria o menor nível de expressão deste gene.

Por fim, este trabalho mostra a diversidade de respostas de *A. ferrooxidans* a condições de estresse e fornece evidências de que o uso de uma linhagem adaptada a temperaturas mais elevadas pode favorecer o processo de biolixiviação. Além do mais, este trabalho pode fornecer dicas a respeito de um bom marcador molecular para o processo, como por exemplo, a proteína rusticianina.

## CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES

1. Os estresses térmico e nutricional provocaram alongamento nas células de *A. ferrooxidans* LR, sugerindo que o alongamento celular seja uma resposta generalizada a situações de estresse.
2. Alterações nos números de onda do espectro infravermelho foram identificadas na região de carboidratos, fosfolipídeos e fosfoproteínas o que indica alterações no envelope celular.
3. A análise proteômica evidenciou que ocorreu uma diminuição do metabolismo bacteriano, além de identificar alterações na expressão de proteínas chaves para o metabolismo oxidativo/energético e resposta ao estresse.
4. Os genes que codificam para proteínas de choque térmico apresentaram um nível maior de expressão após 1 hora de choque, sugerindo seu envolvimento em um possível processo de adaptação.
5. A proteína ClpB apresentou maior nível de expressão quando comparada às outras proteases, o que pode ser um indício de um mecanismo de ação independente e energeticamente mais econômico para a célula.
6. A sHSP localizada no locus AFE\_1437 apresentou maior nível de expressão em relação as outras sHSPs.
7. Análises filogenéticas por NJ sugeriram que as três sHSPs são proteínas não parálogas.
8. As sHSPs localizadas nos *loci* AFE\_1009 e AFE\_1437 são mais relacionadas entre si do que aquela localizada no *locus* AFE\_2172. É possível que a presença destas três proteínas tenha surgido de um evento de transferência horizontal.

9. A modelagem molecular indicou que as sHSPs 1009 e 1437 possuem regiões C e N-terminais bem similares com MjHSP15.4 de *M. janaschii*. Porém, a sHSP 2172 apresenta C-terminal curto, o que a diferencia das demais sHSPs.



## REFERÊNCIAS

- Allen MB (1953) The thermophilic aerobic spore-forming bacteria. *Bacteriol. Rev* 17:125–173.
- Almeida NF, Setubal JC (1998) Um Modelo Oculto de Markov para encontrar promotores em sequências de DNA. Relatório Técnico, IC-98-37. UNICAMP, Campinas, SP.
- Amaro AM, Seeger M, Arredondo R, Moreno M, Jerez CA (1993) The growth conditions affect *Thiobacillus ferrooxidans* attachment to solids, p. 577–585. In A. E. Torma, M. L. Apel, and C. L. Brierley (ed.), *Biohydrometallurgical technologies*. The Minerals, Metals and Material Society, Warrendale, Pa.
- Appia-Ayme C, Guilian N, Ratouchniak J, Bonnefoy V (1999) Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa(3)-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl Environ Microbiol* 65(11):4781-4787.
- Appia-Ayme C, Quatrini R, Denis Y, Denizot F, Silver S, Roberto F, Veloso F, Valdés J, Cárdenas JP, Esparza M, Orellana O, Jedlick E, Bonnefoy V, Colmes D (2006). Microarray and bioinformatics analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hidrometallurgy* 83:263-272.
- Arsene F, Tomoyasu T, Bukau B (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Intern J Food Microbiol* 55:3-9.
- Arthur H, Watson K (1976) Thermal adaptation in Yeast: Growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic and thermophilic yeasts. *J Bacteriol* 128(1):56-68.
- Bennett JW (1989) Limitations on pyrite oxidation rates in dumps set by transport mechanisms. In: *Proceedings of International Symposium on Biohydrometallurgy*, 309-314.
- Bochkareva ES, Girshovich A, Bibi E (2002) Identification and characterization of the *Escherichia coli* stress protein UP12, a putative in vivo substrate of GroEL. *Eur J Biochem*. 269:3032-3040.

- Bosecker K (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. FEMS Microbiol Rev 20: 591-604.
- Brown SD (1995) Chemical systems under indirect observation: Latent properties and hemometrics. Appl Spectrosc 49(12):14A-31A.
- Bruscella P, Appia-Ayme C, Levican G, Ratouchniak J, Jedlicki E, Holmes DS, Bonnefoy V (2007) Differential expression of two bc1 complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. Microbiol 153(1):102-110.
- Bukau B (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. Mol Microbiol 9:671-680.
- Butcher BG, Deane SM, Rawlings DE (2000) The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 66(5):1826-1833.
- Carlos C, Reis FC, Vicentini R, Madureira DJ, Ottoboni LMM. (2008) The rus operon genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. Curr Microbiol 57:375-380.
- Christophersen J (1973) Basic aspects of temperature action on microorganisms In: Shi B, Xia X (2003) Morphological changes of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in response to temperature selection. Curr Microbiol 46:120-123.
- Cordwell SJ (2006) Technologies for bacterial surface proteomics. Curr Opin Microbiol 9:320-329.
- Costa CS, Anton DN (1999) Conditional lethality of cell shape mutations of *Salmonella typhimurium*: rodA and mre mutants are lethal on solid but not in liquid medium. Curr Microbiol 38:137-142.
- Cox JC, Boxer DH (1978) The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron (II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. Biochem J 174:497-502.
- Craig EA, Gross CA. (1991) Is hsp70 the cellular thermometer? Trends Biochem Science 16: 135-140.

Daly HV (1985) Insect morphometrics. *Ann Rev Entom* 30: 415-438.

Deveci H, Akcil A, Alp I (2004) Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron. *Hydrometallurgy* 73:293-303.

Dominy, CN Deane SM, Rawlings DE (1997) A geographically widespread plasmid from *Thiobacillus ferrooxidans* has genes for ferredoxin-, FNR-, prisma- and NADH-oxidoreductase-like proteins which are also located on the chromosome. *Microbiol* 143:3123-3136.

Dopson M, Halinen AK, Rahunen N, Ozkaya B, Sahinkaya E, Kaksonen AH, Lindstrom EB, Puhakka JA (2006) Mineral and iron oxidation at low temperatures by pure and mixed cultures of acidophilic microorganisms. *Biotechn and bioeng* 97(5):1205-1215.

Dougan DA, Reid BG, Horwich AL, Bukau B (2002) ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol Cell* 9:673-683.

Dutrizac JE (1989) Elemental sulphur formation during the ferric sulphate leaching of chalcopyrite. *Can Metall Q* 28(4):337-344.

Ewalt KL, Hendrick JP, Houry WA, Hartl FU (1997) In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90:491-500.

Farah C, Vera M, Morin D, Haras D, Jerez CA, Guiliani N (2005) Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 71:7033-7040.

Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C (1989) The GroES and GroEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* 171:1379-1385.

Ferreira MMC (2002) Multivariate QSAR. *J Braz Chem Soc* 13(6):742-753.

Fuller MPE, Griffiths PR (1978) Diffuse reflectance measurements by infrared fourier transform spectrometry. *Anal Chem* 50:1906-1910.

- Gamer J, Bujard H, Bukau B (1992) Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, GrpE and the bacterial heat shock transcriptional factor  $\sigma^{32}$ . *Cell* 69: 833–842.
- Gething MJ (1997) Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts. Oxford University Press, 554pp.
- Gidman E, Goodacre R, Emmet B, Smith AR, Gwynn-Jones D (2003) Investigating plant-plant interference by metabolic fingerprinting. *Phytochemistry* 63:705-710.
- Gómez-García MR., Losada M, Serrano A (2003). Concurrent transcriptional activation of *ppa* and *ppx* genes by phosphate deprivation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* 302:601-609.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Electrophoresis* 4:3665-3685.
- Gupta RS (1998) Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol* (62):435-1491.
- Gupta RS, Singh B (1994) Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Curr Biol* 4:1104-1114.
- Hallberg KB, González-Toril E (2010) *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14:9-19.
- Han MJ, Yun H, Lee SY (2008) Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. *Biotechnol Adv* 26:591-609.
- He Z, Zhong H, Hu Y, Xiao S, Liu J, Xu J, Li G (2005) Analysis of differential-expressed proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under phosphate starvation. *J Biochem Mol Biol* 38:545-549.
- Hengee-Aronis R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\delta$ s (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:373-395.

- Holmes D, Bonnefoy V: Insights into Iron and Sulfur Oxidation Mechanisms of Bioleaching Organisms. In Biomining Edited by: Rawlings DE, Johnson BD. Berlin: Springer-Verlag; 2006:281-307.
- Holmes DS, Lobos JH, Bopp LH, Welch CG (1984) Cloning of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid in *Escherichia coli*. J Bacteriol 157:324-326.
- Holmes DS, Zhao HL, Levican G, Ratouchiniak J, Bonnefoy V, Varela P, Jedlicki E. (2001) ISAFel and ISL3 family insertion sequence from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859. J Bacteriol 183:4324-4329.
- Hoskins JR, Pak M, Maurizi MR, Wickner S (1998) The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP. Proc Natl Acad Sci USA 95:12135-12140.
- Houry WA, Frishman D, Eckirskorn C, Lottspeich F, Hartl FU (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. Nature 402:147-154.
- Hubert WA, Leduc LG, Ferroni GD (1995) Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. Curr Microbiol 31:10-14.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real time RT-PCR normalization, strategies and considerations. Genes and Immun. 6: 279-284.
- Ingraham VM (1961) Gene evolution and the haemoglobins. Nature 4(189):704-708.
- Inoue C, Sugawara K, Kusano T (1991) The merR regulatory gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is spaced apart from the mer structural genes. Mol Microbiol 5:2707-2718.
- Jerez CA, Seeger M, Amaro AM (1992) Phosphate starvation affects the synthesis of outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol Lett 98:29-34.
- Jin SM, Yan WM, Wang ZN (1992) Transfer of IncP Plasmids to extremely Acidophilic *Thiobacillus ferrooxidans*. App Environm Microbiol 58(1): 429-430.
- Johnson DB, Hallberg KB (2008) Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms. Adv Microb Physiol 54:202-256.

- Kelly DP, Wood AP (2000) Re-classification of some some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol 50:511-16.
- Kennelly PJ, Potts M (1996) Fancy meeting you here! A fresh look at prokaryotic protein phosphorylation. J Bacteriol 178:4759-4764.
- Kim KI, Cheong GW, Park SC, Ha JS, Woo KM, Choi SJ, Chung CH (2000) Heptameric ring structure of the heat shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. J Mol Biol 303:655–666.
- Kovalenko TV, Karavaiko GI, Piskunov VP (1982) Effect of  $\text{Fe}^{3+}$  ions on *Thiobacillus ferrooxidans* oxidation of ferrous oxide at various temperatures. Mikrobiologiya 51(1):156-60.
- Kress W, Maglica Z, Weber-Ban E (2009) Clp chaperone proteases: structure and function. Res Microbiol 160(9):618-28.
- Kuczyńska-Wiśnik D, Kedzierska S, Matuszewska E, Lund P, Taylor A, Lipińska B, et al. (2002) The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured in vivo during extreme heat shock. Microbiology 148:1757–1765.
- Kusano T, Sugawara k, Inoue C, Takeshina T, Numata M, Shiratori T (1992) Electrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmid containing a mer determinant as the selective marker by eletroporation. J bacteriol 174: 6617-6623.
- Kusano T, Takeshima T, Inoue C, Sugawara K (1999) Evidence for two sets of structural genes coding for ribulose biphosphate carboxylase in *Thiobacillus ferrooxidans*. J Bacteriol 173(22):7313-7323.
- Laksanalamai P, Pavlov AR, Slesarev AI, Robb FT (2006) Stabilization of Taq DNA polymerase at high temperature by protein folding pathways from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. Biotechnol Bioeng 93:1–5.
- Leahy MJ, Davidson MR, Schwars MP (2005) A model for heap bioleaching of chalcocite with heat balance: Bacterial temperature dependence. Miner Eng 18: 1239-1252.

- Levican G, Bruscella P, Guacunano M, Inostroza C, Bonnefoy V, Holmes DS, Jedlicki E (2002) Characterization of the *petI* and *res* operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. J Bacteriol 184(5):1498-1501.
- Lindquist S (1986) The heat shock response. Ann Rev Biochem 55:1151-1191.
- Luo H, Shen L, Yin H, Li Qian, Chen Q, Luo Y, Liao L, Qiu G, Liu X (2009) Comparative genomic analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains using the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 whole-genome oligonucleotide microarray. Can J Microbiol 55(5):587-598.
- Lupas AN, Koretke KK (2003) Bioinformatic analysis of ClpS, a protein module involved in prokaryotic and eukaryotic protein degradation. J Struct. Biol 141: 77:83.
- Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A (1989) Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. J Mol Biol 210:551-559.
- Mayer MP, Bukau B (1998) Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. Biol Chem 379:261-266.
- Modak JM, Natarajan KA, Mukhopadhyay S (1996) Development of temperature-tolerant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* to improve bioleaching kinetic. Hydrometallurgy. 42:51-61.
- Mogk A, Dougan D, Weibezahn J, Schelieker C, Turgay K, Bukau B (2004) Broad yet high substrate specificity: the challenge of AAA+ proteinases. J Struct Biol 146:90-98.
- Mogk A, Tomoyasu P, Goloubinoff S, Rüdiger D, Röder H, Langen, T Bukau, B (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. Embo J 18:6934-6949.
- Monds RD, Newell PD, Schwartzman JA, O'Toole GA (2006) Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf01. Appl Environ Microbiol 72:1910-1924.
- Nahas E, Terenzi HF, Rossi A (1982) Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. J Gen. Microbiol. 128:2017-2021.

- Narberhaus F (1999) Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol* 31(1):1365-2958.
- Naumann D, Fijala V, Labischinski H, Giesbrecht, P. (1991) The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy, p. 43–96. In: *Modern techniques for rapid microbiological analysis*. VHC publishers Inc. New York.
- Nocker A, Krstulovic NP, Perret X, Narberhaus F. (2001) Rose elements occur in disparate rhizobia and are functionally interchangeable between species *Arch Microbiol* 176:44-51.
- Nogueira FTS (2004) Identificação e caracterização de genes expressos em resposta ao estresse por baixa temperatura em cana-de-açúcar. Tese de Doutorado – IB/UNICAMP, Campinas, SP.
- Norris KP (1959) Infrared spectroscopy and its application to microbiology. *Hygiene* 57: 326-354.
- Nyström T, Neidhardt FC (1994) Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol Microbiol* 11:537-544.
- Ohmura N, Sasaki K, Matsumoto N, Saiki H. (2002) Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *J Bacteriol* 184(8): 2081-2807.
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27:437-496.
- Pasquini C (2003) Near infrared spectroscopy: fundamentals practical aspects and analytical applications. *J Braz Chem Soc* 14(2):138-219.
- Peng JB, Yan Wm, Bao XZ (1994) Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 176:2892-2897.
- Pereira JC. *Análise de dados qualitativos: estratégias metodológicas para as ciências da saúde, humanas e sociais*. 2 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999. 156
- Pickart, CM, Cohen RE (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:177-187.



- Pina, Pablo dos Santos. Estudo da biolixiviação e da lixiviação química de um concentrado sulfetado de zinco. Dissertação de mestrado. REDEMAT – Rede temática em engenharia de materiais, 2006.
- Qiu P (2003) Recent advantages in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network. *Biochem Biophys Res Commun* 309:495-501.
- Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski B H, Kornberg A. (2000) Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sc USA* 97:9636-9641.
- Rawlings DE (2005) Characteristics and adaptability of iron and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb Cell Fact* 4:1-15.
- Rawlings DE, Dorrington RA, Rohere J, Clennel AM. (1993) A molecular analysis of the replication and mobilization regions of a broad-host-range plasmid isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev* 11: 3-7.
- Rawlings DE, Kusano T (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol Rev* 58:19-55.
- Rawlings DE, Pretorius IM, Woods DR (1984) Expression of *Thiobacillus ferrooxidans* origin of replication in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 158: 737-738.
- Reis NA (2005) Reconhecimento e Predição de Promotores Procarióticos: investigação de uma metodologia in silico baseada em HMMs. Dissertação de Mestrado em Computação Aplicada. Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, São Leopoldo, RS.
- Rensing SA, Maier UG (1994) Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *J Mol Evol* 39:80-86.
- Ritosa FA (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
- Ritz M, Tholozan JL, Federighi M, Pilet MF (2001) Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 67: 2240–2247.

- Rodríguez Y, Ballester A, Blázquez ML, González F, Muñoz JA (2003) New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71:37-46.
- Rowan NJ, Anderson JG (1998) Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells Suspended in Bovine Milk. *Appl Environ Microbiol* 64 (6): 2065-2071.
- Sand W, Gehrke T, Hallmann R, Rhode K, Sobotke B, Wentzien S (1993) In situ bioleaching of metal sulfides: The importance of *leptospirillum ferrooxidans*. *Biohydrom technol* v1. TMS Press Warrendale Pennsilvaia, 15-27.
- Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, Burton RE, Flynn, JM, Grant RA, et al. (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* 119: 9-18.
- Schmitt J, Flemming H (1998) FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Inter Biodeter Biodegrad* 41:1-11.
- Seeger M, Jerez CA (1993) Responses of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. *FEMS Microbiol Rev* 11:37-42.
- Seeger M, Osorio G, Jerez CA (1996) Phosphorylation of GroEL, DnaK other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiol Lett* 138:129-134.
- Servant P, Rapoport G, Mazodier P. (1999) RheA, the repressor of *hsp18* in *Streptomyces albus* G. *Microbiol* 14:2835-2391.
- Sharma PK, Das A, Hanumantha R, Forssberg KSE (2003) Surface characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions. *Hydrometallurgy* 71: 285-292.
- Shi B, Xia X (2003) Morphological changes of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in response to temperature selection. *Curr Microbiol* 46:120–123.
- Sun Y and MacRae TH (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci*, 62: 2460-2476.

- Steen H, Mann M (2004) The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:699-711.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Molec Biol* 85:389-398.
- Tshilombo AF, Petersen J, Dixon DG (2002) The influence of applied potentials and temperature on the electrochemical response of chalcopyrite during bacterial leaching. *Miner Eng* 15:809-813.
- Tyagi RD, Sreekrishnan TR, Blais JF, Campbell PCG (1994) Kinetics of heavy metal bioleaching from sewage sludge III. Temperatures effects. *Water Res* 28(11):2367-2375.
- Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, Blake R 2nd, Eisen JA, Holmes DS (2008) *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9:597.
- Van Veen H (1997) Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Ant van Leeuw* 72:299-315.
- Varela P, Jerez CA (1992) Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* 98:149-154.
- Varela P, Levican G, Rivera F, Jerez CA (1998) An immunological strategy to monitor in situ the phosphate starvation state in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 64:4990-4993.
- Vera M, Guiliani N, Jerez CA (2003) Proteomics and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hidrometalurgy* 71:125-132.
- Vera M, Pagliai F, Guiliani N, Jerez CA. (2008) The chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans* can survive under phosphate limiting conditions by the expression of a C-P lyase operon that allows it to grow on phosphonates. *Appl Environ Microbiol* 74(6):1829-1835.
- Wanner BL (1990) Phosphorus assimilation and its control of genes expression in *Escherichia coli*. Em: Hauska, G., Thauer, R (eds.). *The molecular basis of bacterial metabolism*, pp. 152-163. Springer publisher, Berlin.

- Wanner BL (1995) Signal transduction and cross regulation in the *Escherichia coli* phosphate regulon by PhoR, CreC, and acetyl phosphate, p.203–221. In Hoch JA, Silhavy TJ (ed.), Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.
- Willsky GR and Malamy MH (1980) Characterization of two separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. J Bacteriol 140(1):356-365.
- Xiao S, Chao J, Wang W, Fang F, Qiu G, Liu X (2009) Real-time PCR analysis of the heat-Shock response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Folia Biol (Praha) 55:1-6.
- Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V. (2004) Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. Microbiol 150: 2113-2123.
- Yarzabal A, Brasseur G, Ratouchniak J, Lund K, Lemesle-Meunier D, DeMoss JA, Bonnefoy V (2002) The high-molecular-weight cytochrome c Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. J Bacteriol 184(1):313-317.
- Yu C, Irudayaraj J (2004) Spectroscopic Characterization of Microorganisms by Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. Biopolymers 77:368 -377.
- Zhenying L, Guiliani N, Appia-Ayme C, Borne F, Ratiuchaiak J, Bonnefoy V (2002) Construction and characterization of recA mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. J Bacteriol 182:2269-2276.