



ESTUDOS DE *MOTIFS* CONSERVADOS E HOMOLOGIA ENTRE BACTÉRIAS A PARTIR DA PROTEÍNA OmcS DE *Geobacter*

JOÃO VITOR AIRES TEIXEIRA; FÁBIO RODRIGO DE FREITAS; VITÓRIA REIS WERNER

RESUMO

Bactérias do gênero *Geobacter* são conhecidas por sua capacidade de transferir elétrons para aceptadores externos e esse fator se deve aos chamados nanofios. Os nanofios são estruturas filamentosas produzidas por bactérias compostas principalmente por citocromos, que facilitam o transporte extracelular de elétrons e a geração de corrente elétrica através de reações de oxirredução. Essas estruturas são fundamentais para a transdução, comunicação e reprodução bacteriana, com aplicações promissoras em biorremediação e geração de energia, especialmente em células combustíveis microbianas (CCM's). Este projeto expande o conhecimento sobre a proteína OmcS de *Geobacter*, destacando sua importância na formação de nanofios bacterianos e na transferência extracelular de elétrons. O estudo foca na proteína citocromos multiheme tipo C associados ao complexo IV da cadeia respiratória (OmcS) de *Geobacter* spp., analisando sua conservação e homologia em diferentes gêneros bacterianos por meio de *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), no qual foram filtrados os motivos mais recorrentes, e *Orthologous Average Nucleotide Identity Tool* (OAT) para a construção de um *heatmap*. Foram encontrados *motifs* conservados, indicando funções biológicas importantes, como atividade enzimática e sinalização celular, entre bactérias de várias famílias. Os resultados destacam a conservação funcional da proteína OmcS, sugerindo uma predisposição generalizada para a formação de nanofios em diversas espécies bacterianas. A análise genômica revelou uma grande similaridade dentro do gênero *Geobacter*, sugerindo uma relação filogenética próxima entre suas espécies, mas também encontrou uma similaridade mediana com outros gêneros que também expressam a proteína OmcS. Esses achados abrem caminho para a engenharia genética de bactérias eletrogênicas mais eficientes, com potencial para aplicações em bioenergia, biorremediação e biossensores.

Palavras-chave: bioinformática; microrganismos eletrogênicos; nanofios; transferência extracelular de elétrons.

1 INTRODUÇÃO

A diversidade microbiológica é uma fonte de recursos inestimável, visto que os microrganismos têm um potencial biotecnológico enorme, e em sua grande maioria, ainda inexplorado. Desta forma, estes seres microscópicos podem ser direcionados a uma aplicação a partir de suas características intrínsecas e do seu metabolismo. Nesse sentido, as bactérias do gênero *Geobacter* têm ganhado destaque por sua capacidade de transferir elétrons para aceptadores externos, como p.ex. minerais de ferro, eletrodos, substâncias químicas mediadoras ou até mesmo para outras bactérias da comunidade microbiana, o que permite a sua utilização para biorremediação, biossensores, bioeletrônica e para a geração de energia,

além de ser um modelo nesse tipo de mecanismo (Wang et al., 2023). Esta habilidade só é factível por conta dos nanofios biológicos (*nanowires*), o qual são estruturas extracelular filamentosas capazes de conduzir eletricidade por um longo alcance, além de reduzir alguns compostos como óxido de ferro III (Reguera et al., 2005; Qian et al., 2011).

Recentemente, comprovou-se que esses filamentos são formados por citocromos específicos e não por pili, como se pensava anteriormente (Wang et al., 2023). Em *Geobacter sulfurreducens* os nanofios são formados, principalmente, por polímeros de um citocromo hexaheme, o citocromo C oxidase (OmcS) (Qian et al., 2011). Este citocromo desempenha um papel crucial na produção de ATP por participar da cadeia de transporte de elétrons, atuando como último acceptor de elétrons tanto na membrana celular de procariotos, quanto na membrana de mitocôndrias de eucariontes (Lehninger et al., 2014).

Desta forma, o estudo da proteína OmcS e sua conservação entre diferentes gêneros bacterianos é crucial não apenas para entender os mecanismos subjacentes à formação de nanofios, mas também a sua função na transferência de elétrons. Os *motifs* têm uma grande importância na identificação de fatores que desempenham papéis essenciais nos processos biológicos, visto que são regiões padrões encontradas em um conjunto de sequências que permanecem inalteradas ou pouco alteradas ao decorrer da evolução (D'haeseleer, 2006). A identificação de *motifs* conservados e domínios funcionais em homólogos da OmcS em outros gêneros bacterianos pode revelar novas perspectivas sobre a diversidade estrutural e funcional desses nanofios, além de compreender sobre a evolução de mecanismos de transferência de elétrons extracelulares. Ademais, a identificação de novas espécies com expressão de proteínas OmcS ou semelhantes, auxilia a explorar o potencial dessas proteínas e nanofios em aplicações biotecnológicas, e contribuir para a bioprospecção de genes e/ou proteínas com maior eficiência.

Esse estudo visa expandir o conhecimento sobre a proteína OmcS de *Geobacter*, explorando sua homologia e *motifs* conservados em uma variedade de gêneros bacterianos. Através de uma abordagem bioinformática, incluindo análise de sequência de *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e *Orthologous Average Nucleotide Identity Tool* (OAT), investiga-se a similaridade genômica e a conservação de domínios funcionais relacionados à formação de nanofios e transferência de elétrons. Ao elucidar a conservação e a diversidade funcional da OmcS e seus domínios homólogos, este trabalho contribui para o entendimento dos princípios fundamentais que regem a bioeletricidade microbiana e abre caminho para o desenvolvimento de novas tecnologias baseadas em nanofios biológicos, biofilmes e produção de corrente elétrica em células combustíveis microbianas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados dados públicos da proteína OmcS de *Geobacter* multi-espécie disponíveis nas bases de dados NCBI e KEGG. Os dados passaram por BLAST e os 100 maiores *hits* foram filtrados para definir os *motifs* mais recorrentes. Ainda, os *hits* foram divididos entre os 10 gêneros mais prevalentes e os genomas completos de exemplares catalogados via NCBI *Assembly*. Os genomas foram comparados e um *heatmap*, ou mapa de calor, foi construído para identificar e relacionar os diferentes níveis de conservação entre os organismos encontrados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 100 maiores hits de BLAST apresentaram e-value entre 0.0 e $2e^{-136}$, *scores* entre 897 e 409 e percentual de identidade entre 100,0% e 50,0%, definindo as sequências de aminoácidos associadas aos microrganismos das famílias, com parâmetro Lambda de significância de 0,313, no qual Lambda é um parâmetro específico do algoritmo do BLAST relacionado à distribuição estatística dos scores de alinhamento, dado um valor padrão de

0,267.

Os *motifs* comuns encontrados foram organizados em diferentes grupos e dispostos na Tabela 01, bem como os organismos em que estão registrados e suas descrições e/ou funções catalogadas na base de dados *pfam* (*protein families*).

Tabela 01. Motivos e suas respectivas descrições encontradas via base de dados *pfam* associados aos 100 maiores *hits* de BLAST em proteína OmcS de *Geobacter* spp.

Grupos	Descrição
Citocromos C e domínios relacionados	Família que inclui os citocromos C7 e/ou do tipo C7, comuns em bactérias dos gêneros <i>Geobacter</i> e <i>Shewanella</i> .
Atividade enzimática	Proteínas com atividade catalítica, como de reações para a biossíntese de sinalizadores em plantas (AOC_like) e quebra de glicosídeos (Glyco_hydro2_C5).
Regulação e sinalização	Proteínas receptoras de fatores de crescimento envolvidas na mediação da resposta celular a fatores de crescimento (GF recep IV) ou associadas à reparação de DNA e sinalização de <i>checkpoint</i> celular (PTCB-BRCT).
Estrutura e ligação	Domínios que contribuem para a estrutura celular ou estão envolvidos na ligação a outras moléculas, como na polimerização de anticorpos (Ig_J_chain) ou transporte de moléculas (SpaA_2).
Defesa e resposta	Domínios e proteínas que estão envolvidos em mecanismos de defesa do organismo ou na resposta a estímulos externos, como inibição de proteases como mecanismo de defesa (SSI), atividade antimicrobiana em insetos (<i>Gloverin</i>) e mecanismos de defesa contra elementos genéticos móveis ou na reparação de DNA (HNH_5).
Biomíneralização	Domínio magnetocromo (MCR) envolvido na percepção de campos magnéticos em certos organismos.
Função desconhecida/inexata	Domínios como Fra10Ac1.

Fonte: KEGG (2024).

Os *motifs* conservados identificados na proteína OmcS, tais como Paired_CXXCH_1, Cytochrome_C7 e DHC, são indicativos de funções biológicas de relevância. Por exemplo, o *motif* Paired_CXXCH_1 está associado à ligação de heme, essencial para a atividade de citocromos, os quais atuam como transportadores de elétrons. A conservação desses *motifs* sugere que desempenham papéis fundamentais na função estrutural e enzimática das proteínas em que são encontrados.

Assim como explicitado nos trabalhos de Lehninger e colaboradores (2014), o heme é um componente essencial de várias proteínas e enzimas envolvidas em reações de oxirredução, como os citocromos, a hemoglobina, a mioglobina e a catalase. Nos citocromos, o heme atua como um sítio de transferência de elétrons, facilitando o transporte de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, um processo fundamental para a produção de ATP (adenosina trifosfato) durante a respiração celular.

Embora a proteína OmcS seja bem caracterizada em *Geobacter* spp., a presença de *motifs* conservados em outras bactérias sugere que estruturas semelhantes a nanofios e

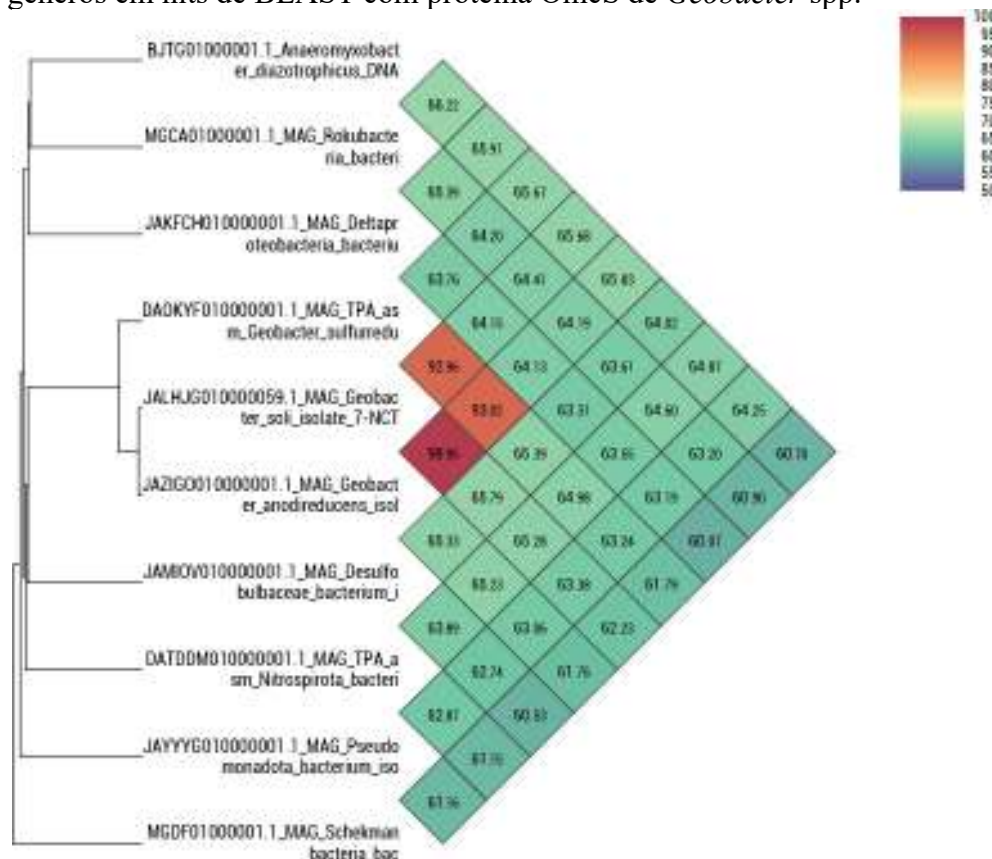
mecanismos de transferência de elétrons podem estar presentes em uma diversidade de microrganismos. No entanto, a função exata desses *motifs* varia dependendo do contexto celular e ambiental. Em algumas bactérias, os *motifs* conservados podem estar envolvidos em vias metabólicas distintas, adaptadas às necessidades energéticas ou ao nicho ecológico específico do organismo.

Ainda, além da transferência de elétrons, os *motifs* conservados podem participar de redes de sinalização celular, influenciando a expressão gênica, a resposta ao estresse ou a interação com outros microrganismos, tal como descrito pelos trabalhos de Mester et al., (2011). Em ambientes com diferentes aceptores de elétrons, como óxidos de ferro (Fe(III)), sulfatos (SO_4^{2-}) e óxido nítrico (NO^-), os *motifs* conservados podem conferir vantagens adaptativas, permitindo a colonização de nichos ecológicos variados.

A capacidade de formar nanofios e realizar transferência de elétrons extracelular (TEE) pode influenciar as relações ecológicas entre diferentes espécies bacterianas, permitindo a formação de consórcios microbianos na qual diferentes espécies colaboram para a degradação de substratos e a produção de corrente elétrica. É plausível que bactérias com proteínas do domínio citocromo de sequências mais similares tenham maior afinidade na formação de nanofios. A similaridade nas sequências de aminoácidos pode refletir uma estrutura tridimensional e propriedades bioquímicas semelhantes, o que facilita interações proteína-proteína, deixando-as mais eficientes, e a formação de estruturas filamentosas como os nanofios. Além disso, a similaridade nas sequências de citocromos indica uma capacidade compartilhada para a transferência de elétrons para aceptores externos.

O *heatmap*, disponível na Imagem 01, explicita as relações de similaridade taxonômica e evolutiva entre os 10 maiores *hits* e esclarece as conexões entre os organismos registrados via BLAST.

Imagem 01. *Heatmap* com as similaridades em porcentagem dos genomas completos dos 10 maiores gêneros em hits de BLAST com proteína OmcS de *Geobacter* spp.



O *heatmap* gerado revela uma alta similaridade genômica entre *Geobacter soli* e *Geobacter anodirreducens*, com 98,95%. *Geobacter sulfurreducens* apresenta aproximadamente 90% de similaridade com *Geobacter soli*. Essa proximidade indica uma estreita relação filogenética entre essas espécies, o que é esperado dado que pertencem ao mesmo gênero. Essa alta similaridade sugere que essas espécies compartilham um conjunto significativo de genes, incluindo potencialmente aqueles envolvidos na transferência de elétrons extracelulares mediada pela OmcS e suas sequências regulatórias (que são muito importantes para a expressão da proteína). Por outro lado, microrganismos dos gêneros *Anaeromyxobacter*, *Rokubacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Desulfobulbaceae*, *Nitrospirota*, *Pseudomonadota* e *Sheckmania* apresentaram similaridades genômicas em torno de 60% entre si e com as espécies de *Geobacter*.

Essa similaridade moderada sugere que, embora compartilhem algumas características genéticas com *Geobacter* spp., esses microrganismos possuem adaptações genéticas distintas que refletem suas próprias estratégias metabólicas e nichos ecológicos. Assim como demonstrado nos trabalhos de Wang e colaboradores (2023), a presença de similaridade genômica moderada entre *Geobacter* spp. e outros gêneros bacterianos sugere a possibilidade de transferência horizontal de genes (THG) ou de uma ancestralidade comum que inclui genes relacionados à transferência de elétrons extracelulares, o que indica que a capacidade de transferência de elétrons pode ser mais amplamente distribuída entre microrganismos do que se pensava anteriormente. Outra hipótese seria que a presença de uma certa similaridade em genes importantes para o mecanismo de TEE sinaliza evoluções independentes para uma mesma função, indicando que este mecanismo possui uma relevância maior do que o esperado.

A diversidade genômica observada entre esses microrganismos destaca a complexidade das interações microbianas em diferentes ambientes e a importância de entender as bases genéticas desse contato para aplicação em biorremediação e bioenergia. A identificação de genes compartilhados entre *Geobacter* spp. e outros microrganismos pode revelar novos alvos para o aprimoramento da transferência de elétrons em células combustíveis microbianas, para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de biorremediação ou ainda para a construção de cepas melhoradas geneticamente para tais fins.

4 CONCLUSÃO

Muitos estudos sobre a proteína OmcS de *Geobacter* spp. têm destacado sua importância na formação de nanofios bacterianos e na transferência extracelular de elétrons (TEE). A descoberta de motivos conservados em várias bactérias indica uma tendência comum para a geração de nanofios e a realização de TEE, especialmente em ambientes anaeróbios. Esses resultados não só enriquecem a compreensão dos processos básicos da bioeletricidade microbiana, como também proporcionam a descoberta de novos microrganismos capazes de conduzir eletricidade que podem contribuir com o aumento da eficiência de sistemas já existentes, ou ainda, com estudos experimentais voltados a facilitar a construção de microrganismos geneticamente modificados.

A diversidade funcional dessas proteínas, evidenciada pela conservação de *motifs* ligados a várias funções biológicas, sugere sua adaptação a diferentes condições ambientais e metabólicas. A análise genômica mostrou uma grande similaridade dentro do gênero *Geobacter*, apontando para uma relação filogenética próxima entre suas espécies, enquanto a similaridade moderada com outros gêneros indica a possibilidade de transferência horizontal de genes ou uma ancestralidade comum envolvendo genes de TEE. O estudo sugere a importância de continuar investigando os aspectos moleculares e ecológicos dos nanofios bacterianos e da TEE, visando explorar a diversidade genética e funcional dessas estruturas e

suas aplicações em tecnologias sustentáveis.

REFERÊNCIAS

D'HAESELEER, Patrik. What are DNA sequence motifs?. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 423-425, 2006.

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

LEE, I.; KIM, Y. O.; PARK, S. C.; CHUN, J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **Int J Syst Evol Microbiol**, v16, p. 1100-1103.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

MULTISPECIES: c-type cytochrome OmcS [Geobacter] - Protein - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_039648128.1>.

ONDOV, B. D.; NICHOLAS, H. B.; PHILIPPY, A. M. Interactive metagenomic visualization in a web browser. **BMC Informatics**, v. 12, n. 1, 2011.

QIAN, X.; MESTER, T.; MORGADO, L.; ARAKAWA, T.; SHARMA, M. L.; INOUE, K.; JOSEPH, C.; SALGUEIRO, C. A.; MARONEY, M. J.; LOVLEY, D. R. Biochemical characterization of purified OmcS, a c-type cytochrome required for insoluble Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1807, n. 4, p. 404-412, 2011.

REGUERA, G.; MCCARTHY, K. D.; MEHTA, T.; NICOLL, J. S.; TUOMINEN, M. T.; LOVLEY, D. R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1098-1101, 2005.

SHEN, W.; REN, H. TaxonKit: a practical and efficient NCBI Taxonomy toolkit. **Journal of Genetics and Genomics**, 2021.

WANG, F.; CRAIG, L.; LIU, X.; RENSING, C.; EGELMAN, E. H. Microbial nanowires: type IV pili or cytochrome filaments? **Trends in Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 384–392, 2023.