

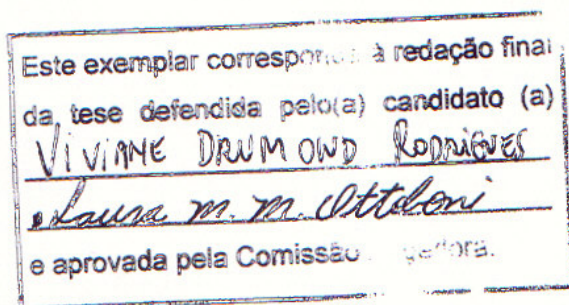
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Viviane Drumond Rodrigues

**“Análise de proteínas e genes envolvidos no metabolismo
energético e sistema antioxidante em *Acidithiobacillus
ferrooxidans* LR”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microrganismos.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Co-Orientadora: Dra. Susely Ferraz de Siqueira Tada

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R618a

Rodrigues, Viviane Drumond

Análise de proteínas e genes envolvidos no metabolismo energético e sistema antioxidante em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR / Viviane Drumond Rodrigues. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Laura Maria Mariscal Ottoboni, Susely Ferraz de Siqueira Tada.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 2. Estresse. 3. Expressão gênica. 4. Enzimas antioxidantes. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Tada, Susely Ferraz de Siqueira. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Analysis of proteins and genes involved in the energetic metabolism and antioxidant system in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR.

Palavras-chave em inglês: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; Stress; Gene expression; Antioxidant enzymes.

Área de concentração: Genética de Microrganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni, Edi Lucia Sartorato, Salete Aparecida Gaziola.

Data da defesa: 13/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 13 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

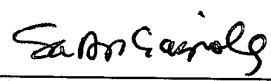
Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato


Assinatura

Profa. Dra. Salete Aparecida Gaziola


Assinatura

Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Márcio José da Silva

Assinatura

“A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá.”

(Aristóteles, 350 a.C.)

“No meio do caminho tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
tinha uma pedra
no meio do caminho tinha uma pedra ...
... As dificuldades são o aço estrutural que entra na construção do caráter.
Tenho apenas duas mãos e o sentimento do mundo.
Porque eu sou do tamanho daquilo que sinto, que vejo e que faço, não do tamanho que as
pessoas me enxergam.”

(Carlos Drummond de Andrade)

*Dedico este trabalho àqueles que amo incondicionalmente:
Ao meu pai Ailton, pelo carinho e eterna gratidão por tudo que me ensina.
A minha mãe Marise, pelo exemplo de pessoa humana, amor e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, em todas as suas manifestações e formas, pela proteção, paz, fé e esperança.

À instituição base da minha vida: minha família, por todo apoio, por estar sempre presente e fazer com que valha a pena viver.

Aos meus pais, pois me deram a liberdade, a curiosidade e a possibilidade de me maravilhar com o mundo.

Ao meu irmão Alexandre e a Grazi, pelos momentos de descontração, por serem meus maiores amigos e estarem sempre perto, no coração, aqui.

Ao Sérgio, pela paciência, compreensão, amor e incentivo incondicional durante todos os momentos. Espero estar a altura quando a sua vez chegar.

À minha orientadora Laura Ottoboni, pela oportunidade, entusiasmo, sabedoria e toda confiança depositada em mim para que fosse possível a realização deste trabalho.

À Susy, pelos inúmeros conhecimentos que me transmitiu, pela paciência e por ter me acompanhado até quando a natureza permitiu.

À Marcela, pela amizade sincera, ajuda ilimitada e pelos momentos de alegria com Natasha.

Ao Lúcio, pela amizade, ensinamentos e por todo suporte as minhas dúvidas.

Às amigas do Laboratório, Daniela, Camila, Fabiana e Bruna, pela ajuda técnica e afetiva para vencer as inúmeras barreiras.

Ao prof. Dr. Ricardo Azevedo, por disponibilizar o seu laboratório para a realização das análises bioquímicas.

À Paula, pela amizade inesperada e auxílio irrestrito durante a realização das análises bioquímicas.

Aos meus amigos, pelo apoio moral e que nunca me negaram carinho nas horas de estresse.

Às crianças: Luísa, (afilhada) e Guilherme, meus primos, e, carinhosamente, Gabriel e Felipe, que apesar da distância conseguem fazer com que eu entenda como a vida é surpreendente.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

À Fapesp, pelo apoio financeiro.

Aos membros da pré-banca Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira e Profa. Dra. Salete Aparecida Gaziola e aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato e Profa. Dra. Salete Aparecida Gaziola por contribuírem para o término deste estudo.

Às secretárias: Sandra, Tânia, Maria de Lourdes e Silvia pelo eficiente trabalho e ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos professores, colegas e restantes elementos do programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, de quem sempre recebi apoio e amizade.

Finalmente, agradeço a todos aqueles que participaram deste projeto, direta ou indiretamente. Aos que me fizeram críticas, tanto positivas quanto negativas, e que me fizeram crescer. No entanto, ainda há um caminho a percorrer e por isso, este trabalho é ao mesmo tempo o final de uma etapa e o começo de outra.

ÍNDICE

Lista de abreviações	09
Resumo	11
Summary.....	13
Introdução	15
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	15
Resistência a metais	17
Metabolismo energético	18
Sensores redox	20
Outras enzimas antioxidantes	23
Objetivos	25
Capítulo 1: Análise da expressão de genes dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> LR em diferentes condições por PCR em tempo real	27
Introdução	28
Materiais e métodos	29
Resultados e discussão	34
Referências	48
Capítulo 2: Caracterização bioquímica de enzimas integrantes do sistema antioxidante em <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> LR mantida em contato com calcopirita	55
Introdução	56
Materiais e métodos	57
Resultados e discussão	60
Referências	73
Conclusões	79
Referências bibliográficas	81

LISTA DE ABREVIACÕES

Cu/ZnSOD = cobre/zinco superóxido dismutase
 DCPIP = 2,6-diclorofenolindofenol
 DEPC = dietil pirocarbonato
 DTNB = ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
 DTT = ditioneitol
 EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético
 FAD = flavina adenina dinucleotídeo
 FeSOD = ferro superóxido dismutase
 GR= enzima glutathione redutase
 Grx = proteína glutathione redutase
grxA = gene que codifica a proteína glutathione redutase 1
grxC = gene que codifica a proteína glutathione redutase 3
 Grx3 = proteína glutathione redutase 3
 Grx-S₂ = glutathione redutase oxidada
 Grx-S-SG = intermediário glutathionilado com glutathione redutase
 Grx-(SH)₂ = glutathione redutase reduzida
 GSH = glutathione reduzida
 GSSG = glutathione oxidada
gor = gene que codifica a proteína glutathione redutase
 MnSOD = manganês superóxido dismutase
 MOPS = ácido 3-N-morfolino propanosulfônico
 MTT = brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
 NAD(P) = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
 NADP⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
 NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
 NiSOD = níquel superóxido dismutase
 NTT = azul de nitro tetrazólio
 PAPS = proteína 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato
 proteína-S₂ = proteína oxidada
 proteína-(SH)₂ = proteína reduzida

$R-S_2$ = proteína oxidada

$R-(SH)_2$ = proteína reduzida

$R-S-SG$ = dissulfeto híbrido a glutathione

SDS = dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SOD = enzima superóxido dismutase

sodA = gene que codifica a proteína manganês superóxido dismutase

sodB = gene que codifica a proteína ferro superóxido dismutase

TEMED = N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina

trx = gene que codifica a proteína tiorredoxina

Trx = proteína tiorredoxina

$Trx-S_2$ = tiorredoxina oxidada

$Trx-(SH)_2$ = tiorredoxina reduzida

trxR = gene que codifica a proteína tiorredoxina dissulfeto redutase

TrxR = enzima tiorredoxina redutase

RESUMO

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, acidofílica, quimiolitotrófica e mesofílica. *A. ferrooxidans* é capaz de utilizar ferro e enxofre como fonte de energia e é um dos microrganismos mais utilizados no processo de biolixiviação. Durante este processo a bactéria pode estar sujeita a diversos tipos de estresse, entre eles, o estresse oxidativo. Entre os principais sensores relacionados à resposta antioxidante estão: a enzima SOD e as proteínas dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina. A SOD atua como defesa primária na remoção de espécies reativas do oxigênio. O sistema tiorredoxina é composto por NADPH, TrxR e Trx. O sistema glutarredoxina é formado por NADPH, GR, GSH e Grx. Os sistemas tiorredoxina e glutarredoxina desempenham um papel fundamental contra espécies reativas do oxigênio e na manutenção do ambiente redutor da célula. No primeiro capítulo, a linhagem brasileira *A. ferrooxidans* LR foi utilizada para o estudo da expressão de genes dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina, por PCR em tempo real, em diferentes condições: (a) nas taxas de 50, 75 e 100% de oxidação de Fe^{2+} , (b) em um e dois dias após a taxa de 100% de oxidação de Fe^{2+} , (c) na presença de calcopirita e (d) após diferentes tempos de *heat shock*. Em geral, nas diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} , os genes do sistema tiorredoxina foram mais expressos que os do sistema glutarredoxina. Em um dia após 100% de oxidação de Fe^{2+} , a maioria dos genes teve expressão induzida. Em dois dias a partir desta taxa de oxidação de Fe^{2+} , apenas os genes *trxB* e *gor* foram induzidos em relação ao controle, sugerindo que os produtos desses genes podem exercer a função de chaperona durante o estresse oxidativo. Na presença de calcopirita, apenas o gene *gor* foi induzido, indicando que GR pode estar envolvida no controle da homeostase celular. Esta enzima também pode ser necessária para a atividade de GSH, proteína envolvida no metabolismo de enxofre. Após o *heat shock*, os níveis de expressão do gene que codifica a proteína Grx3 aumentaram significativamente, possivelmente devido à propriedade de co-chaperona da proteína. No segundo capítulo foram feitas análises *in silico* das sequências de aminoácidos das proteínas GR, TrxR e SOD de *A. ferrooxidans*. A análise de *in silico* mostrou que existem muitas semelhanças entre as proteínas TrxR e GR, como por exemplo, estrutura secundária, peso molecular, sítio ativo, motivos funcionais e domínios. Foi realizada a

quantificação de proteínas totais, a determinação da atividade em espectrofotômetro das enzimas GR e TrxR, a atividade em PAGE não desnaturante das proteínas GR e SOD e a caracterização de SOD durante o crescimento de *A. ferrooxidans* LR em ferro e em células mantidas em contato com a calcopirita por 1 e 10 dias. A concentração de proteínas totais foi menor em células mantidas por 10 dias em contato com a calcopirita, e uma das razões pode ser o maior estresse oxidativo. A atividade das enzimas GR, TrxR e SOD aumentou neste mesmo período de tempo, sugerindo a presença de estresse. A caracterização com KCN e H₂O₂ mostrou que a enzima SOD de *A. ferrooxidans* era do tipo FeSOD.

SUMMARY

Acidithiobacillus ferrooxidans is a Gram-negative, anaerobic facultative, acidophilic, chemolithoautotrophic and mesophilic bacterium. *A. ferrooxidans* is able to use iron and sulfur as energy source and is one of the microorganisms used in the bioleaching process. During this process, the bacterium may be subjected to several stressful situations including the oxidative stress. Among the proteins involved in the antioxidant response are the enzyme SOD and the proteins from the thioredoxin and the glutaredoxin systems. SOD removes the reactive oxygen species. The thioredoxin system is composed by NADPH, TrxR and Trx. The glutaredoxin system consists of NADPH, GR, GSH and Grx. The thioredoxin and the glutaredoxin systems play a key role against the reactive oxygen species and maintain the reducing environment of the cell. In the first chapter, the Brazilian strain *A. ferrooxidans* LR was used to study the expression of genes from the thioredoxin and the glutaredoxin systems, by real-time PCR, in different conditions: (a) at 50, 75 and 100% of Fe^{2+} oxidation, (b) in one a and in two days after 100% of Fe^{2+} oxidation, (c) in the presence of chalcopyrite and (d) after different periods of time of heat shock. In general, on the different rates of Fe^{2+} oxidation, the genes of the thioredoxin system showed a higher expression than the genes from the glutaredoxin system. In one day after 100% of oxidation of Fe^{2+} , the majority of the genes had their expression induced. In two days after 100% of oxidation of Fe^{2+} , only the genes *trxB* and *gor* were induced suggesting that the product of these genes may act as chaperones during the oxidative stress. In the presence of chalcopyrite, only the gene *gor* was induced, indicating that GR may be involved in the control of the cell homeostasis since it is necessary for GSH activity, a protein that participates in sulfur metabolism. After the heat shock, the expression of the gene that encodes the protein Grx3 increased, probably because this protein can act as a co-chaperone. In the second chapter, an *in silico* analysis of the proteins GR, TrxR and SOD amino acids sequences from *A. ferrooxidans* was performed. This analysis showed that there are several similarities between TrxR and GR including, secondary structure, molecular weight, active site, functional motives and domains. Total protein content in cells grown until 80% of oxidation of Fe^{2+} and in cells kept for 1 and 10 days in the presence of chalcopyrite was determined. Also, in these conditions, the activities of GR and TrxR were

determined in a spectrophotometer and the activities of GR and SOD were determined in gel. The total protein content was higher in control cells and in the contrary, enzyme activities were higher at 10 days of bacteria contact with chalcopyrite indicating the presence of oxidative stress. Assays with KCN and H₂O₂ showed that the *A. ferrooxidans* LR SOD was in fact a FeSOD.

INTRODUÇÃO

Acidithiobacillus ferrooxidans

Acidithiobacillus ferrooxidans pertence ao filo Proteobactéria, subgrupo γ -proteobactéria, gênero *Acidithiobacillus*. Este gênero engloba as seguintes espécies: *A. albertensis*, *A. caldus*, *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* (Kelly & Wood, 2000). *A. ferrooxidans* é uma bactéria Gram negativa, não patogênica e com metabolismo quimiolitotrófico, isto é, obtém a energia necessária para seu crescimento pela oxidação de substratos estritamente inorgânicos, como ferro, enxofre ou fontes reduzidas deste, além de ser capaz de fixar o CO₂ atmosférico (Rawlings, 2002). Esta bactéria é a única espécie do gênero capaz de catalisar a oxidação do íon ferroso, aumentando de 10⁵ a 10⁶ vezes a velocidade da reação. A espécie é anaeróbica facultativa e acidofílica, com pH ótimo de crescimento ao redor de 2,0 (Golomzik & Ivanov, 1965; Tuovinen & Kelly, 1972; Pivoverova & Golovacheva, 1985). Os estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos referentes a esta espécie têm se intensificado pelo fato de *A. ferrooxidans* ser um dos principais microrganismos envolvidos na lixiviação bacteriana de metais, ou biolixiviação, processo no qual o metabolismo microbiano causa a solubilização de sulfetos de metais.

A sequência completa do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 é disponibilizada pelo TIGR (*The Institute for Genomics Research* – <http://cmr.tigr.org>), sendo que ela serviu como base para caracterização de vários genes e operons (Yarzabal *et al.*, 2002; Levicán *et al.*, 2002). Esta sequência também tem sido utilizada para o estudo de alguns aspectos complexos da biologia de *A. ferrooxidans*, tais como os mecanismos de captação, assimilação e metabolismo de enxofre (Valdés *et al.*, 2003), metabolismo energético da bactéria quando esta cresce na presença de íon ferroso ou enxofre (Quatrini *et al.*, 2006) e metabolismo de carbono (Appia-Ayme *et al.*, 2006).

A. ferrooxidans possui considerável interesse econômico, pois está envolvida na biolixiviação de metais. A biolixiviação pode ocorrer de maneira direta ou indireta sendo que na forma direta, os sulfetos metálicos são oxidados pelo contato direto das bactérias ou por ação enzimática das mesmas, gerando sulfatos solúveis (Bosecker, 1997). Na biolixiviação indireta, o metabolismo das bactérias produz substâncias lixiviantes que

oxidam quimicamente os sulfetos metálicos causando a solubilização. No caso de *A. ferrooxidans*, os lixiviantes produzidos são H_2SO_4 e íons Fe^{3+} (Bosecker, 1997). A reação de dissolução dos sulfetos metálicos não ocorre da mesma maneira. Por isso, dois mecanismos, tiosulfato e polissulfeto, foram propostos para a biolixiviação indireta dos sulfetos metálicos (Schippers & Sand, 1999). O mecanismo do tiosulfato é proposto para sulfetos metálicos insolúveis em meio ácido, como por exemplo, a pirita (FeS_2), a molibdenita (MoS_2) e tungstenita (WS_2). Estes sulfetos são degradados a partir do ataque dos íons Fe^{3+} , formando como produto intermediário o tiosulfato, que por sua vez é transformado em sulfato solúvel. O mecanismo do polissulfeto é proposto para sulfetos de metais solúveis em ácido, como por exemplo, a calcopirita (CuFeS_2) e esfalerita (ZnS), os quais são atacados de forma combinada pelos íons Fe^{3+} e prótons. Os polissulfetos e o enxofre elementar são os produtos intermediários e os produtos finais são sulfato e prótons (Schippers & Sand, 1999). Na prática os dois processos, direto e indireto, ocorrem simultaneamente, em uma série complexa de reações químicas, as quais constituem o mecanismo de cooperação (Rawlings, 2002). Todavia, existe uma certa divergência sobre qual dos dois processos é mais importante para a biolixiviação (Rohwerder *et al.*, 2003).

A biolixiviação é um processo atraente para recuperação de metais de minérios de baixo teor, cuja extração pelos métodos de pirometalurgia e hidrometalurgia não é economicamente viável (Bosecker, 1997; Garcia Jr., 1997; Walting, 2006). A biolixiviação requer um baixo investimento inicial e de manutenção, não necessita de mão-de-obra especializada e, ao contrário do processo pirometalúrgico, não emite SO_2 , o agente causador da chuva ácida (Garcia Jr., 1997). Esse processo é utilizado para a obtenção de cobre e urânio, sendo responsável por 15% e 13% respectivamente, da produção mundial destes metais (Garcia Jr., 1997).

A. ferrooxidans possui também importância ambiental, pois pode ser utilizada na degradação de resíduos químicos provenientes de minerais processados. Os métodos convencionais geralmente apresentam custos elevados e o emprego de *A. ferrooxidans* é uma alternativa econômica e rápida, com benefícios para o meio ambiente (Shiratori & Sonta, 1993; Hubert *et al.*, 1995). Além disso, a capacidade de metabolização de compostos sulfúricos possibilita a utilização de *A. ferrooxidans* em filtros para a eliminação do dióxido de enxofre, um importante poluente ambiental emitido por vários tipos de indústrias

(Bonaventura & Johnson, 1997). Lombardi *et al.* (2006) verificaram que *A. ferrooxidans* foi capaz de remover metais como manganês, alumínio, zinco, cobre e titânio a partir de efluentes municipais, o que destaca a importância deste microrganismo em processos de biorremediação de efluentes.

Resistência a metais

Uma característica marcante de *A. ferrooxidans* é a sua resistência generalizada a altas concentrações de metais, como por exemplo, alumínio, manganês, zinco, cobre, cromo, prata, cádmio, níquel e urânio (Dopson *et al.*, 2003). Isto pode ser atribuído à presença constante de metais no ambiente natural da bactéria, fator que provavelmente determinou a seleção de tipos mais resistentes ao longo da evolução (Novo, 1998). Quanto ao nível de resistência Tuovinen *et al.* (1971) sugeriram que *A. ferrooxidans* pode ser cerca de cem a mil vezes mais tolerante a metais, se comparada a outras bactérias heterotróficas. Estes mesmos autores demonstraram que quando o íon ferroso era utilizado como fonte de energia, a bactéria era até duas mil vezes mais resistente à íons metálicos do que células que utilizaram o tiosulfato. Valores intermediários de resistência foram observados quando o enxofre elementar foi utilizado.

Os genes que conferem resistência ao mercúrio em *A. ferrooxidans* foram isolados (Shiratori *et al.*, 1989) utilizando a técnica de hibridização com sonda radioativa contendo o fragmento determinante da resistência ao mercúrio do transposon Tn501. Estes mesmos autores demonstraram a localização cromossômica dos genes de resistência a mercúrio em *A. ferrooxidans*, sendo que a inserção no cromossomo pode ter ocorrido por eventos de transposição múltipla. Posteriormente, Iwahori *et al.* (2000) demonstraram que a membrana plasmática de algumas linhagens de *A. ferrooxidans* resistentes ao mercúrio possuía uma atividade mercúrio-redutase ($\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$) Fe^{2+} dependente. Aparentemente, componentes do sistema de oxidação de íons Fe^{2+} , as enzimas citocromo c oxidase e rusticianina, estão envolvidas no processo.

Os genes envolvidos no mecanismo de resistência ao arsênio em *A. ferrooxidans* foram clonados e sequenciados por Butcher *et al.* (2000). Células de *Escherichia coli* transformadas com estes genes de *A. ferrooxidans* apresentaram um aumento na resistência

ao arsênio e antimônio. Assim como os genes de resistência ao mercúrio, os genes de resistência ao arsênio também estão localizados no cromossomo da bactéria. Segundo Butcher *et al.* (2000), o mecanismo de resistência ao arsênio em *A. ferrooxidans* envolve um sistema de efluxo de íons por meio de ATPase.

Novo *et al.* (2000) avaliaram a resistência de *A. ferrooxidans* LR aos metais cádmio, níquel, zinco e cobre por eletroforese bidimensional. Em geral, a presença destes metais no meio de cultura resultou na repressão da síntese de diversas proteínas. Porém, na presença de cádmio e cobre, algumas proteínas foram induzidas. Além disso, estes autores mostraram que o nível da fosforilação proteica era maior na presença de cobre e que a maioria das proteínas com síntese induzida por este metal localizava-se na membrana celular, e não no citoplasma. Utilizando a técnica de RAP-PCR (RNA *arbitrarily primed polymerase chain reaction*), Paulino *et al.* (2002) identificaram alguns genes expressos diferencialmente em *A. ferrooxidans* na presença de sulfato de cobre. Entre os genes com expressão aumentada estava um citocromo c, reforçando as evidências de um possível papel desta proteína na resistência a íons metálicos em *A. ferrooxidans*.

Duquesne *et al.* (2003) isolaram a linhagem de *A. ferrooxidans* CC1 de efluentes de uma mina rica em arsênio no sudeste da França, e verificaram que ela era capaz de remover esse metal em condições de laboratório, somente quando crescida em presença de ferro. Além disso, esses autores verificaram uma precipitação do arsênio com o ferro oxidado produzido pelo metabolismo de *A. ferrooxidans*. Sendo assim, os autores concluíram que *A. ferrooxidans* é capaz de remover arsênio de águas ácidas contaminadas.

Cabrera *et al.* (2005) estudaram a cinética de oxidação do sulfato de ferro por *A. ferrooxidans* na presença de diferentes concentrações de vários metais pesados como Cr^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} . Estes autores demonstraram que existe uma inibição não-competitiva dos metais pesados em relação à oxidação bacteriana do sulfato de ferro.

Metabolismo energético

Ramirez *et al.* (2004) analisaram o proteoma de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em meio contendo ferro, enxofre e sulfetos metálicos como pirita (FeS_2) e calcopirita (CuFeS_2), sendo sugerida a existência de diferentes vias de utilização de ferro e

enxofre durante o crescimento da bactéria na presença de sulfetos metálicos contendo ferro. Além disso, foi observado que as mesmas proteínas são sintetizadas na presença de ferro e enxofre, o que indica que as duas vias responsáveis por gerar energia são induzidas simultaneamente dependendo do tipo e da concentração do substrato que vai ser oxidado. Quatrini *et al.* (2006) analisaram, por *microarray*, a expressão de genes em células de *A. ferrooxidans* crescidas em meio contendo ferro ou enxofre, concluindo que a oxidação destes elementos poderia ser regulada de maneira coordenada.

Foram identificados por Quatrini *et al.* (2007) genes regulados pela proteína Fur (*ferric uptake regulator*) que estão associados a diversas funções, como utilização e transporte de metais, regulação transcricional e balanço redox (glutarredoxina, tiorredoxina e glutatona). A regulação por Fur sugere a necessidade do controle de ferro mediante aos efeitos do estresse oxidativo. Nas fases iniciais do crescimento em pH 2,0, onde o ferro é abundante, é esperado que haja um controle sensível dos níveis de expressão dos genes do sistema de captação de ferro pelo Fur. Isso permite que a disponibilidade de ferro seja suficiente para o metabolismo da bactéria, de forma a evitar sobrecargas intracelulares que podem ocasionar estresse oxidativo severo.

Carlos *et al.* (2008) analisaram por PCR em tempo real a expressão dos genes do operon *rus* em *A. ferrooxidans* LR cultivada na presença de ferro, e mantida em contato com os sulfetos calcopirita e covelita (CuS) pelo período de 24 horas. As proteínas codificadas pelos genes deste operon são responsáveis pela transferência de elétrons provenientes do íon ferroso para o oxigênio e/ou para o NAD(P). Foi observado que na presença de calcopirita houve uma pequena redução da expressão dos genes do operon *rus*. Já na presença de covelita essa repressão foi mais notável, devido à ausência do íon ferroso neste sulfeto. Além disso, foi realizada uma análise *in silico* da regulação pós-transcricional dos genes *cycI* e *rus*, por meio da busca de sítios de iniciação da tradução (*Translation Initiation Site* – TIS), para explicar as diferenças de expressão encontradas. O conteúdo da informação obtido para o gene *cycI* (8.4 bits) foi maior que o do gene *rus* (5.5 bits). Os autores sugerem que o metabolismo energético desta bactéria pode estar sendo controlado por diferentes mecanismos a níveis transcricionais e pós-transcricionais.

Sensores redox

O metabolismo bacteriano e a integridade celular são coordenados pelo balanço do estado redox de todos os componentes celulares. Em consequência da respiração aeróbica, substâncias reativas do oxigênio como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas ($OH^\bullet$) são produzidas no interior das células e são normalmente controladas por moléculas antioxidantes. No entanto, havendo um distúrbio desta regulação devido a um excesso de oxidantes e/ou uma carência de antioxidantes, ocorre um aumento das reações de oxidação acarretando no estresse oxidativo (Scandalios, 2002), o qual é capaz de danificar os componentes celulares. Quando isto acontece, as células agem para corrigir os efeitos causados pela oxidação e restaurar o balanço redox.

As bactérias e os demais organismos desenvolveram sensores específicos a fim de monitorar os diferentes sinais redox em múltiplas situações, como a presença ou ausência de oxigênio, de espécies reativas do oxigênio ou alteração no estado redox da célula (Storz & Imlay, 1999; Pomposiello, 2001). Alguns desses sensores envolvem os *clusters* ferro-enxofre, cadeias laterais de aminoácidos sensíveis ao redox, tióis de cisteínas e cofatores ativados pelo estado redox, como por exemplo, flavinas, piridinas e grupos heme. Estes sensores convertem os sinais redox que vão atuar geralmente ao nível transcricional, permitindo a adaptação da bactéria ao ambiente modificado (Green & Paget, 2004). Estes sistemas de defesa antioxidante foram melhor caracterizados em *E. coli*, na qual fatores de transcrição do tipo OxyR e SoxR são capazes de ativar genes com função antioxidante em resposta ao estresse oxidativo.

No citoplasma, o ambiente redutor é mantido pelos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina. Esses sistemas são as principais vias dependentes do redox de tióis, nas quais muitas proteínas podem ser reduzidas. O estado redox é um mediador crucial de múltiplos processos metabólicos, de sinalização e eventos transcricionais nas células e as proteínas tióis, sob a forma de resíduos de cisteína, exercem um papel chave na detecção e regulação redox. As proteínas tiorredoxina e glutarredoxina são tióis dissulfeto óxido-redutases (Holmgren, 1989), de baixo peso molecular, inicialmente identificadas como cofatores ditióis para a ribonucleotídeo redutase em *E. coli* (Laurent *et al.*, 1964; Holmgren, 1976). Estas proteínas possuem um sítio ativo rico em cisteínas altamente conservado em

uma estrutura comum chamada de dobramento tiorredoxina (CXXC) (Holmgren, 1985, 1995a; Martin, 1995). Essas proteínas exibem uma configuração tridimensional conhecida como motivo tiorredoxina, que é constituído por cinco folhas beta cercadas por quatro alfa-hélices (Ecklund *et al.*, 1991; Holmgren, 1995b; Martin, 1995; Capitani *et al.*, 2000).

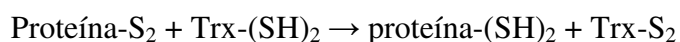
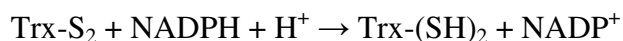
Alterações no estado redox de tióis dissulfetos são importantes para o controle da ativação de proteínas, sendo que a oxidação de determinadas cisteínas pode ativar ou inativar proteínas. O elétron transferido no citoplasma recicla enzimas como ribonucleotídeo redutase, que é essencial para a biossíntese do DNA (Holmgren, 1976), metionina sulfóxido redutase (Boschi-Muller *et al.*, 2001), arsenato redutase (Messens *et al.*, 1999) e 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato redutase. Esta enzima é responsável pela redução da 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), que é capaz de reduzir o sulfato a sulfito, que é o primeiro passo para a via de biossíntese de cisteína. Esta enzima também é essencial para o metabolismo de enxofre (Russel *et al.*, 1990). Outras enzimas relacionadas a processos anabólicos e de controle das condições de estresse foram descritas (Vlami-Gardikas, 2008).

Existem duas rotas para o destino dos elétrons a partir do NADPH que, por meio de reações de redução, mantêm as proteínas citoplasmáticas num estado reduzido (Vlami-Gardikas & Holmgren, 2002). Apesar de glutarredoxina e tiorredoxina exibirem estruturas tridimensionais e sítios ativos semelhantes, as fontes de elétrons requeridos para manutenção das atividades redutoras são diferentes. Tais rotas podem ser divididas em dois sistemas:

Sistema tiorredoxina: Tiorredoxina redutase $\rightarrow$ Tiorredoxina

Sistema glutarredoxina: Glutathione redutase $\rightarrow$ Glutathione $\rightarrow$ Glutarredoxina

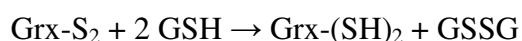
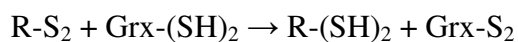
No sistema tiorredoxina, a redução do sítio ativo (CGPC) da tiorredoxina é catalisada pela proteína tiorredoxina redutase (TrxR), que utiliza elétrons do NADPH (Holmgren *et al.*, 2005). A reação ocorre conforme as equações abaixo:



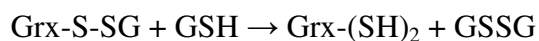
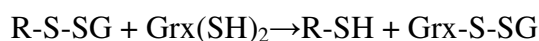
Uma análise do proteoma de *E. coli* realizada por Kumar *et al.* (2004), resultou na identificação de muitas proteínas associadas à tiorredoxina. Foram encontradas oitenta proteínas associadas com a Trx1, de forma que a tiorredoxina estava envolvida em, pelo menos, vinte e seis processos celulares distintos, como por exemplo, divisão celular, regulação transcricional, transdução de energia, degradação, enovelamento de proteínas e rotas de biossíntese de ácidos graxos, açúcares, aminoácidos, e outros. As tiorredoxinas também desempenham um papel importante na atuação contra o estresse oxidativo, por meio da redução de peróxido de hidrogênio, além de servirem como substrato para a redução de peroxirredoxinas (Chae *et al.*, 1994).

O sistema glutarredoxina desempenha um papel chave na proteção das macromoléculas da célula contra os danos causados por espécies eletrofílicas e reativas do oxigênio (Reed, 1995). Geralmente, a proteína glutarredoxina contém o motivo CPYC no sítio ativo e são capazes de catalisar reações tanto pelo mecanismo ditiol, semelhante ao que ocorre com o sistema tiorredoxina, como pelo monotiol (Bushweller *et al.*, 1992; Holmgren & Aslund, 1995). A glutarredoxina é requerida para a redução de dissulfetos híbridos da proteína glutathione. Os mecanismos mono e ditiol podem ser esquematizados da seguinte forma:

Mecanismo ditiol:



Mecanismo monotiol:



As glutarredoxinas estão envolvidas em muitas funções celulares ao alterar o estado redox de proteínas alvo envolvidas na síntese de DNA, transdução de sinal e defesa contra o estresse oxidativo (Ortenberg *et al.*, 2004).

As proteínas dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina além de serem eficientes como oxidorredutases, podem ser capazes de auxiliar o enovelamento de outras proteínas, atuando assim como chaperona ou co-chaperona (Berndt *et al.*, 2008).

Outras enzimas antioxidantes

Outras enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase atuam na remoção de radicais livres, sendo capazes de eliminar ou impedir sua transformação em produtos mais tóxicos para as células.

A enzima SOD é responsável pela catalisação da reação de dismutação do íon superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular e corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição (Fridovich, 1995). As SODs podem ser classificadas de acordo com o cofator (íon metálico) requerido para a sua atividade. Os cofatores podem ser: ferro (FeSOD), manganês (MnSOD), cobre-zinco (Cu/ZnSOD) ou níquel (NiSOD) (Cannio *et al.*, 2000). As FeSODs e MnSODs apresentam alta homologia em relação a estrutura primária e terciária (Parker *et al.*, 1987; Parker & Blake, 1988).

As enzimas FeSOD e MnSOD são encontradas predominantemente no citoplasma de procariotos (Bowler *et al.*, 1992) e em eucariotos, podem estar presentes em cloroplastos (FeSOD) e em mitocôndrias (MnSOD) (Cannio *et al.*, 2000). Em contrapartida, a proteína Cu/ZnSOD é geralmente encontrada em eucariotos (Canio *et al.*, 2000). Em procariotos esta enzima não é necessária para o crescimento bacteriano em condições controladas de laboratório e parece não exercer função de detoxificação do íon O_2^- produzido no interior da célula. A Cu/ZnSOD está envolvida na proteção de origem externa, principalmente durante processos infecciosos (Farrant *et al.*, 1997; Sansone *et al.*, 2002). Já a proteína NiSOD foi recentemente descoberta em algumas espécies do gênero *Streptomyces* (Youn *et al.*, 1996; Wuerges *et al.*, 2004) e em cianobactérias (Eitinger, 2004).

A inativação dos genes *sodA* e *sodB*, que codificam, respectivamente as proteínas MnSOD e FeSOD de *E. coli*, aumentou a suscetibilidade ao estresse oxidativo, as taxas de mutação, além do comprometimento do crescimento em meio mínimo, pois o íon superóxido (O_2^-) inativou as enzimas que são necessárias para a biossíntese de aminoácidos (Carlioz & Touati, 1986).

A catalase atua como catalisadora da reação que envolve o peróxido de hidrogênio, produzindo água e oxigênio molecular e há mais de cem anos esta enzima tem sido estudada e caracterizada em diversos organismos (Nicholls *et al.*, 2001). As catalases podem ser classificadas em catalases monofuncionais, Mn-catalase ou catalase peroxidase,

de acordo com a sequência de aminoácidos, estrutura tridimensional e função (Chelikani *et al.*, 2004). A atividade da catalase pode sofrer variações, sendo que algumas espécies de bactérias anaeróbias facultativas não possuem atividade para essa enzima (Rolfe *et al.*, 1978). A partir das sequências obtidas do genoma de *A. ferrooxidans*, Valdés *et al.* (2008) verificaram por meio de análises de bioinformática que essa bactéria não possui genes que codificam catalases.

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo analisar as proteínas e os genes envolvidos no metabolismo energético e sistema antioxidante em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Capítulo 1: Análise da expressão de genes dos sistemas tioredoxina e glutaredoxina de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR em diferentes condições por PCR em tempo real.

- Análise da expressão, por PCR em tempo real, dos genes que codificam para glutathione redutase, glutaredoxina, tioredoxina redutase e tioredoxina em *A. ferrooxidans* LR nas condições que se seguem:

- Diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} (50, 75 e 100%);
 - Diferentes tempos, um e dois dias, após 100% de oxidação de Fe^{2+} ;
 - Presença de calcopirita (CuFeS_2) por 24 horas;
 - Após 0, 15, 30 e 60 minutos de *heat shock*.
- Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio, pH e potencial redox do meio de cultivo em diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} e em um e dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+} .

Capítulo 2: Caracterização bioquímica de enzimas integrantes do sistema antioxidante em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR mantida em contato com calcopirita.

- Análise das sequências de aminoácidos das enzimas glutathione redutase, tioredoxina redutase e superóxido dismutase;
- Quantificação de proteína total em *A. ferrooxidans* LR cultivada até 80% de oxidação de Fe^{2+} e mantida em contato com calcopirita por 1 e 10 dias;

- Determinação da atividade da enzima glutathione reductase em espectrofotômetro e em gel;
- Determinação da atividade da enzima thioredoxin reductase em espectrofotômetro;
- Determinação da atividade e a classe da enzima superóxido dismutase em gel.

CAPÍTULO 1

Análise da expressão de genes dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR em diferentes condições por PCR em tempo real

INTRODUÇÃO

Acidithiobacillus ferrooxidans são bacilos não patogênicos, Gram negativos, com flagelos polares, temperatura ótima de crescimento de aproximadamente 30°C e pH ótimo variando em torno de 2,0 (Kelly & Wood, 2000). Esta bactéria quimiolitotrófica pode crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (Rawlings & Kusano, 1994). Ela possui resistência natural a altas concentrações de vários íons metálicos, sendo que no caso do cobre essa resistência pode chegar a concentrações na ordem de 10 g/L, em algumas linhagens (Dopson *et al.*, 2003; Tuovinen *et al.*, 1971). *A. ferrooxidans* é capaz de obter energia por meio da oxidação aeróbica de íons ferrosos, enxofre elementar e compostos inorgânicos contendo formas reduzidas de enxofre, como sulfitos, sulfetos e tiosulfatos (Leduc & Ferroni, 1994). Esta bactéria é um dos principais microrganismos envolvidos na biolixiviação, processo que utiliza uma comunidade de microrganismos para recuperação, por ação direta ou indireta, de metais que se encontram em minérios, como por exemplo, calcopirita (CuFeS_2), covelita (CuS) e bornita (Cu_5FeS_4).

Os organismos que vivem sob condições aeróbicas, como por exemplo, *A. ferrooxidans*, estão sujeitos à produção de substâncias reativas do oxigênio como subprodutos do metabolismo. Esses organismos podem estar expostos a diferentes tipos de estresse que normalmente são controlados por moléculas antioxidantes (Scandalios, 2005). Em pequenas concentrações, as substâncias reativas do oxigênio podem agir como moléculas mensageiras durante a transdução de sinais (Suzuki *et al.*, 1997). No entanto, quando há um excesso e/ou um distúrbio da regulação dessas substâncias reativas, ocorre o estresse oxidativo (Scandalios, 2002), que pode desequilibrar o balanço redox e ocasionar danos às macromoléculas biológicas (Scandalios, 2005).

No citoplasma de procariotos existe um ambiente altamente redutor, constituído por um grupo de proteínas que pertencem à superfamília tiorredoxina (Prinz *et al.*, 1997), que formam dois sistemas: tiorredoxina e glutarredoxina. O sistema tiorredoxina é composto por NADPH, tiorredoxina redutase e tiorredoxina; e o sistema glutarredoxina é composto por NADPH, glutathione redutase, glutathione e glutarredoxina (Holmgren, 1989).

As tiorredoxinas e as glutarredoxinas são óxidoredutases, de baixo peso molecular, capazes de reduzir as ligações dissulfeto de outras proteínas (Holmgren, 1989). Os

membros integrantes desta superfamília apresentam duas cisteínas no sítio ativo CXXC, chamado de motivo tiorredoxina (Martin, 1995). As reações que envolvem a troca de grupos tióis-dissulfetos são altamente específicas nos sistemas biológicos e as tiorredoxinas e as glutarredoxinas, além de serem eficientes redutoras de ligações dissulfeto, podem agir no enovelamento de outras proteínas (Berndt *et al.*, 2008).

Apesar do gene que codifica a proteína glutational redutase de *A. ferrooxidans* ter sido clonado e expresso em *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2007), muito pouco é conhecido sobre o sistema antioxidante desta bactéria acidofílica, no qual estão envolvidas proteínas dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina. Assim sendo, neste trabalho foi realizada a análise da expressão de genes dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina em *A. ferrooxidans* LR, por PCR em tempo real, em diferentes taxas de oxidação do íon ferroso, na presença de calcopirita e após o *heat shock*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Para o desenvolvimento do projeto foi utilizada a linhagem de *A. ferrooxidans* LR, isolada de efluente ácido de coluna de lixiviação de minério de urânio em Lagoa Real, Bahia (Garcia Jr, 1991).

Meio de cultura

Para o crescimento da bactéria foi utilizado o meio de cultura T&K líquido (Tuovinen & Kelly, 1972), com pequenas modificações, como descrito a seguir:

Solução A:

K ₂ HPO ₄	0,4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,4 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 g
H ₂ O Milli-Q.....	q.s.p. 800 mL

Solução B:Fe₂SO₄.7H₂O167 gH₂O Milli-Qq.s.p. 1000 mL

O pH de ambas as soluções foi ajustado para 1,8 com ácido sulfúrico concentrado. A solução A foi esterilizada em autoclave (120°C, 20 min) e a solução B por filtração em membrana (0,22 µm - Millipore). No momento do uso, as soluções A e B foram misturadas na proporção de 4:1, respectivamente. Para o cultivo da bactéria na presença do sulfeto metálico, foi adicionada calcopirita, autoclavada em ciclo aberto por 20 minutos, na concentração de 2,5% (p/v) na solução A.

Condições de crescimento da bactéria e obtenção da massa celular

A massa celular de *A. ferrooxidans* LR foi obtida a partir de quatro experimentos diferentes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

a) Diferentes taxas de oxidação de Fe²⁺: Foram inoculadas aproximadamente $2,0 \times 10^{12}$ células/mL em meio T&K. A cultura foi incubada a 30°C, 250 rpm até atingir as taxas de 50, 75 e 100% de oxidação do Fe²⁺. A porcentagem de oxidação de Fe²⁺ foi monitorada pelo método de titulação com dicromato de potássio (Garcia Jr *et al.*, 1995). Em seguida, as células foram filtradas em papel de filtro comum, coletadas por filtração em membrana Millipore (0,22 µm), centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos e lavadas com T&K para obtenção de células livres de ferro. Posteriormente, as células foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA.

b) Um e dois dias após 100% de oxidação do Fe²⁺: As células foram cultivadas como descrito no item a, até atingir a taxa de 100% de oxidação do Fe²⁺ (controle) e nos tempos de 24 e 48 horas após 100% de oxidação de Fe²⁺. As células foram coletadas, lavadas, congeladas e armazenadas a -80°C.

c) Contato com calcopirita: As células foram cultivadas como descrito em a, até atingir 80% de oxidação do Fe²⁺. Em seguida, as células foram coletadas, lavadas, ressuspensas

e inoculadas em T&K contendo 2,5% (p/v) de calcopirita. Os inóculos foram incubados a 30°C, 250 rpm, por 24 horas. As células foram coletadas, lavadas, congeladas e armazenadas a -80°C.

d) *Heat shock*: As células foram cultivadas nas condições descritas em a, até atingir 50% de oxidação do Fe^{2+} . As células foram centrifugadas a 12000 rpm, por 3 minutos e lavadas com T&K. Posteriormente, as células foram inoculadas em meio T&K e incubadas a 40°C, 250 rpm, por 0, 15, 30 e 60 minutos. Assim que foram atingidos os tempos de incubação, as células foram coletadas e o RNA foi isolado.

Isolamento de RNA

O RNA foi isolado segundo o método descrito por Winderickx & Castro (1994), com modificações. As células foram lavadas com TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) e em seguida, foram ressuspensas em 800 μL de tampão de extração (EDTA 1 mM; LiCl 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5). Posteriormente, foram adicionados 800 μL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) contendo 80 μL de SDS 10%. As amostras foram agitadas por 2 minutos em um *vortex* e centrifugadas a 10000 rpm por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo *ependorf* novo e todo processo foi repetido até que a interface não estivesse mais visível. O RNA foi precipitado por meio da adição de acetato de sódio 40% (1/20 do volume) e etanol absoluto (2 volumes). O RNA foi armazenado a -80°C por no mínimo, 2 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas e o precipitado (RNA) foi lavado com etanol 70%. O RNA foi solubilizado em água contendo DEPC (dietil pirocarbonato) e armazenado a -80°C. A concentração do RNA foi determinada em um espectrofotômetro e a sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 6% de formaldeído, em tampão MOPS 1x (MOPS 10x: 41,8 g de MOPS, 16,6 mL de acetato de sódio 3 M, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; água q.s.p. 1000 mL; pH 7,0).

Tratamento do RNA com DNase e síntese do cDNA

Foi tratado cerca de 1 µg de RNA total. Para cada 8 µL de RNA foram adicionados 1 µL de tampão para DNase e 1 µL de DNase (Invitrogen). As amostras foram mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foi acrescentado 1 µL de EDTA. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos e, em seguida, colocadas no gelo. Uma µg de RNA tratado foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

PCR em tempo real

A quantificação da expressão dos genes da superfamília tiorredoxina em diferentes condições experimentais foi realizada por PCR em tempo real. As reações foram realizadas em um equipamento 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As reações foram preparadas como descrito a seguir, em um volume final de 15 µL: 6,25 µL de *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 10 µM de cada *primer* e 100 ng de cDNA. Os *primers* (tabela 1) foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), utilizando como molde a sequência genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (TIGR – <http://cmr.tigr.org>). Para a amplificação do gene constitutivo *alaS*, que codifica a proteína alanil tRNA sintetase, foram utilizados os *primers* alaS13 (direto) e alaS3 (inverso) (Yarzabal *et al.*, 2004).

TABELA 1 – *Primers* utilizados no PCR em tempo real.

<i>Locus</i>	<i>Gene</i>	<i>Proteína</i>	<i>Primers (5'→ 3')</i>	
			Direto	Inverso
AFE_0740	<i>grxC</i>	glutarredoxina 3	AGCAGTAAGGGGATCACACC	TGCGGCAAGGTCATCATAG
AFE_2383	<i>trx</i>	tiorredoxina	CGGTATTGGTCGATTTCTGG	GGGGAGTATTGGGATTTTCG
AFE_2657	<i>trxB</i>	tiorredoxina dissulfeto redutase	ATGGCCAAGGAAAATGTCAC	GGTGCTGCCGTTTCTACAT
AFE_2666	<i>gor</i>	glutathione redutase	TCACCTCGGACGGATTCTT	GAAACGTCACTGCCGAGAG
AFE_2112	<i>alaS</i>	alanil tRNA sintetase	GTGCCTTTCCCGAACTCACG	TCCTCCAGCAGACTGAGTCC

Para as amplificações foram utilizadas as condições descritas a seguir: 2 minutos a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento por 20 segundos a 60°C e extensão a 72°C por 30 segundos, seguida da uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando em 95°C). Por meio desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo (*SYBR Green*) usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado.

Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t (*threshold cycle*) foi utilizada para avaliação da expressão gênica. O programa *Real-Time System RQ Study Software* v. 1.3.1 (Applied Biosystems) foi utilizado para coleta dos dados. Os genes analisados tiveram sua expressão normalizada com o gene constitutivo *alaS*. Para o experimento com calcopirita e para os tempos (um e dois dias) após 100% de oxidação do Fe^{2+} , a expressão relativa dos genes comparada ao seu controle foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001), sendo que no primeiro experimento, o controle utilizado foi a taxa de oxidação de 80% de Fe^{2+} e, no o segundo, a taxa de oxidação de 100% de Fe^{2+} . Para o experimento das diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} (50%, 75% e 100%) e do *heat shock*, a expressão relativa dos genes foi determinada pelo método do $2^{-\Delta C_t}$ (diferença do C_t do gene e do endógeno). Todos os dados foram expressos como médias acrescidas de seu

desvio padrão e analisados pelos testes: Teste t de Student ou Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Métodos analíticos

a) Determinação do potencial redox (E_h) e pH: Foram realizadas medidas do potencial redox e pH de amostras do meio de cultivo (aproximadamente 25 mL) obtido dos experimentos das diferentes taxas de oxidação do Fe^{2+} e dos diferentes tempos após 100% de oxidação do Fe^{2+} . As medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25°C). Os equipamentos utilizados para a leitura do potencial redox e do pH foram, respectivamente, Eh-metro da Digmed, modelo DM20, com eletrodo Ag/AgCl-Pt e pHmetro Corning, modelo 440.

b) Determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): A determinação do teor de H_2O_2 foi avaliada em amostras do meio de cultivo (25 mL) obtido dos experimentos das diferentes taxas de oxidação do Fe^{2+} e dos diferentes tempos após 100% de oxidação do Fe^{2+} por titulação iodométrica (Jeffery *et al.*, 1992). A solução de tiosulfato de sódio (Na_2SO_3) foi utilizada como agente titulante e a solução de molibdato de sódio (Na_2MoO_4) 3% como agente catalisador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

***Acidithiobacillus ferrooxidans* LR em diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} : expressão de genes dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina, pH, potencial redox e concentração de H_2O_2**

a) Análise da expressão dos genes dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina

Em *E. coli*, na fase exponencial de crescimento são gerados radicais reativos do oxigênio devido à auto-oxidação dos componentes da cadeia respiratória (Storz & Imlay,

1999). As proteínas dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina estão associadas no combate destas espécies reativas de oxigênio e na manutenção do ambiente redutor da célula (Ritz & Beckwith, 2001). Pouco se sabe sobre a expressão dos genes destes sistemas durante o crescimento de *A. ferrooxidans* LR na presença de Fe^{2+} . Assim sendo, os genes *trxB*, que codifica a proteína tiorredoxina dissulfeto redutase (TrxR); gene *trx*, proteína tiorredoxina (Trx); gene *gor*, proteína glutathiona redutase (GR) e gene *grxC*, proteína glutarredoxina 3 (Grx3) foram analisados nesta bactéria por PCR em tempo real, nas taxas de 50, 75 e 100% de oxidação de Fe^{2+} (figura 1).

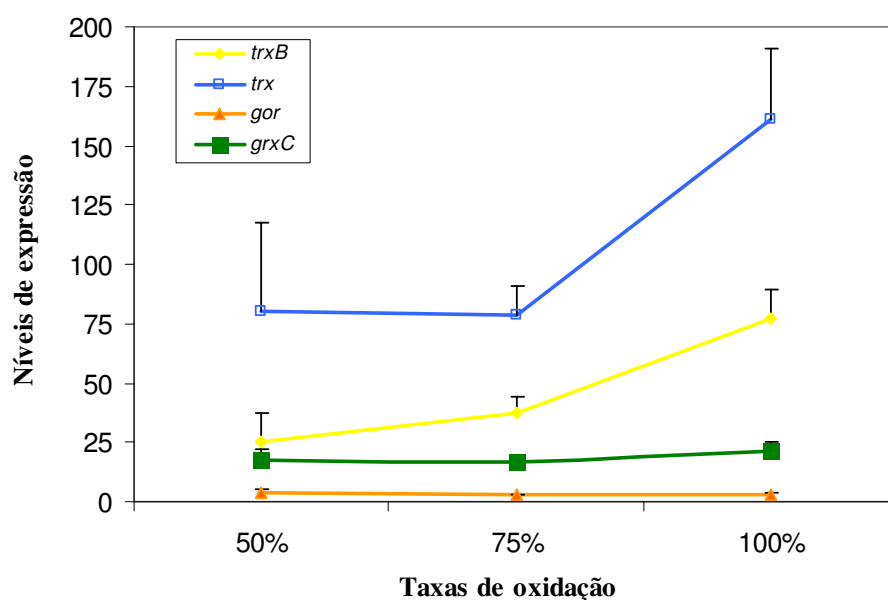


FIGURA 1 – Expressão dos genes da superfamília tiorredoxina de *A. ferrooxidans* LR em diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} .

Nas diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} , os genes do sistema tiorredoxina foram os que apresentaram a maior expressão, sendo que a expressão de *trx* foi maior do que a de *trxB*. Os maiores níveis de expressão destes dois genes foram observados na taxa de 100% de oxidação de Fe^{2+} (figura 1, tabela 2). A expressão dos genes *grxC* e *gor*, integrantes do sistema glutarredoxina, foi semelhante nas diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} (figura 1,

tabela 2) e não apresentou grandes variações a medida que a taxa de oxidação de Fe^{2+} aumentou de 50 para 100%.

TABELA 2 – Média de tratamento em cada uma das taxas de oxidação de Fe^{2+} seguida por uma mesma letra não difere estatisticamente entre si. *ANOVA (F): diferenças significativas a 5%.

Gene	50%	T. Tukey	75%	T. Tukey	100%	T. Tukey
<i>trxB</i>	24,89	B	37,34	B	77,00	B
<i>Trx</i>	80,22	A	78,50	A	161,24	A
<i>Gor</i>	3,64	B	2,71	C	3,04	C
<i>grxC</i>	17,27	B	16,97	C	21,63	C
ANOVA (F)	8,438*		66,083*		58,584*	

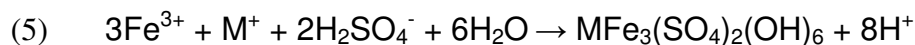
Em 100% de oxidação de Fe^{2+} *A. ferrooxidans* LR está no final da fase logarítima (de Knecht, 2004). Logo, a maior expressão dos genes do sistema tiorredoxina nesta taxa de oxidação de Fe^{2+} possivelmente ocorre para impedir que as substâncias reativas do oxigênio geradas pela respiração aeróbica danifiquem as células e os seus componentes e/ou para garantir que o balanço redox do meio não seja alterado.

b) Análise do pH

Durante as diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} , foram observadas pequenas variações nos valores de pH. Inicialmente, verificou-se que o valor de pH foi de 1,8 e no decorrer do experimento o pH se manteve em torno de 2,0. O aumento do valor de pH pode ser em decorrência do processo oxidativo do Fe^{2+} (equação 1), no qual ocorre o consumo de íons hidrogênio (H^+), e assim, o pH do meio aumenta. No entanto, esse aumento de pH é contrabalançado pela hidrólise do Fe^{3+} (equações 2 a 4) (Daoud & Karamanev, 2006), que é muito menos solúvel e precipita como hidróxido férrico, $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

- (1) $4\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ \xrightarrow{\text{A. f}} 4\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O}$
- (2) $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeOH}^{2+} + \text{H}^+$
- (3) $\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2^+ + \text{H}^+$
- (4) $\text{Fe}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3 + \text{H}^+$

Assim, é de se esperar que o pH do sistema sofra variações com o aumento das reações de oxidação e de hidrólise, ainda que estas alterações sejam pequenas. Além disso, existe uma reação de competição com a reação de hidrólise, na qual são gerados produtos, como por exemplo, o hidroxissulfato básico férrico, com a seguinte fórmula $\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, onde M pode ser algum dos seguintes cátions monovalentes: K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ag^+ ou H_3O^+ . Estes precipitados são conhecidos como jarosita. A precipitação da jarosita é dependente do pH, da concentração de íons e da composição do meio de cultivo. A reação a seguir (equação 5), mostra como a jarosita pode ser formada (Jensen & Webb, 1995):



Quando as células de *A. ferrooxidans* são cultivadas em meio contendo Fe^{2+} e em valores de pH em torno de 2.0, a bactéria apresenta um pH interno em torno de 6.5 (Cox *et al.*, 1979). Em procariotos e eucariotos, as proteínas da superfamília tiorredoxina apresentam diferentes valores de pKa (valor de pH no qual o composto ionizável está metade protonado e metade desprotonado), e mesmo entre as proteínas dos sistemas tiorredoxina e glutaredoxina há essa divergência. A tiorredoxina redutase age preferencialmente em valores de pKa compreendidos entre 6,4 a 9,13 (Huang *et al.*, 2008). A tiorredoxina atua em valores de pKa 6,3 a 7,5. (Dillet *et al.*, 1998; Kallis & Holmgren, 1980). Já a glutathione redutase atua em pKa de 8,5 (Veine *et al.*, 1998) e a glutaredoxina em valores de pKa de 3,8 (Gan & Wellls, 1988). Nas diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} os genes do sistema tiorredoxina de *A. ferrooxidans* LR tiveram um nível de expressão maior em relação aos genes do sistema glutaredoxina. Isto pode ter ocorrido porque o valor

do pKa das proteínas codificadas pelos genes do sistema tiorredoxina é mais próximo ao pH interno de *A. ferrooxidans* quando o Fe^{2+} é oxidado.

c) Análise do potencial redox (E_h)

Foram realizadas medidas do E_h do meio contendo as células de *A. ferrooxidans* LR nas diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} , assim como nos tempos de um e dois dias após a taxa de 100% de oxidação do Fe^{2+} (figura 2).

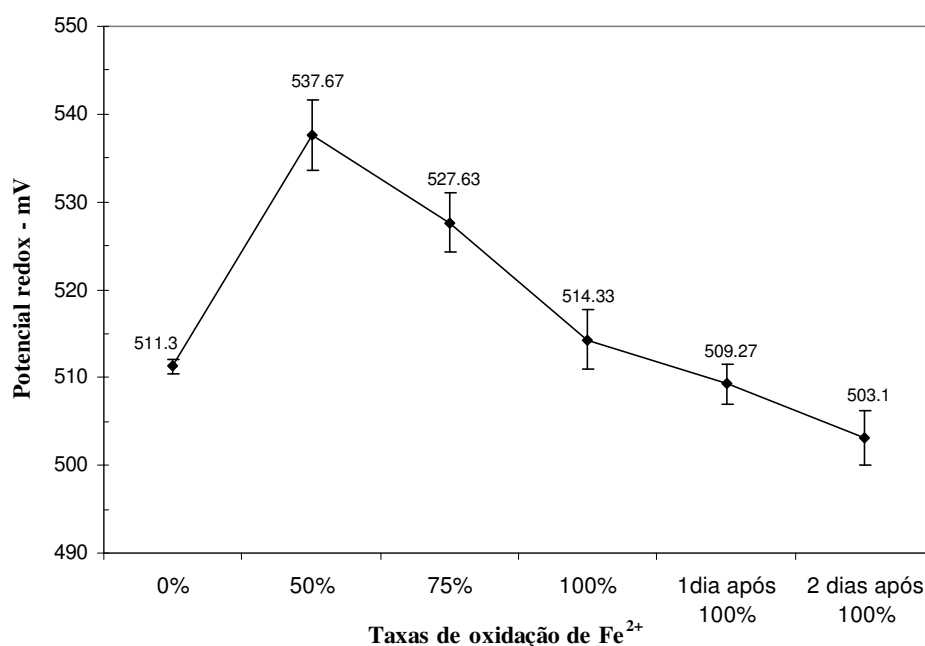


FIGURA 2 – Média dos valores de potencial redox em milivolts (mV) em diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} em *A. ferrooxidans* LR.

Na presença da bactéria, o potencial redox da solução é determinado em função dos íons $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (Rawlings, 2005). Em 0% de oxidação de Fe^{2+} , o valor do potencial redox foi de 511,3 mV. Em 50% de oxidação do Fe^{2+} , o potencial redox foi de 537,67 mV. Este aumento é decorrente do processo metabólico da bactéria que é capaz de oxidar ativamente o Fe^{2+} . Em 75% de oxidação do Fe^{2+} o valor de potencial redox foi de 527,63 mV. Nesta taxa de oxidação o Fe^{3+} gerado é precipitado sob a forma de jarosita e há uma menor

concentração de íons disponíveis em solução, por isso o potencial redox diminui. Em 100% de oxidação de Fe^{2+} , o potencial redox foi de 514,33 mV e tende a se estabilizar, assim como foi observado em um e dois dias após 100% de oxidação, cujos valores foram, respectivamente, de 509,27 mV e 503,10 mV. Isto pode ter ocorrido devido à grande concentração ferro no meio. Assim, por mais que ocorra a precipitação dos íons Fe^{3+} , haverá sempre uma alta concentração destes íons no meio de cultivo, mantendo o potencial redox estável.

d) Análise da concentração de peróxido de hidrogênio

Christman *et al.* (1985), demonstraram que a expressão de cerca de trinta proteínas da bactéria *Salmonella typhimurium* foi induzida em resposta a concentrações não letais de H_2O_2 . Dentre elas, a proteína glutathiona redutase, que teve o nível de expressão aumentado quatro vezes em relação ao seu controle. A expressão *in vivo* de genes de *E. coli* integrantes do sistema tiorredoxina, sistema glutarredoxina e membros dos regulons de OxyR e SoxRS foi avaliada por Prieto-Álamo *et al.* (2000) na presença e ausência de peróxido de hidrogênio, paraquat e hidroxiuréia. O tratamento com o peróxido de hidrogênio estimulou a expressão dos genes *gorA*, *grxA* e *fpg* que codificam, respectivamente, as proteínas glutathiona redutase, glutarredoxina 1 e formamidopirimidina DNA glicosilase. Na presença de paraquat, a expressão dos genes citados anteriormente foi ainda maior. Isto provavelmente ocorreu devido à conversão do íon superóxido presente no paraquat a peróxido de hidrogênio (Prieto-Álamo *et al.*, 2000).

Para obter maior informação sobre a relação entre o aumento dos níveis de expressão dos genes da superfamília tiorredoxina ao longo das diferentes taxas de oxidação do íon ferroso, foi realizada a quantificação de H_2O_2 nas diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} e em 1 e dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+} (figura 3).

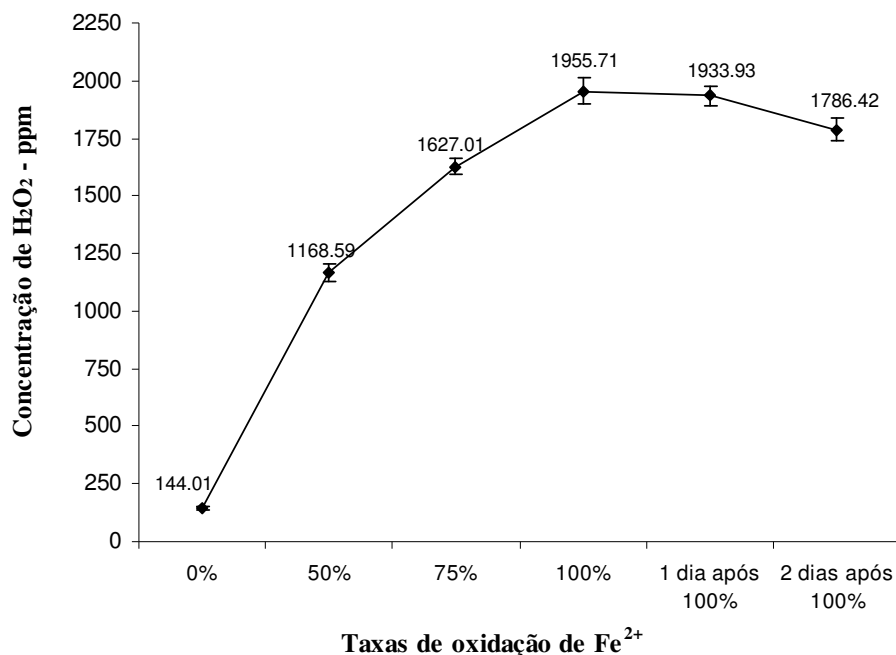
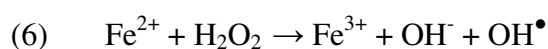


FIGURA 3 – Média dos valores do teor de H_2O_2 em ppm nas diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} por *A. ferrooxidans* LR.

Inicialmente, a quantidade de H_2O_2 encontrada, em ppm, foi de 144,01. Na taxa de 50% de oxidação de Fe^{2+} , o teor de H_2O_2 foi de 1168,59 ppm. Assim, houve um aumento de aproximadamente 8,0 vezes em relação ao ponto inicial. Na taxa de 75% de oxidação do Fe^{2+} , a quantidade de H_2O_2 foi de 1627,01 ppm ou seja, 11,29 vezes maior que a do ponto 0. A maior concentração de H_2O_2 , 1955,71 ppm, foi observada na taxa de 100% de oxidação de Fe^{2+} . Este valor é 13,58 vezes maior que a concentração inicial. Em um dia após 100% de oxidação de Fe^{2+} , a concentração de H_2O_2 se manteve estável, já que a quantidade encontrada de 1933,93 ppm é muito similar à taxa observada em 100% de oxidação do Fe^{2+} . Em dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+} , a concentração de H_2O_2 foi de 1786,42 ppm, apresentando assim, uma pequena queda, em relação às taxas de 100% e um dia após 100% da oxidação do Fe^{2+} .

Alguns radicais reativos do oxigênio são formados como produto do metabolismo primário de *A. ferrooxidans*, que é capaz de promover a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} . Dentre eles, o H_2O_2 , que teve sua concentração aumentada nas diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} .

por *A. ferrooxidans* LR. Isto pode ser explicado porque o Fe^{2+} é solúvel no meio de crescimento da bactéria e na presença de H_2O_2 age como catalisador da reação de Fenton (equação 6). Essa reação foi proposta inicialmente por Henry J. H. Fenton, em 1894, para a oxidação do ácido tartárico a partir do H_2O_2 e sulfato ferroso. Atualmente é conhecida como "reação Fenton", uma das reações de oxidação mais potentes que existe, a qual determina a formação do radical hidroxila. Este, por sua vez, é altamente reativo e destrutivo à célula, visto que não existem sistemas enzimáticos capazes de reduzir a sua concentração (Kiley & Storz, 2004).



A concentração de H_2O_2 foi medida no meio extracelular. No entanto, é muito provável que a maior concentração de H_2O_2 seja responsável pelo aumento da expressão dos genes, principalmente os do sistema tiorredoxina, em *A. ferrooxidans* LR nas etapas finais de oxidação de Fe^{2+} .

Análise da expressão dos genes dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR em um e dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+}

Como citado acima, os genes da superfamília tiorredoxina apresentaram os maiores níveis de expressão em 100% Fe^{2+} . No entanto, esta taxa de oxidação não corresponde exatamente à fase estacionária de crescimento da bactéria. Assim sendo, foi analisada a expressão desses genes em um e dois dias após 100% de oxidação Fe^{2+} (fase estacionária).

a) Análise da expressão gênica em um dia após 100% de oxidação de Fe^{2+}

Fahey *et al.* (1978) verificaram em *E. coli* um aumento significativo dos níveis de glutathione, uma das proteínas pertencente à superfamília tiorredoxina durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária. Loewen (1979) demonstrou que os níveis de glutathione aumentavam cerca de seis vezes quando as células de *E. coli* atingiam a fase

estacionária de crescimento. Assim sendo, a expressão dos genes dos sistemas tiorredoxina e glutaredoxina foi analisada em 1 dia após 100% de oxidação de Fe^{2+} para detectar possíveis alterações entre as fases logarítmica e estacionária em *A. ferrooxidans* LR.

Em um dia após 100% de oxidação de Fe^{2+} , os genes *trxB*, *trx* e *gor* tiveram a expressão relativa induzida, enquanto a expressão do gene *grxC* se manteve inalterada (figura 4), conforme a análise estatística usando o teste t de Student ao nível de significância de 5%.

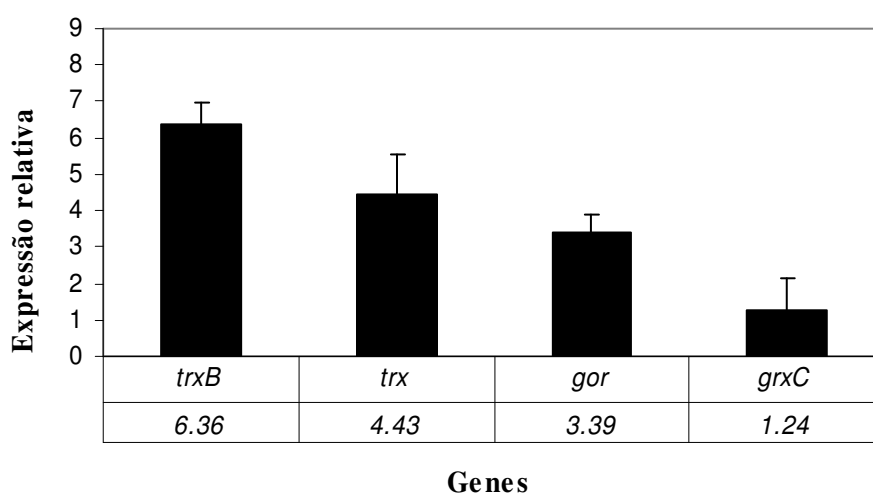


FIGURA 4 – Expressão dos genes da superfamília tiorredoxina de *A. ferrooxidans* LR em um dia após 100% de oxidação do Fe^{2+} .

Em *E. coli*, a tiorredoxina 1 e a glutaredoxina 1 são capazes de promover a redução da 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) redutase, enzima precursora da assimilação do sulfato. Porém, devido à maior concentração dos níveis intracelulares da proteína tiorredoxina 1 (10 mM) comparados com a concentração de glutaredoxina 1 (dez vezes menor), foi sugerido que *in vivo* há uma preferência da tiorredoxina 1 como doadora de hidrogênio para a redução do sulfato (Lillig *et al.*, 1999). Assim sendo, em um dia após 100% de oxidação, é possível que as células de *A. ferrooxidans* estejam utilizando enxofre

como fonte de energia e os genes do sistema tiorredoxina foram mais induzidos provavelmente por estarem envolvidos na redução da enzima PAPS redutase.

Em um dia após 100% de oxidação de Fe^{2+} , a concentração de H_2O_2 no meio de cultivo apesar de estar estável, é alta e, portanto, as células de *A. ferrooxidans* LR estão suscetíveis ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode resultar na formação de ligações dissulfeto indesejadas (Derman *et al.*, 1993). Assim sendo, a maior expressão dos genes *trx*, *trxB* e *gor* neste período de tempo pode indicar uma maior necessidade das proteínas codificadas por esses genes para a manutenção das proteínas da célula em seu estado funcional.

Entre os genes com expressão induzida em um dia após 100% de oxidação Fe^{2+} , *trx* foi um dos que apresentou expressão elevada. Foi observado que proteínas danificadas pelo estresse oxidativo em *E. coli* sofriam reparo pela enzima metionina sulfóxido redutase (Rahman *et al.*, 1992). Esta enzima é capaz de reconhecer a enzima metionina sulfóxido e reduzi-la, gerando metionina, sendo que essa reação de reparo requer a proteína tiorredoxina como substrato. Assim sendo, existe a possibilidade da maior quantidade de transcritos do gene *trx* ser necessária para gerar mais substratos para o reparo de proteínas.

Em relação ao gene *gor*, é provável que sua indução tenha ocorrido em *A. ferrooxidans* LR em um dia após 100% de oxidação Fe^{2+} para que, juntamente com os integrantes do sistema tiorredoxina, pudessem restaurar as condições redutoras e manter a homeostase celular. Segundo Aslund & Beckwith (1999), níveis maiores de expressão das proteínas glutathione redutase e glutathione redutase podem ser necessários para regenerar as condições redutoras da célula.

b) Análise da expressão gênica em dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+}

Em dois dias após 100% de oxidação do Fe^{2+} , os genes *trxB* e *gor* tiveram a expressão relativa induzida, enquanto os genes *trx* e *grxC* foram reprimidos (figura 5), segundo a análise estatística usando o teste t de Student ao nível de significância de 5%.

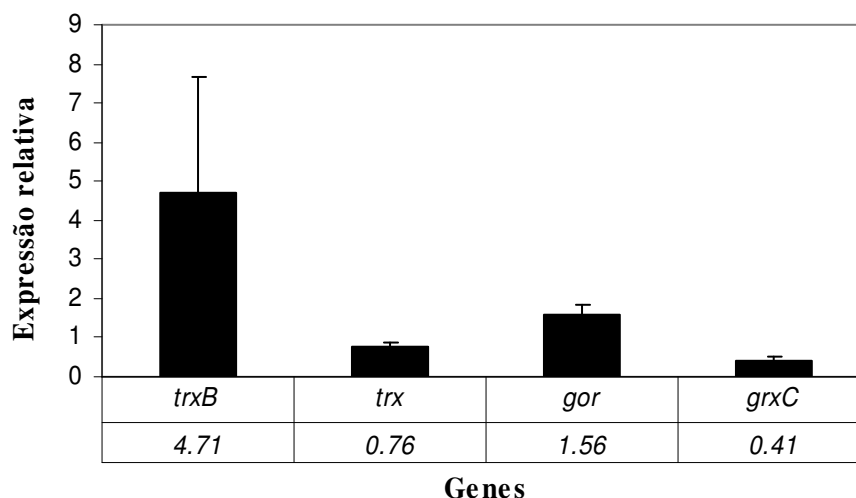


FIGURA 5 – Expressão dos genes da superfamília tiorredoxina de *A. ferrooxidans* LR em dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+} .

Kern *et al.* (2003) mostraram que em *E. coli* a tiorredoxina redutase e a tiorredoxina interagem com proteínas desenoveladas e desnaturadas, de uma forma muito similar as chaperonas moleculares. Em dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+} *A. ferrooxidans* LR está em uma situação desfavorável, na qual a viabilidade celular pode estar sendo comprometida pelo estresse oxidativo. Assim sendo, o aumento da expressão dos genes *trxB* e *gor* pode ser uma indicação de que as proteínas tiorredoxina redutase e a glutathione redutase atuam como chaperonas. A maior expressão de gene *trxB* (figura 5) sugere que em *A. ferrooxidans* LR, a tiorredoxina redutase desempenha melhor esta função.

Dukan & Nystrom (1998) mostraram que a concentração de proteínas oxidadas em *E. coli* está diretamente relacionada com a idade da fase estacionária da cultura da bactéria. Na fase estacionária, as concentrações de substâncias reativas do oxigênio são maiores e isto desfavorece a manutenção do balanço redox do meio intracelular. E mais, a escassez de nutrientes torna-se crítica, levando a privação de muitas substâncias essenciais para o metabolismo basal da bactéria. Em *A. ferrooxidans* LR, tanto em um como em dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+} , a maioria dos genes da superfamília tiorredoxina foram mais expressos do que no controle (100% de oxidação de Fe^{2+}). Isto sugere um aumento nos níveis de estresse e a necessidade de maiores concentrações das proteínas codificadas

por estes genes para lidar com a desnaturação oxidativa das proteínas, reparo de espécies reativas de oxigênio e envelhecimento celular. A menor expressão dos genes em dois dias sugere um maior estresse neste período de tempo do que em um dia após 100% de oxidação de Fe^{2+} .

Expressão dos genes dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina na presença de calcopirita (CuFeS_2)

Na presença de calcopirita a expressão do gene *gor* foi induzida e a expressão dos demais genes permaneceu inalterada (figura 6), conforme análise estatística usando o teste t de Student ao nível de significância de 5%. Isso pode ter ocorrido devido à calcopirita ser um mineral refratário à oxidação e, provavelmente, o tempo de exposição ao sulfeto (24 horas) foi insuficiente para que o metabolismo da bactéria se adaptasse a essa nova condição.

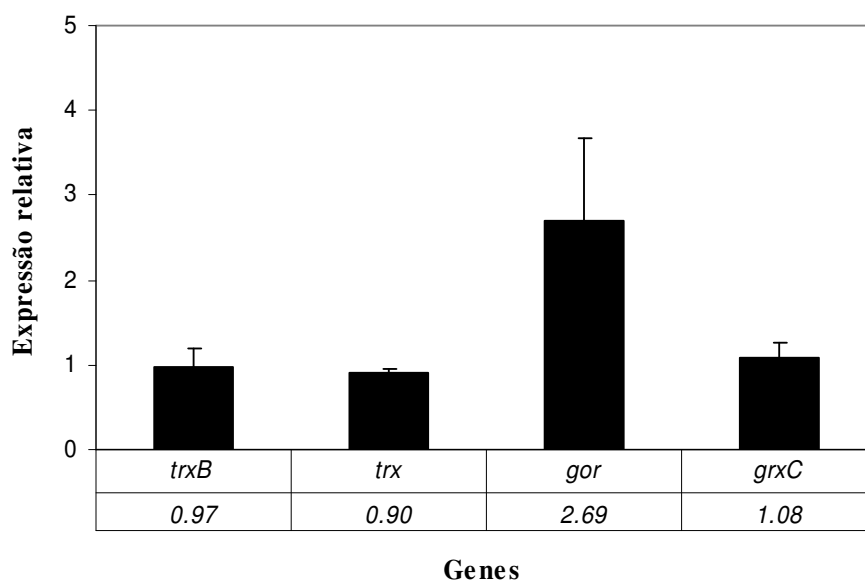


FIGURA 6 – Expressão dos genes da superfamília tiorredoxina em *A. ferrooxidans* LR na presença de calcopirita.

O aumento da expressão do gene *gor* pode ser explicado pela mudança das condições no meio de cultivo da bactéria, ou seja, de Fe^{2+} para calcopirita, o que pode ter ocasionado uma alteração do estado redox do meio de cultivo, pois o cobre presente na calcopirita pode causar o estresse oxidativo (Teitzel *et al.*, 2006). Assim, o gene *gor* pode ter sido induzido para restabelecer a homeostase celular.

A indução da expressão do gene *gor* sugere que na presença de calcopirita, a célula necessita de uma maior quantidade de glutathione redutase para que os níveis de glutathione permaneçam elevados. Foi verificado por Rohwerder & Sand (2003) que a glutathione desempenha um papel catalítico na ativação do enxofre elementar em *A. ferrooxidans*. Assim sendo, quando ocorre a dissolução da calcopirita, o enxofre é disponibilizado e a oxidação do enxofre por *A. ferrooxidans* depende de glutathione.

Heat shock

A resposta ao choque térmico está associada a proteínas que irão garantir a proteção e manutenção da homeostase da célula em relação aos danos provocados pela temperatura. Dentre as proteínas induzidas pelo *heat shock* estão incluídas as chaperonas moleculares, capazes de restaurar o enovelamento das proteínas (Buchner, 1996) e as proteases dependentes de ATP, responsáveis por degradar as proteínas desenoveladas (Rao *et al.*, 1998). Algumas chaperonas caracterizadas são reguladas por reações redox, por meio da oxidação reversível de grupos tióis (Cumming *et al.*, 2004; Jakob *et al.*, 1999). As glutarredoxinas e as tiorredoxinas foram capazes de catalisar a redução de pontes dissulfeto de proteínas que possuem atividade chaperona em *E.coli* (Hoffmann *et al.*, 2004).

Os genes da superfamília tiorredoxina de *A. ferrooxidans* tiveram a expressão analisada por PCR em tempo real após os seguintes tempos de *heat shock*: 0, 15, 30 e 60 minutos (figura 7, tabela 3).

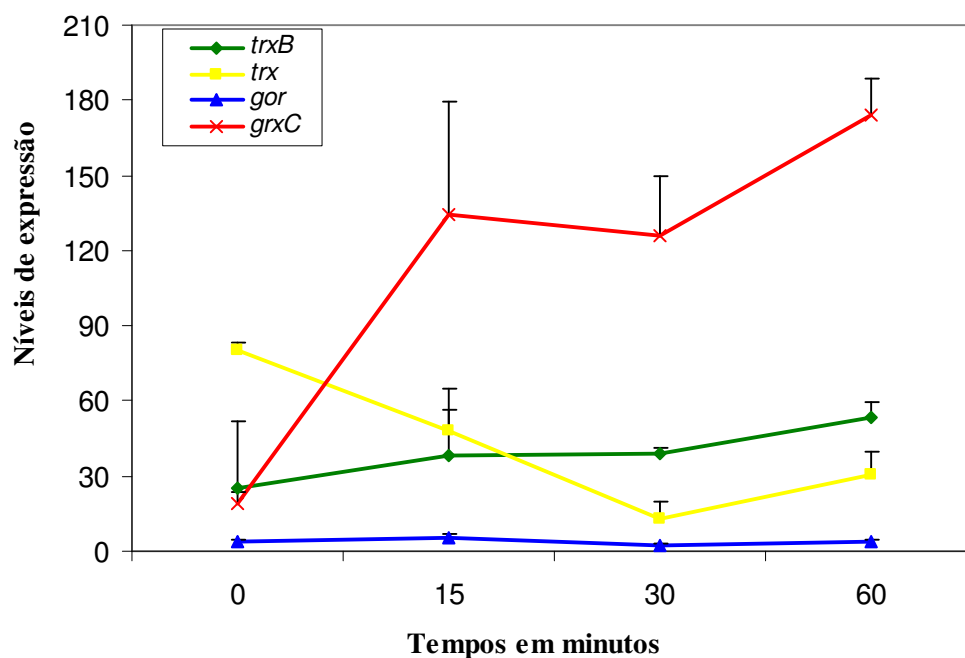


FIGURA 7 – Expressão dos genes da superfamília tioredoxina em *A. ferrooxidans* LR submetida a diferentes tempos de *heat shock*.

TABELA 3 – Média de tratamento em cada um dos tempos de *heat shock* seguida por uma mesma letra não difere estatisticamente entre si. * ANOVA (F): diferenças significativas a 5%.

Gene	0	T.	15	T.	30	T.	60	T.
		Tukey		Tukey		Tukey		Tukey
<i>trxB</i>	25,58	B	38,37	B	38,78	B	53,62	B
<i>trx</i>	80,42	A	48,18	B	12,92	BC	30,29	B
<i>gor</i>	3,68	B	5,24	B	2,48	C	3,75	C
<i>grxC</i>	19,30	B	134,14	A	126,08	A	174,26	A
ANOVA (F) *	18,36		14,54*		59,60*		194,15*	

No tempo zero, antes do *heat shock*, o gene *trx* foi o que apresentou o maior nível de expressão. Isso já havia sido observado no experimento das diferentes taxas de oxidação de Fe^{2+} . Isto ocorre porque as células utilizadas nos experimentos de *heat shock* foram coletadas nesta taxa de oxidação de Fe^{2+} e durante a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} , as proteínas codificadas pelos genes do sistema tiorredoxina parecem ser mais necessárias que as do sistema glutaredoxina.

Durante os diferentes tempos de *heat shock*, foi observada uma mudança drástica na expressão do gene *grxC*, se comparada a expressão dos demais genes analisados. Berndt *et al.* (2008) mencionaram que sob certas condições, as redoxinas promovem a formação de ligações dissulfeto e agem em conjunto com a proteína dissulfeto isomerase e/ou chaperonas. Assim sendo, o aumento da expressão do gene *grxC* pode indicar que durante o *heat shock*, *A. ferrooxidans* LR necessita de uma maior concentração da proteína glutaredoxina para facilitar a ação das chaperonas.

Outra explicação para o aumento da expressão do gene *grxC*, seria que a proteína codificada por este gene pode estar envolvida em reações de deglutationilação com as chaperonas, para restaurar o estado redox do grupo sulfidril dos tióis livres (Dalle-Done *et al.*, 2007). Assim, as proteínas típicas da resposta ao *heat shock* estariam livres para exercerem as suas funções intrínsecas.

O(s) mecanismo (s) que regula a expressão do gene *grxC* ainda é desconhecido, e pouco se sabe sobre o motivo pelo qual em determinadas condições e/ou tipos de estresse existe a preferência de uma via de óxirredução.

REFERÊNCIAS

- Aslund, F.; Beckwith, J. (1999) The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. *Journal of Bacteriology* 181(5):1375-1379.
- Berndt, C.; Lillig, C. H.; Holmgren, A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783(4): 641-650.

- Buchner, J. (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* 10:10-19.
- Cox, J. C.; Nicholls, D. G.; Ingledew, W. J. (1979) Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *The Biochemical Journal* 178(1): 195-200.
- Christman, M. F.; Morgan, R. W.; Jacobson, F. S.; Ames, B. N. (1985) Positive Control of a Regulon for Defenses against Oxidative Stress and Some Heat-Shock Proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41: 753-762.
- Cumming, R. C.; Andon, N. L.; Haynes, P. A.; Park, M, Fischer, W. H.; Schubert, D. (2004) Protein Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm during Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(21): 21749-21758.
- Daoud, J.; Karamanev, D. (2006) Formation of jarosite during Fe^{2+} oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering* 19(9):960-967.
- Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Colombo, R.; Milzani, A. (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology & Medicine* 43(6): 883-898.
- de Knecht, F. H. P (2004) Análise da privação de fosfato em *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Campinas, SP. Dissertação de mestrado. Unicamp. 102p.
- Derman, A. I.; Prinz, W. A.; Belin, D.; Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262(5140):1744-1747.
- Dillet, V.; Dyson, H. J.; Bashford, D. (1998) Calculations of electrostatic interactions and pK_a 's in the active site of *E. coli* thioredoxin, *Biochemistry* 37: 10298-10306.

- Dopson, M.; Baker-Austin, C.; Kopponeedi, R. P.; Bond, P. (2003) Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* 149: 1959-1970.
- Dukan, S.; Nyström, T. (1998) Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes & Development* 12: 3431-3441.
- Fahey, R. C.; Brown, W. C.; Adams, W. B.; Worsham, M. B. (1978) Occurrence of glutathione in bacteria. *Journal of Bacteriology* 133: 1126-1129.
- Gan, Z. R.; Wellls, W.W. (1988) Immunological characterization of thioltransferase from pig liver. *The Journal of Biological Chemistry* 263(18): 9050-9054.
- Garcia Jr. O.; Bigham, J. M.; Tuovinen, O. H. (1995) Sphalerite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 578-584.
- Garcia Jr., O. (1991) Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Resvista de Microbiologia* 20: 1-6.
- Hoffmann¹, J. H.; Linke¹, K.; Graf, P. C. F.; Lilie, H.; Jakob¹, U. (2004) Identification of a redox-regulated chaperone network. *The EMBO Journal* 23(1): 160-168.
- Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry* 264:13963-13966.
- Huang, H. H., Arscott, L. D., Ballou, D. P., Williams, C. H., Jr. (2008) Acid-base catalysis in the mechanism of thioredoxin reductase from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* 47: 1721-1731.

- Jakob, U.; Muse, W.; Eser, M.; Bardwell, J. C. A. (1999) Chaperone Activity with a Redox Switch. *Cell*. 96(3): 341-352.
- Jeffery, G. H.; Basset, J.; Mendham, J. E.; Denney, R. C. (1992) Vogel – Análise química quantitativa. 5ª edição. Guanabara Kogan, Rio de Janeiro, 712p.
- Jensen, A. B.; Webb, C. (1995) Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a Review. *Process Biochemistry* 30(3): 225-236.
- Kallis, G. B.; Holmgren, A. (1980) Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 255(21):10261-10265.
- Kelly, D. P.; Wood, A. P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(2): 511–516.
- Kern, R.; Malki, A.; Holmgren, A.; Richarme, G. (2003) Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *The Biochemical Journal* 371(3): 965-972.
- Kiley, P. J; Storz, G (2004) Exploiting Thiol Modifications. *PLoS biology* 2(11): e400 doi:10.1371/journal.pbio.0020400.
- Leduc, L. G.; Ferroni, G. D. (1994) The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* 14: 103-120.
- Lillig, C. H.; Prior, A.; Schwenn, J. D.; Aslund, F.; Ritz, D.; Vlamis-Gardikas, A.; Holmgren, A. (1999) New thioredoxins and glutaredoxins as electron donors of 3'-

- phosphoadenylylsulfate reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 274(12):7695-7698.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Loewen, P. C. (1979) Levels of glutathione in *E. coli*. *Canadian Journal of Biochemistry*. 57: 107-111.
- Martin, J. L. (1995) Thioredoxin: A fold for all reasons. *Structure* 3: 245-250.
- Prieto-Álamo, M. J.; Jurado, J.; Gallardo-Madueno, R.; Monje-Casas, F.; Holmgren, A.; Pueyo, C. (2000) Transcriptional Regulation of Glutaredoxin and Thioredoxin Pathways and Related Enzymes in Response to Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* 275(18): 13398-13405.
- Prinz, W. A.; Åslund, F.; Holmgren, A.; Beckwith, J. (1997) The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry* 272(25):15661-15667.
- Rahman, M. A.; Nelson, H.; Weissbach, H.; Brot, N. (1992) Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene. *The Journal of Biological Chemistry* 267(22):15549-15551.
- Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3):597-635.
- Rawlings, D. E. (2005) Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* 4:13. doi: 10.1186/1475-2859-4-13.

- Rawlings, D. E.; Kusano, T. (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiological Reviews* 58: 39-55.
- Ritz, D.; Beckwith, J. (2001) Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:21-48
- Rohwerder, T.; Sand, W. (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* 149: 1699-1710
- Scandalios, J. G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38: 995-1014.
- Scandalios, J. G. (2002) Oxidative stress responses – what have a genome-scale studies taught us? *Genome Biology* 3(7): 10191-10196.
- Storz, G.; Imlay, J. A. (1999) Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology* 2: 188-194.
- Suzuki, Y.J.; Forman, H.J.; Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine* 22(1-2):269-85.
- Teitzel, G. M.; Geddie, A.; De Long, S. K.; Kirisits, M. J.; Whiteley, M.; Parsek, M. R. (2006) Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188(20): 7242-7256.
- Tuovinen, O. H.; Kelly, D. P. (1972) Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie* 12(4): 311-346.

- Tuovinen, O. H.; Niemela, S. I.; Gyllenberg, H. G. (1971) Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie van Leeuwenhoek* 37(4): 489-496.
- Veine, D. M, Arscott, L. D, Williams Jr, C. H . (1998) Redox potentials for yeast, *Escherichia coli* and human glutathione reductase relative to the NAD⁺/NADH redox couple: enzyme forms active in catalysis. *Biochemistry* 37(44):15575-15582.
- Winderickx, J.; Castro, J. M. (1994) Practical course in molecular biology of microorganisms. Universidade Federal de Ouro Preto, (MG) pp. 59.
- 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. *Microbiology*. 150 (7): 2113-2123.
- Zhang, C.; Xia, J.; Nie, Z.; Qiu, G. (2007) Cloning and expression of the glutathione reductase gene from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Sciencepaper Online*. Disponível em: www.paper.edu.cn/en/paper.php?serial_number=200703-604.

CAPÍTULO 2

**Caracterização bioquímica de enzimas integrantes do sistema
antioxidante em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR mantida em contato
com calcopirita**

INTRODUÇÃO

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma bactéria Gram negativa que obtém energia por meio da oxidação do ferro e compostos reduzidos de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos. A energia obtida pela oxidação dos substratos inorgânicos é utilizada na fixação do CO₂ atmosférico que é a principal fonte de carbono da bactéria (Leduc & Ferroni, 1994). Esta bactéria pode ser isolada de vasta quantidade de depósitos minerais contendo enxofre e é usada industrialmente na biolixiviação de metais, um processo em que sulfetos metálicos insolúveis são convertidos sulfatos solúveis em água (Rawlings, 2002). A biolixiviação tem sido utilizada na recuperação de cobre, cobalto, níquel, zinco e urânio (Rohweder *et al.*, 2003). Com respeito ao cobre, uma grande quantidade tem sido recuperada a partir de sulfetos metálicos como, por exemplo, a calcopirita (CuFeS₂), que é o mineral de cobre mais amplamente distribuído e uma das principais fontes de obtenção do mesmo. No entanto, a calcopirita é recalcitrante ao ataque químico e biológico (Third *et al.*, 2000).

Um consórcio de bactérias Gram negativas e capazes de oxidar ferro e enxofre é utilizado na biolixiviação, sendo que *A. ferrooxidans* é uma das principais espécies constituintes deste consórcio. Nos ambientes de biolixiviação, *A. ferrooxidans* está sujeita a mudanças no pH e temperatura ideal de crescimento, privação de nutrientes e presença de metais pesados (Bosecker, 1997). Além disso, o metabolismo aeróbico da bactéria pode gerar espécies reativas de oxigênio incluindo, íons superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH[•]), sendo que em condições normais, estas espécies reativas de oxigênio são metabolizadas. Contudo, quando produzidas em excesso devido à presença de algum tipo de estresse, estas espécies reativas de oxigênio podem causar o estresse oxidativo (Gratão *et al.*, 2005). Os principais alvos das espécies reativas de oxigênio são o DNA, RNA, proteínas e lipídios (Cabiscol *et al.*, 2000) e, dependendo da intensidade do estresse, pode ocorrer a morte celular (Imlay, 2003).

Mecanismos constitutivos e adaptativos estão envolvidos na defesa da célula contra o estresse oxidativo, evitando e removendo os oxidantes e recuperando as biomoléculas danificadas (Seib *et al.*, 2006). Entre os antioxidantes, a glutatona (GSH) é capaz de manter o ambiente redutor da célula. Entre as enzimas envolvidas na defesa do estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD) converte O₂⁻ em peróxido de hidrogênio e

oxigênio (Cabisco *et al.*, 2000). As proteínas tiorredoxina (Trx) e glutaredoxina (Grx), ambas membros da superfamília tiorredoxina, estão envolvidas na redução da oxidação das pontes dissulfeto das proteínas (Cabisco *et al.*, 2000; Seib *et al.*, 2006).

Neste capítulo, algumas enzimas antioxidantes chaves, como glutathione redutase (GR), tiorredoxina redutase (TrxR) e superóxido dismutase (SOD), tiveram a atividade determinada em células de *A. ferrooxidans* LR mantidas por um e dez dias na presença do mineral sulfetado de cobre calcopirita.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análise in silico

Para se determinar a provável estrutura secundária das proteínas TrxR, GR e SOD de *A. ferrooxidans* foi utilizado inicialmente o programa Blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), por meio do qual foram selecionadas as sequências de aminoácidos com maior homologia (maior *E-value*) e/ou com estrutura tridimensional já caracterizada. Com o auxílio do programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw) foi realizado um alinhamento entre as sequências das proteínas presentes em *A. ferrooxidans* com aquelas resultantes do Blast. O programa GeneDoc (www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html) foi utilizado para analisar o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidos. O programa PredictProtein (www.predictprotein.org) foi empregado para auxiliar na determinação da estrutura secundária dessas proteínas e o ProtParam (www.expasy.ch/tools/protparam.html) para determinar o ponto isoelétrico e o peso molecular teórico.

Linhagem de bactéria e condições de crescimento

A linhagem de *A. ferrooxidans* LR (Garcia, 1991) foi usada nos experimentos. A bactéria foi cultivada a 30°C, 250 rpm, em meio T&K líquido (Tuovinen & Kelly, 1972) modificado, contendo (em g/L): K₂HPO₄ (0,5), MgSO₄.7H₂O (0,5), (NH₄)₂SO₄ (0,5) e

FeSO₄.7H₂O (167,0), pH 1,8 ajustado com H₂SO₄. O crescimento ocorreu até 80% de oxidação do Fe²⁺, medido por titulação com dicromato de potássio (Garcia Jr *et al.*, 1995). As células foram coletadas, lavadas e mantidas por um e dez dias a 30°C, 250 rpm, em meio T&K líquido (sem FeSO₄.7H₂O) contendo 2,5% de calcopirita. A calcopirita foi obtida da Companhia Vale. Ela foi macerada até serem obtidos grãos menores que 0,2 mm. As células foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para isolamento de proteína e análise bioquímica.

Isolamento e quantificação de proteína

O isolamento das proteínas foi feito a 4°C, como descrito por Gomes-Junior *et al.* (2007), com modificações. As células de *A. ferrooxidans* LR foram ressuspensas em 100 µL de tampão de extração composto por potássio de fosfato 100 mM, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM, DTT 3 mM e polivinil polipirrolidona 4% (p/v). As amostras foram homogeneizadas com nitrogênio líquido em um almofariz e a seguir, elas foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C. A quantidade de proteína foi determinada em um espectrofotômetro a 595 nm, como descrito por Bradford (1976), usando como padrão a proteína albumina do soro bovino (BSA).

Gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

A integridade das proteínas isoladas foi verificada por SDS-PAGE. Para isto, as proteínas (aproximadamente 20 µg) foram separadas em gel de acrilamida (12%) desnaturante (Laemmli, 1970). A corrida foi feita com corrente constante de 15 mA por gel. Após a eletroforese, os géis foram corados com nitrato de prata (Morrisey, 1981).

Determinação da atividade das enzimas glutathiona redutase e tioredoxina redutase em espectrofotômetro

A atividade da enzima GR foi determinada em espectrofotômetro, a 30°C, em 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 500 µL de DTNB 1 mM, 100 µL de GSSG 1 mM e 100 µL de NADPH 0,1 mM (Gratão et al., 2008). A reação foi iniciada com a adição de 30 µL de extrato proteico de *A. ferrooxidans* LR e, as mudanças na absorção devido à taxa de redução da glutathiona oxidada foram monitoradas a 412 nm por 1 minuto.

A atividade da enzima TrxR foi determinada a 30°C em 900 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 25 µL de DTNB 0,5 mM, 50 µL de EDTA 2 mM e 25 µL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada com a adição de 15 µL de extrato proteico de *A. ferrooxidans* LR e as mudanças na absorbância foram monitoradas a 412 nm por 1 minuto (Pigiet & Conley, 1977).

Determinação da atividade das enzimas glutathiona redutase e superóxido dismutase em gel

A atividade das enzimas GR e SOD foi determinada em condições não redutoras em géis de acrilamida 12% (Laemmli, 1970). Aproximadamente 20 µg de proteína foram submetidos à eletroforese por 3 horas, a 4°C, com corrente constante de 20 mA por gel. Após a eletroforese, os géis foram lavados por duas vezes com água destilada e a atividade de GR foi determinada por incubação do gel por 30 minutos, a temperatura ambiente, em 50 mL de Tris-HCl 0,25 M, pH 7,5, contendo 10 mg de MTT, 10 mg de DCPIP, 3,4 mM de GSSG e 0,5 mM de NADPH (Rao et al., 1996). O gel foi lavado com água destilada e incubado por 15 minutos em uma solução de ácido acético 7%.

A atividade de SOD foi determinada como descrito por Beauchamp & Fridovich (1971), com modificações. Após a eletroforese, o gel foi lavado com água destilada e incubado no escuro, por 30 minutos, a temperatura ambiente, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, NTT 0,1 mM e TEMED 0,3%. Após a incubação, o gel foi exposto à luz por 10-20 minutos, a temperatura

ambiente e a seguir, foi incubado em uma solução de ácido acético 7%. A diferenciação das isoformas de SOD foi baseada pela sensibilidade a inibição por KCN 2 mM e H₂O₂ 5 mM (Fridovich, 1986).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A significância dos resultados obtidos foi verificada por meio da análise da variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise *in silico*

Os alinhamentos múltiplos e a predição da estrutura secundária para as proteínas glutathiona redutase (GR) tioredoxina redutase (TrxR) e superóxido dismutase (SOD) são mostrados a seguir.

Glutathiona redutase

A proteína glutathiona redutase possui 449 aminoácidos, ponto isoelétrico (pI) teórico de 5,73 e peso molecular teórico em torno de 48,15 kDa. O índice de instabilidade calculado foi de 28,02. Isso classifica essa proteína como estável. O alinhamento da glutathiona redutase (locus AFE_2666) de *A. ferrooxidans* (ATCC23270) com outras glutathionas redutases das bactérias *Alkalilimnicola ehrlichei* (YP_743364.1), *Photorhabdus luminescens* (NP_927730.1), *Shigella dysenteriae* (YP_405027.1) e *Escherichia coli* (NP_417957.1) mostrou uma identidade de 54 a 56% e uma similaridade de 68 a 70%. Alguns motivos funcionais foram encontrados, como sítio de ligação ao FAD, sítio de ligação à glutathiona e sítio de ligação e ancoragem do NADPH (figura1).

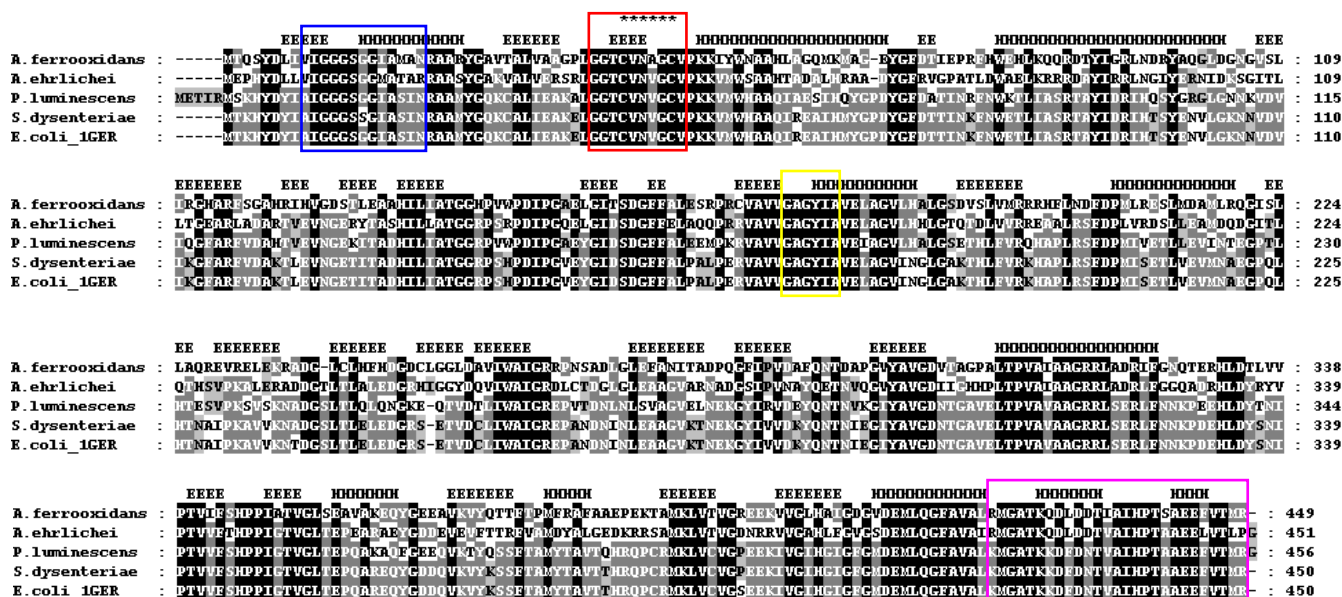


FIGURA 1 – Alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos da proteína GR de *A. ferrooxidans* com glutationas redutases de outras espécies bacterianas. Resíduos na cor preta indicam 100% de identidade, resíduos sombreados em cinza escuro representam identidade entre 60 a 99% e resíduos sombreados em cinza claro apresentam identidade compreendida entre 20 a 59% das sequências alinhadas. As letras E e H representam a conformação folhas beta e alfa-hélice, respectivamente. Região com * indica sítio ativo ditiol redox. O *box* azul representa sítio de ligação ao FAD. O *box* vermelho indica o sítio de ligação da glutathione. O *box* amarelo indica o sítio de ligação ao NADPH e o rosa, de ancoragem.

Tiorredoxina redutase

A proteína tiorredoxina redutase possui 323 aminoácidos, ponto isoelétrico (pI) teórico de 5,61 e peso molecular teórico em torno de 34,64 kDa. O índice de instabilidade calculado foi de 40,07. Isso classifica essa proteína como instável. O alinhamento da proteína tiorredoxina redutase (locus AFE_2657) de *A. ferrooxidans* (ATCC23270) com as demais tiorredoxinas redutases das seguintes espécies bacterianas *Azoarcus sp* (YP_932867.1), *Dechloromonas aromatica* (YP_284515.1), *Geobacter uraniumreducens* (YP_001232749.1) e *Alkalilimnicola ehrlichei* (YP_741093.1) mostrou uma identidade de

68 a 72% e uma similaridade de 82 a 86%. Foram encontrados alguns motivos funcionais, como sítios de ligação ao FADI, FADII, tiorredoxina e NADPH (figura 2).

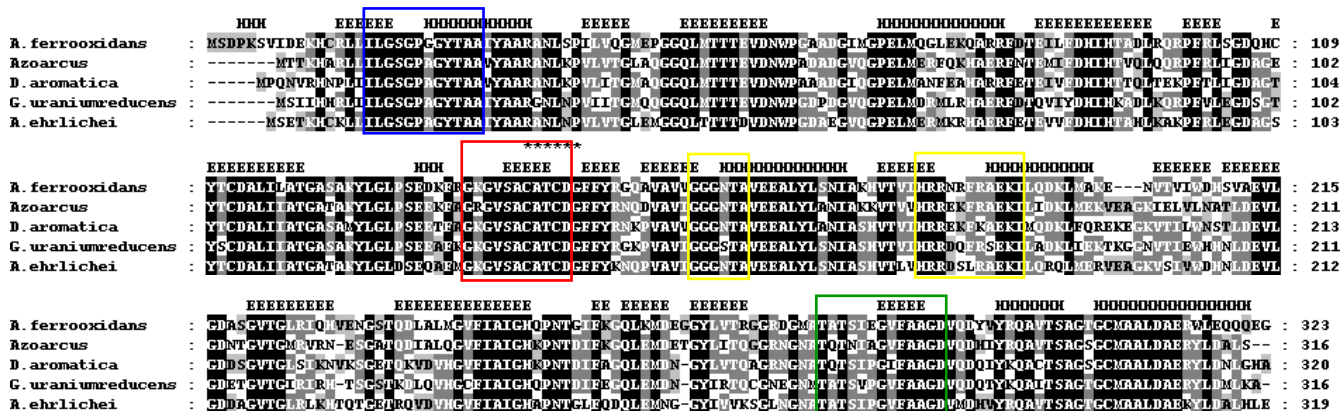


FIGURA 2 – Alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos da proteína TrxR de *A. ferrooxidans* com tiorredoxinas redutases de outras espécies bacterianas. Resíduos na cor preta indicam 100% de identidade. Resíduos sombreados em cinza escuro representam identidade entre 60 a 99% e resíduos sombreados em cinza claro apresentam identidade compreendida entre 20 a 59% das sequências alinhadas. As letras E e H representam a conformação folhas beta e alfa-hélice, respectivamente. Região com * indica sítio ativo ditiol redox. Os *boxes* azul e verde representam sítios de ligação ao FADI e II, respectivamente. O *box* vermelho indica o sítio de ligação da tiorredoxina. Os *boxes* amarelos indicam sítios de ligação ao NADPH.

As proteínas com sítio ativo de cisteínas são responsáveis pela transferência de elétrons, pois estão envolvidas no controle de reações de troca tiol-dissulfeto, ou de substituições nucleofílicas, em que o tiol (RSH) ou tiolato (RS⁻) atuam como agentes nucleófilos para as pontes dissulfeto. Estas reações ocorrem com a finalidade de formar ou remover ligações dissulfeto em proteínas e/ou peptídeos, para regular a atividade de certas enzimas e para manter o balanço redox no interior da célula (Netto *et al.*, 2007). Os resultados obtidos do alinhamento múltiplo das proteínas TrxR e GR de *A. ferrooxidans* com outras TrxRs e GRs bacterianas mostraram que os sítios ativos são bastante

conservados. Além disso, a maioria dos motivos e domínios encontrados (FAD, NADPH) foi homólogo com as demais proteínas das espécies bacterianas analisadas. Assim sendo, essas características encontradas para as proteínas GR e TrxR sugerem que as propriedades de óxidorredução possam estar envolvidas na manutenção das condições redutoras da célula, assim como a proteção celular.

Superóxido dismutase

A proteína superóxido dismutase possui 205 aminoácidos, ponto isoelétrico (pI) teórico de 6,05 e peso molecular teórico em torno de 22,95 kDa. O índice de instabilidade calculado foi de 35,40. Isso classifica essa proteína como estável. O alinhamento da proteína SOD (locus AFE_1188) de *A. ferrooxidans* (ATCC23270) com outras SOD das bactérias *Dehalococcoides* (ZP_02203166.1), *Dehalococcoides ethenogenes* (YP_181681.1), *Geobacter sulfurreducens* (NP_952211.1) e *Geobacter uraniireducens* (YP_001230225.1) (figura 3) mostrou uma identidade de 36 a 44% e uma similaridade de 58 a 64%.

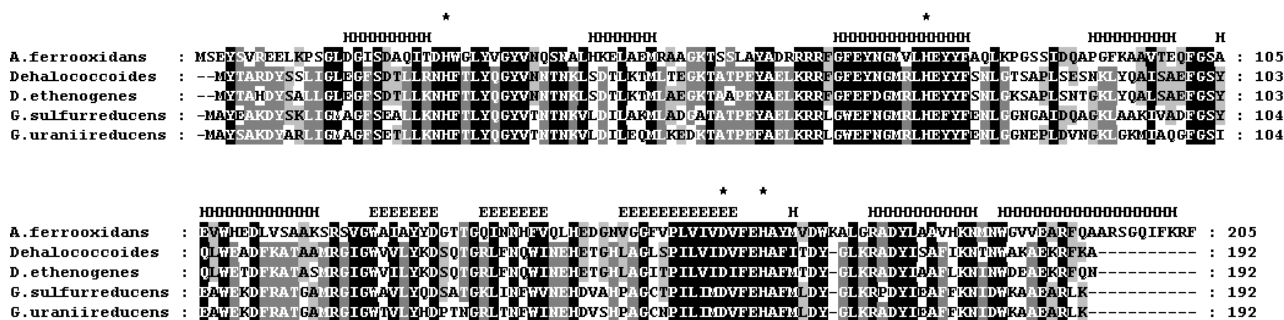


FIGURA 3 – Alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos da proteína SOD de *A. ferrooxidans* com superóxido dismutases de outras espécies bacterianas. Resíduos na cor preta indicam 100% de identidade, resíduos sombreados em cinza escuro representam identidade entre 60 a 99% e resíduos sombreados em cinza claro representam identidade compreendida entre 20 a 59%. As letras E e H representam a conformação folhas beta e alfa-hélice, respectivamente. Região com * indica os aminoácidos que estão ligados ao cofator metálico ferro.

A localização de alguns aminoácidos, como por exemplo, H26, H73, D157 e H161, da proteína SOD de *A. ferrooxidans* destaca a importância da associação destes aminoácidos ao cofator metálico ferro que é requerido para a atividade da enzima. A predição da estrutura secundária para a FeSOD de *A. ferrooxidans* mostrou que existem sete α -hélices e três folhas- β , e corrobora com a predição realizada em *E. coli* (Lah *et al.*, 1995).

Determinação da quantidade de proteína total

A proteína total foi isolada de *A. ferrooxidans* LR após crescimento na presença de Fe^{2+} (80% de oxidação, controle) e após contato com calcopirita por 1 e 10 dias. Como mostra a figura 4, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo proteico de células crescidas na presença de ferro e células mantidas por 1 dia na presença de calcopirita. Contudo, foi observada uma diminuição na quantidade de proteínas em células mantidas por 10 dias na presença de calcopirita, sugerindo a ocorrência de proteólise devido à contínua e longa exposição ao sulfeto metálico. Apesar dos testes estatísticos não terem apontado diferenças em células mantidas por 1 dia na presença de calcopirita, o padrão dos resultados indica que em *A. ferrooxidans* LR, a proteólise pode ocorrer logo nos primeiros dias de contato com o sulfeto.

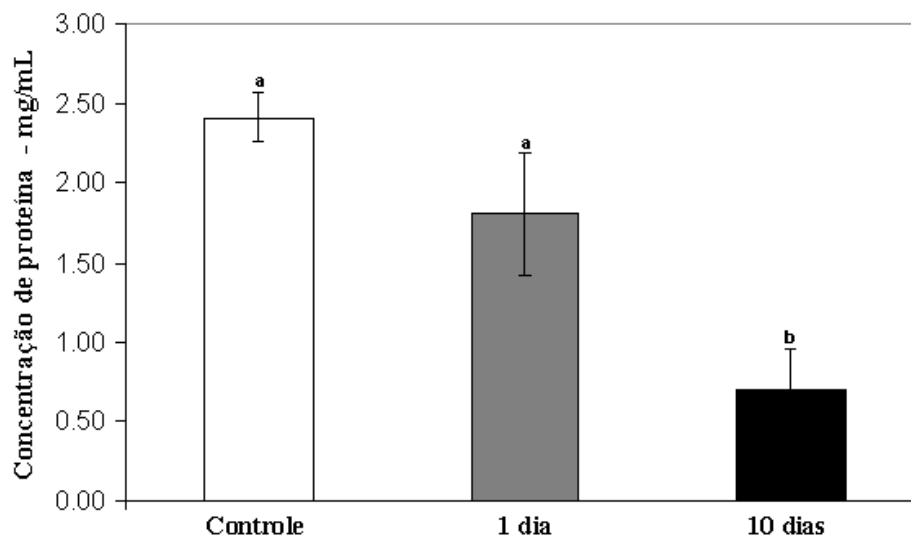


FIGURA 4 – Concentração de proteínas totais em células de *A. ferrooxidans* LR crescidas até 80% de oxidação de Fe^{2+} (controle) e a seguir, mantidas por 1 e 10 dias em contato com a calcopirita. As barras verticais representam os desvios padrões a partir de três réplicas. Os valores que não possuem a mesma letra acima da barra são diferentes, de acordo com o teste de Tukey.

Com o passar dos dias, a dissolução da calcopirita resultou no aumento da concentração de Cu^{2+} no meio de cultivo e em 10 dias de contato entre a bactéria e o sulfeto metálico, esta concentração atingiu aproximadamente 1,2 g/L (Bevilaqua *et al.*, 2002). Está comprovado que a homeostase do cobre deve ser bem regulada na célula, já que, apesar de ser um micronutriente essencial para procariotos e eucariotos, pode ser tóxico dependendo da concentração (Solioz & Stoyanov, 2003). Foi sugerido que o efeito tóxico do cobre pode ocorrer por meio de uma reação do tipo Fenton, resultando na produção de radicais hidroxila que poderiam danificar fosfolipídios, proteínas e DNA (Yoshida *et al.*, 1993). Assim sendo, a presença de cobre no meio pode ser uma das razões para proteólise observada em 10 dias de contato com a calcopirita. Além da presença de cobre, a pequena quantidade de Fe^{2+} no meio de cultivo (Bevilaqua *et al.*, 2002), em 10 dias de contato com a calcopirita, pode estar afetando o crescimento e a sobrevivência da bactéria já que a linhagem LR foi adaptada para crescer na presença desta fonte de energia.

Determinação da atividade da enzima glutathione redutase

A atividade da enzima GR foi determinada em espectrofotômetro e, como pode ser visualizado na figura 5, não foi observado diferença na atividade entre as células controle e células mantidas por 1 dia na presença de calcopirita. Contudo, foi observado um aumento significativo da atividade da enzima em células mantidas por 10 dias na presença do sulfeto metálico. A atividade da enzima também foi observada em gel não desnaturante corado para atividade de GR. Como pode ser visto na figura 6, quatro isoenzimas foram identificadas nas células controle e em células mantidas por 1 dia na presença de calcopirita. Em comparação com o controle, uma diminuição na atividade de GR foi observada nas isoenzimas I, II e III das células mantidas por 1 dia na presença de calcopirita. Nas células mantidas por 10 dias na presença do sulfeto metálico, esta diminuição na atividade da enzima foi ainda maior para as isoenzimas I e II e a atividade da isoenzima III foi completamente inibida. Contudo, neste período de tempo a atividade da isoenzima IV apresentou um grande aumento, representado 82% da atividade de GR.

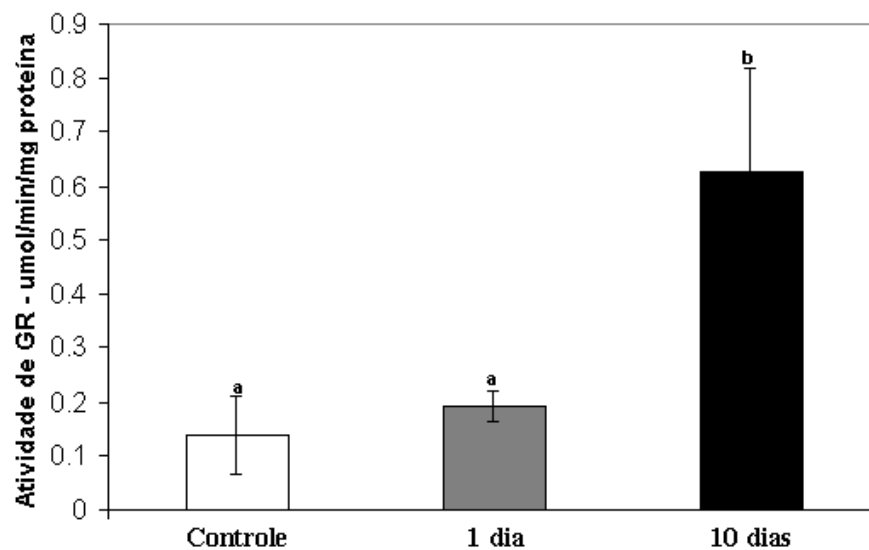


FIGURA 5 – Atividade em espectrofotômetro da proteína GR isolada a partir de células de *A. ferrooxidans* LR cultivadas até a taxa de 80% de oxidação de Fe^{2+} (controle) e a seguir, mantidas em contato com calcopirita por 1 e 10 dias. As barras verticais representam os desvios padrões a partir de três réplicas. Os valores que não possuem a mesma letra acima da barra são diferentes, de acordo com o teste de Tukey.

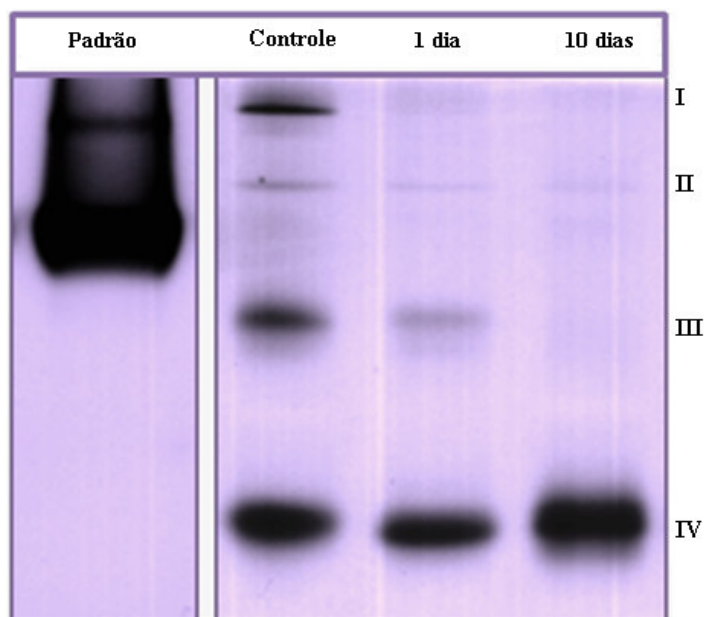


FIGURA 6 – Atividade em gel não desnaturante da proteína GR isolada a partir de células de *A. ferrooxidans* LR cultivadas até a taxa de 80% de oxidação de Fe^{2+} (controle) e a seguir, mantidas em contato com calcopirita por 1 e 10 dias. Os números de I a IV indicam as isoformas encontradas. O padrão utilizado foi GR.

Segundo Naessens & Vandamme (2003), as distintas isoformas de uma enzima podem apresentar parâmetros cinéticos, propriedades de regulação e estabilidade diferentes. Isto fornece uma maior flexibilidade para o organismo se adaptar a mudanças no meio ambiente. Assim, as quatro isoenzimas encontradas para GR podem ajudar a linhagem LR a suportar a presença de calcopirita no meio de cultivo e as diferenças nas atividades destas isoenzimas em 1 e 10 dias de contato com a calcopirita sugere que elas possuem diferentes estabilidades e propriedades e, conseqüentemente, respondem de forma distinta a presença do sulfeto metálico.

A maior atividade de GR em 10 dias de contato entre *A. ferrooxidans* LR e calcopirita, sugere um aumento da forma oxidada da glutathiona (GSSG) neste período de tempo e a necessidade de uma maior concentração de GR na célula para catalisar a redução de GSSG para a forma reduzida, ou seja, GSH. A GSH tem um papel chave na adaptação de bactérias a diferentes tipos de estresse, incluindo estresse oxidativo (Kuanyu *et al.*, 2004), osmótico (Laggan *et al.*, 1990), ácido (Ricciolo, 2000) e estresse a metais (Helbig *et*

al., 2008). Em plantas, o aumento de GSH em resposta ao estresse oxidativo tem a mesma função que em bactérias, contudo, GSH pode ser utilizada também na síntese de fitoquelatinas, as quais são capazes de se ligar a íons de metais pesados (Vitória *et al.*, 2001).

Tremaroli *et al.* (2008) mostraram que um mutante de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 apresentou uma resistência elevada a telurita. Este mutante apresentou também, níveis intracelulares alterados de GSH. Assim sendo, estes autores concluíram que a alta resistência a telurita estava correlacionada, entre outras coisas, com a resposta ao estresse oxidativo. *A. ferrooxidans* LR apresenta uma alta resistência ao cobre (Novo *et al.*, 2000) e o aumento da atividade de GR em 10 dias de contato com a calcopirita pode ser uma indicação de que a bactéria está na presença de estresse oxidativo e mais, a resposta a este estresse parece estar relacionado principalmente com a atividade da isoenzima IV, já que ela representa a atividade predominante de GR (figura 6).

Segundo Rohwerder & Sand (2003), a linhagem de *A. ferrooxidans* R1, as linhagens de *A. thiooxidans* DSM 504 e K6 e a linhagem de *Acidiphilium acidophilum* DSM 700 apresentaram atividade de GSH dependente da oxidação de enxofre. Assim sendo, pode-se especular que com a dissolução da calcopirita, *A. ferrooxidans* LR pode estar usando o enxofre liberado como fonte de energia já que em 10 dias de contato com calcopirita, a quantidade de Fe^{2+} no meio de cultivo é muito baixa e assim sendo, GSH poderia ser necessária para o processo.

Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase

Os mesmos extratos proteicos utilizados na determinação da atividade de GR foram utilizados na determinação da atividade SOD em gel e como mostra a figura 7, apenas uma isoenzima SOD foi encontrada em *A. ferrooxidans* LR nas condições testadas. De acordo com a análise densitométrica do gel, um pequeno aumento na atividade de SOD foi observado em *A. ferrooxidans* LR em 1 dia de contato com calcopirita. Contudo, em 10 dias de contato com o sulfeto metálico, o aumento da atividade desta enzima foi bem grande (figura 7). Géis idênticos foram incubados em H_2O_2 e KCN para classificar a

isoenzima SOD e como pode ser observado na figura 8, esta isoenzima é uma FeSOD, já que a enzima foi inibida na presença de H_2O_2 e mostrou resistência ao KCN.

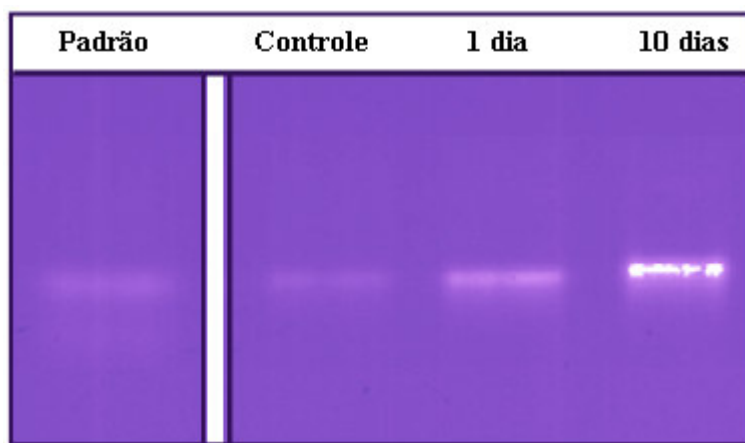


FIGURA 7 – Atividade em gel não desnaturante da proteína SOD isolada a partir de células de *A. ferrooxidans* LR cultivadas até a taxa de 80% de oxidação de Fe^{2+} (controle) e a seguir, mantidas em contato com calcopirita por de 1 e 10 dias. O padrão utilizado foi SOD.

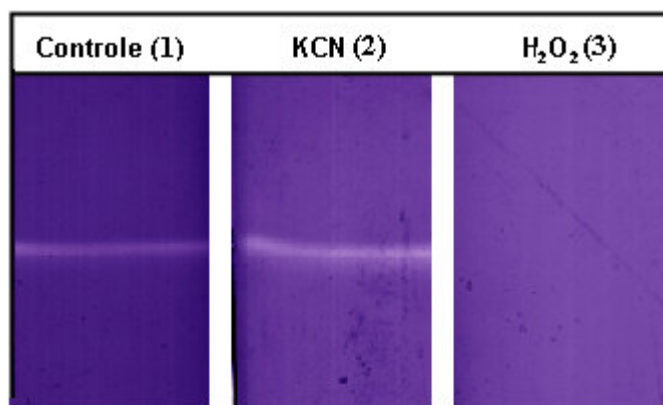


FIGURA 8 – Caracterização da isoforma SOD de *A. ferrooxidans* LR em gel não desnaturante. 1) Controle para a atividade de SOD; 2) Gel incubado com 2 mM de KCN; 3) Gel incubado com 5 mM de H_2O_2 .

No genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 disponibilizado pelo TIGR (<http://cmr.tigr.org>) foram encontrados um gene que codifica para uma Mn-SOD (locus AFE_1898, Valdés *et al.*, 2008) e um gene que codifica uma FeSOD (locus AFE_1188). Segundo Kim *et al.* (2000), em *Pseudomonas putida* a FeSOD é mais importante do que a MnSOD para o metabolismo aeróbico e para resposta ao estresse oxidativo e Qurollo *et al.* (2001) relataram que FeSOD pode ser essencial para o crescimento e sobrevivência de *Azotobacter vinelandii*. Em *A. ferrooxidans* LR só foi detectada a atividade da FeSOD, sugerindo que esta enzima é mais importante quando a bactéria se encontra na presença de ferro e calcopirita.

O aumento significativo da atividade de SOD em *A. ferrooxidans* LR mantida por 10 dias na presença de calcopirita sugere a formação de superóxido, que é detoxificado pela ação da SOD e, conseqüentemente, outras espécies reativas do oxigênio são formadas, em particular, peróxido de hidrogênio (Gratão *et al.*, 2005). O provável aumento na produção de superóxido, com base no aumento da atividade de SOD, é outra indicação de que a presença de calcopirita induziu e estabeleceu o estresse oxidativo em *A. ferrooxidans* LR. O aumento da atividade de SOD está de acordo com padrão de atividade observado para GR (figuras 5 e 6), já que o peróxido de hidrogênio produzido pela ação da SOD estimula a ação de outras enzimas antioxidantes, como GR, para reciclar o peróxido de hidrogênio produzido.

Além de estar envolvida na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, SOD pode estar envolvida na tolerância a metais pesados em estreptomicetos (Schmidt *et al.*, 2007). Ramirez *et al.* (2004) analisaram a expressão de proteínas, por eletroforese em gel de duas dimensões, quando *A. ferrooxidans* ATCC 19859 foi submetida a presença de sulfetos metálicos, tiosulfato, enxofre e ferro. Estes autores observaram que os níveis de expressão da SOD diminuíram nas células que cresceram na presença de enxofre e aumentaram nas células que cresceram na presença de ferro sugerindo, um nível maior de estresse nesta condição. Em *A. ferrooxidans* LR, o grande aumento na atividade de SOD nas células mantidas por 10 dias na presença de calcopirita sugere que na presença do sulfeto, o estresse é maior do que na presença de ferro.

Determinação da atividade da enzima tiorredoxina redutase

A tiorredoxina redutase faz parte do sistema tiorredoxina, que está envolvido na transferência de elétrons do NADPH para a tiorredoxina redutase e a seguir, para a tiorredoxina. A atividade da TrxR em *A. ferrooxidans* LR foi determinada por espectrofotômetro em células controle e células mantidas por 1 e 10 dias na presença de calcopirita (figura 9). Não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima em células controle e células mantidas por 1 dia na presença de calcopirita. Contudo, foi observado um aumento de quatorze vezes, quando comparado com o controle, na atividade da enzima em células mantidas por 10 dias na presença de calcopirita (figura 9).

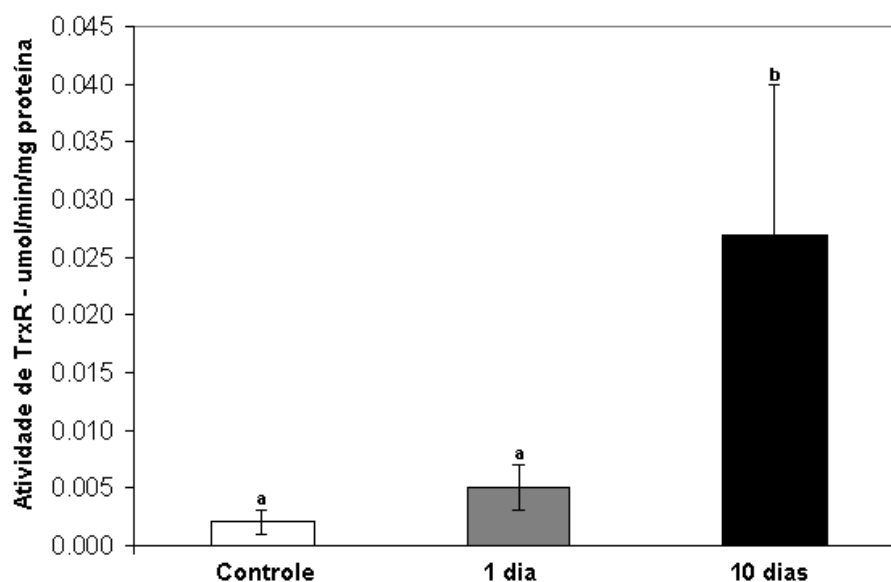


FIGURA 9 – Atividade em espectrofotômetro da proteína TrxR isolada a partir de células de *A. ferrooxidans* LR cultivadas até a taxa de 80% de oxidação de Fe^{2+} (controle) e a seguir, mantidas em contato com calcopirita por 1 e 10 dias. As barras verticais representam os desvios padrões a partir de três réplicas. Os valores que não possuem a mesma letra acima da barra são diferentes, de acordo com o teste de Tukey.

As tioredoxinas desempenham um papel importante na resposta ao estresse oxidativo (Zeller & Klug, 2006). Kumar *et al.* (2004) mostraram que em *Escherichia coli*, a tioredoxina 1 está associada com outras proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo como por exemplo, SOD. Assim sendo, não é surpresa que como no caso de SOD, a atividade da TrxR também tenha aumentado em células de *A. ferrooxidans* LR mantidas por 10 dias em contato com calcopirita.

No mecanismo do polissulfeto, para sulfetos metálicos solúveis em ácido como, por exemplo, a calcopirita, a solubilização ocorre pelo ataque de Fe^{3+} e prótons. O principal intermediário da reação é o enxofre, que pode ser oxidado a sulfato por bactérias que utilizam este elemento (Rawlings *et al.*, 2003). As tioredoxinas desempenham diferentes tipos de funções especializadas em diferentes organismos (Arner & Holmgren, 2000). Em bactérias e leveduras, ela pode doar hidrogênio para 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) redutase que está envolvida na assimilação de enxofre (Lillig *et al.*, 1999). Assim sendo, é possível que o aumento da atividade da TrxR em 10 dias de contato de *A. ferrooxidans* LR com calcopirita esteja relacionado com a assimilação do enxofre pela bactéria, que está sendo liberado pela dissolução do sulfeto metálico.

REFERÊNCIAS

- Arner, E. S. J.; Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267: 6102-6109.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Bevilaqua, D.; Leite, A. L. L. C.; Garcia Jr, O.; Tuovinen. O. H. (2002) Oxidation of chalcopirite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry* 38: 587-592.

- Bosecker, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 591-604.
- Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cabiscol, E.; Tamarit, J.; Ros, J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 3(1): 3-8.
- Fridovich, I. (1986) Superoxide dismutases. In: Meister A. (ed.) *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, Wiley, New York (58): 61-97.
- Garcia Jr, O. (1991) Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Revista de Microbiologia* 20: 1-6.
- Gomes-Junior, R. A.; Gratão, P. L.; Gaziola, S. A.; Mazzafera, P.; Lea, P. J.; Azevedo, R. A. (2007) Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. *Functional Plant Biology* 34: 449-456.
- Gratão, P. L.; Monteiro, C. C.; Antunes, A. M.; Peres, L. E. P.; Azevedo, R. A. (2008) Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *The Annals of applied biology* 153: 321-333.
- Gratão, P. L.; Polle, A.; Lea, P. J.; Azevedo, R. A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481-494.
- Helbig, K.; Bleuel, C.; Krauss, G. J.; Nies, D. H. (2008) Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190(15): 5431-5438.

- Imlay, J. A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 57: 395-418.
- Kuanyu, L.; Hein, S.; Zou, W.; Klug, G. (2004) The glutathione-glutaredoxin system in *Rhodobacter capsulatus*: part of a complex regulatory network controlling defense against oxidative stress. *Journal of Bacteriology* 186: 6800-6808.
- Kumar, J. K.; Tabor, S.; Richardson, C. C. (2004) Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3759-3764.
- Lah, M. S.; Dixon, M. M.; Patridge, K. A.; Stallings, W. C.; Fee, J. A.; Ludwig, M. L. (1995) Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: Comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* 34: 1646-1660.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leduc, L. G.; Ferroni, G. D. (1994) The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* 14: 103-120.
- McLaggan, D.; Logan, T. M.; Lynn, D. G.; Epstein, W. (1990) Involvement of gamma-glutamyl peptides in osmoadaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 172: 3631-3636.
- Morrissey, J. H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* 117(2): 307-310.

- Naessens, M.; Vandamme, E. J. (2003) Multiple forms of microbial enzymes. *Biotechnology Letters* 25: 1119-1124.
- Netto, L. E. S.; Oliveira, M. A.; Monteiro, G.; Demasi, A. P. D.; Cussiol, J. R. R.; Discola, K. F.; Demasi, M.; Silva, G. M.; Alves, S. V.; Faria, V .G.; Horta, B. B. (2007) Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* 146(1-2): 180-193.
- Novo, M. T. M.; Silva, A. C.; Moreto, R.; Cabral, P. C.; Costacurta, A.; Garcia Jr, O.; Ottoboni, L. M. M. (2000) *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie van Leeuwenhoek* 77(2): 187-195.
- Pigiet, V. P.; Conley, P. R (1977) Purification of thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutathione reductase by affinity chromatography. *The Journal of Biological Chemistry* 252(18): 6367-6372.
- Ramirez, P.; Guilian, N.; Valenzuela, L.; Beard, S.; Jerez, C. A. (2004) Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 4491-4498.
- Rawlings, D. E. (2002) Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology* 56: 65-91.
- Rawlings, D. E. (2005) Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* 4: 13. doi:10.1186/1475-2859-4-13.
- Rawlings, D. E.; Dew, D.; du Plessis, C. (2003) Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology* 21(1): 28-44.

- Rao, M. V.; Paliyath, G.; Ormrod, D. P. (1996) Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110: 125-136.
- Riccillo, P. M.; Muglia, C. I.; Bruijn, F. J.; Roe, A. J.; Booth, I. R.; Aguilar, O. M. (2000) Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology* 182: 1748-1753.
- Rohwerder, T.; Gehrke, T.; Kinzler, K.; Sand, W. (2003) Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63(3); 239-249.
- Rohwerder, T.; Sand, W. (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* 149: 1699-1709.
- Scandalios, J. G. (2002) Oxidative stress responses – what have genome-scale studies taught us? *Genome Biology* 3(7): 10191-10196.
- Schmidt, A.; Schmidt, A.; Haferburg, G.; Kothe, E. (2007) Superoxide dismutases of heavy metal resistant streptomycetes. *Journal of Basic Microbiology*. 47: 56-62.
- Seib, K. L.; Wu, H. J.; Kidd, S. P.; Apicella, M. A.; Jennings, M. P.; McEwan, A. G. (2006) Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2): 344-361.
- Solioz, M.; Stoyanov, J. V. (2003) Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 183-195.

- Third, K. A.; Cord-Ruwisch, R.; Watling, H. R. (2000) The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching. *Hydrometallurgy* 57: 225-233.
- Tremaroli, V.; Workentine, M. L.; Weljie, A. M.; Vogel, H. J.; Ceri, H.; Viti, C.; Tatti, E.; Zhang, P.; Hynes, A.; Turner, R. J.; Zannoni, D. (2008) Metabolomics investigation of bacterial response to metal challenge. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.01771-08.
- Tuovinen, O. H.; Kelly, D. P. (1972) Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. *Zeitschrift für Allgemeine Microbiologie* 12: 311-346.
- Vitória, A. P.; Lea, P. J.; Azevedo R. A (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57: 701-710.
- Zeller, T.; Klug, G. (2006) Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* 93: 259-266.
- Yoshida, Y.; Furuta, S.; Niki, E. (1993) Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochimica et Biophysica Acta* 1210: 81-88.

CONCLUSÕES

- Foram observadas mudanças no padrão de expressão dos genes *trxB*, *trx*, *gor* e *grxC* de *A. ferrooxidans* LR, dependendo da condição analisada.
- O maior nível de expressão dos genes do sistema tiorredoxina de *A. ferrooxidans* LR nas taxas de 50, 75 e 100% de oxidação de Fe^{2+} ocorre para proteger a bactéria dos produtos nocivos gerados pela respiração aeróbica.
- Os maiores níveis de expressão dos genes dos sistemas tiorredoxina e glutaredoxina durante as fases finais de oxidação pode ser devido à maior concentração de H_2O_2 .
- Em um dia após 100% de oxidação de Fe^{2+} , a maioria dos genes teve a expressão induzida, o que pode indicar que nesta faixa de tempo as proteínas codificadas pelos genes *trx*, *trxB* e *gor* sejam mais necessárias para manter as proteínas de *A. ferrooxidans* LR em seu estado funcional.
- Em dois dias após 100% de oxidação de Fe^{2+} , os genes *trxB* e *gor* foram induzidos, o que pode indicar que as proteínas codificadas por esses genes possam atuar como chaperonas.
- Na presença de calcopirita por um dia, o gene *gor* foi o único a apresentar sua expressão induzida, indicando que os níveis da proteína GR devem ser altos para que, consequentemente, a concentração da proteína GSH, que está envolvida na catalisação da oxidação do enxofre elementar, seja elevada.
- Após os diferentes tempos de *heat shock*, os níveis de expressão do gene *grxC* aumentaram significativamente em relação aos demais genes, o que pode indicar que a proteína Grx3 atue como co-chaperona.
- A análise *in silico* mostrou que existem muitas semelhanças entre as proteínas TrxR e GR, como por exemplo, estrutura secundária, peso molecular, sítio ativo, motivos funcionais e domínios.
- Foi observada uma proteólise em células de *A. ferrooxidans* LR em 10 dias de contato com a calcopirita, sendo que uma das razões pode ser o maior estresse oxidativo.

- A atividade das enzimas GR, TrxR e SOD de *A. ferrooxidans* LR aumentou significativamente em 10 dias de contato com a calcopirita, o que destaca a importância dessas enzimas na sobrevivência da bactéria na presença do sulfeto metálico.
- A caracterização da enzima SOD de *A. ferrooxidans* LR revelou que a enzima é do tipo FeSOD. Isto sugere que a enzima FeSOD é mais importante do que MnSOD para o metabolismo aeróbico e para a resposta ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appia-Ayme, C.; Quatrini, R.; Denis, Y.; Denizot, F.; Silver, S.; Roberto, F.; Veloso, F.; Valdés, J.; Cárdenas, J.P.; Esparza, M.; Orellana, O.; Jedlicki, E.; Bonnefoy, V.; Holmes, D. (2006) Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83: 273-280.
- Berndt, C.; Lillig, C. H.; Holmgren, A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783(4): 641-650.
- Bonaventura, C.; Johnson, F. M. (1997) Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. *Environmental health perspectives* 105: 5-20.
- Bosecker, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 591-604.
- Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Branlant, G. (2001). *E. coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. *Protein Science* 10: 2272-2279.
- Bushweller, J. H., Åslund, F., Wüthrich, K., and Holmgren, A. (1992) Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* 31: 9288-9293.
- Bowler, C.; Montagu, M. V.; Inze, D. (1992) Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
- Butcher, B. G.; Deane, S. M.; Rawlings, D. E. (2000) The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased

- arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1826-1833.
- Cabrera, G.; Gómez, J. M.; Cantero, D. (2005) Kinetic study of ferrous sulphate oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 301-306.
- Cannio, R.; Fiorentino, G.; Morana, A.; Rossi, M.; Bartolucci, S. (2000) Oxygen: friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra- and extracellular oxidative stress. *Frontiers in Bioscience* 5: 768-779.
- Capitani, G.; Markovic- Housley, Z.; DelVal, G.; Morris M, Jansonius, J.N.; Schurmmann, P. (2000) Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* 302: 135-154.
- Carloz, A.; Touati, D. (1986) Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *The EMBO Journal* 5(3): 623-630.
- Carlos, C.; Reis, F. C; Vicentini, R.; Madureira, D. J; Ottoboni, L. M. M. (2008) The rus Operon genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. *Current Microbiology* 57(4): 375-380.
- Chae, H. Z.; Chung, S. J; Rhee, S. G. (1994a) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *Journal of Biological Chemistry* 269: 27670-27678.
- Chelikani, P.; Fita, I; Loewen, P. C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences* 61(2): 192-208.

- Dopson, M.; Baker-Austin, C.; Kopponeedi, R. P.; Bond, P. (2003) Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* 149: 1959-1970.
- Duquesne, K.; Lebrun, S.; Casiot, C.; Bruneel, O.; Personné, J. C.; Leblanc, M.; Elbaz-Poulichet, F.; Morin, G.; Bonnefoy, V. (2003) Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology* 69(10): 6165-6173.
- Eklund, H.; Gleason, F. K.; Holmgren, A. (1991) Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* 11(1): 13-28.
- Eitinger, T. (2004) In vivo production of active nickel superoxide dismutase from *Prochlorococcus marinus* MIT9313 is dependent on its cognate peptidase. *Journal of Bacteriology* 186(22): 7821-7825.
- Farrant, J. L.; Sansone, A.; Canvin, J. R.; Pallen, M. J.; Langford, P. R.; Wallis, T. S.; Dougan, G.; Kroll, J. S. (1997) Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. *Molecular Microbiology* 25(4): 785-796.
- Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 64: 97-112.
- Garcia Jr., O. (1997) Microrganismos e metais In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (eds). *Microbiologia ambiental*. Embrapa-CNPMA Jaguariúna 11-41.
- Green, J.; Paget, M. (2004) Bacterial redox sensors. *Nature Reviews Microbiology* 2: 954-966.

- Golomzik, A. I.; Ivanov, V. I. (1965) Adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* increased hydrogen and iron ions. *Mikrobiologiya* 34: 465-468.
- Holmgren, A.; Johansson, C.; Berndt, C.; Lönn, M. E.; Hudemann, C.; Lillig, C. H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions* 33(6): 1375-1377.
- Holmgren, A.; Åslund, F. (1995) Glutaredoxins. *Methods in Enzymology* 252: 283–292.
- Holmgren, A (1995a) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry* 3: 233-316.
- Holmgren, A (1995b) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3: 239-243.
- Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 13963-13966.
- Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry*. 54: 237-271
- Holmgren, A. (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 2275-2279.
- Hubert, W. A.; Leduc, L. G.; Ferroni, G. D. (1995) Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Current Microbiology* 31: 10-14.
- Iwahori, K.; Takeuchi, F.; Kamimura, K.; Sugio, T. (2000) Ferrous iron-dependent volatilization of mercury by the plasma membrane of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9): 3823-3827.

- Kelly, D. P.; Wood, A. P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(2): 511-516.
- Kumar, J. K.; Tabor, S.; Richardson, C. C. (2004) Proteomic analysis of thioredoxin- targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America* 101(11): 3759-3764.
- Laurent, T. C.; Moore, E. C.; Reichard, P. (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 239: 3436-3444.
- Levicán, G.; Bruscella, P.; Guacunano, M.; Inostroza, C.; Bonnefoy, V.; Holmes, D. S.; Jedlicki, E. (2002) Characterization of the *petI* and *res* operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 184: 1498–501.
- Lombardi, A.; Garcia Jr., O.; Menezes, W. (2006) The Effects of Bacterial Leaching on Metal Partitioning in Sewage Sludge. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22(10): 1013-1019.
- Martin, J. L. (1995) Thioredoxin: A fold for all reasons. *Structure* 3: 245-250.
- Messens, J.; Hayburn, G.; Desmyter, A.; Laus, G.; Wyns, L. (1999) The essential catalytic redox couple in arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 38: 16857-16865.
- Nicholls, P.; Fita, I.; Loewen, P. C. (2001) Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry* 51: 51-106.

- Novo, M. T. M.; Silva, A. C. ; Moretto, R. ; Cabral, P. C. P. ; Costacurta, A. ; Garcia Jr, O.; Ottoboni, L. M. M. (2000) *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77(2): 187-195.
- Novo, M. T. M. (1998) Variabilidade genética em *Thiobacillus* sp. e efeitos de metais pesados em *Thiobacillus ferrooxidans*. Campinas, SP. Tese de doutorado, Unicamp. 105p.
- Ortenberg, R.; Gon, S.; Porat, A.; Beckwith, J. (2004) Interactions of glutaredoxins, ribonucleotide reductase, and components of the DNA replication system in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(19): 7439 -7444.
- Parker, M. W.; Blake C. C. F. (1988) Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS letters* 229(2): 377-382.
- Parker, M. W.; Blake, C. C. F.; Barra1, D.; Bossa, F.; Schinina1, M. E.; Bannister, W. H.; Bannister, J.V. (1987) Structural identity between the iron- and manganese-containing superoxide dismutases. *Protein Engineering* 1(5): 393-397.
- Paulino, L. C.; de Mello, M. P.; Ottoboni, L. M. M. (2002) Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 23(4): 520-527.
- Pivoverova, T. A.; Golovacheva, R. S. (1985) Microorganisms important for hydrometallurgy: cytology, physiology and biochemistry. In: Karavaiko, G. I.; Groudev, S.N. (eds.). *Biogeotechnology of metals. Proceedings of International Seminar and Training Course* (Moscow and Sofia, 1982). United Nations Environment Programme (UNEP), Centre of International Projects-GKNT, Moscow 27-55.

- Pomposiello, P. J.; Demple, B. (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology* 19: 109-114.
- Quatrini, R.; Lefimil, C.; Veloso, F. A.; Pedroso, J.; Holmes, D. S.; Jedick, E. (2007) Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Nucleic Acids Research* 35(7): 2153-2166.
- Quatrini, R.; Appia-Ayme, C.; Denis, Y.; Ratouchniak, J.; Veloso, F.; Valdes, J.; Lefimil, C.; Silver, S.; Roberto, F.; Orellana, O.; Denizot, F.; Jedlicki, E.; Holmes, D.; Bonnefoy, V. (2006) Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* 83(1-4): 263-272.
- Ramirez, P.; Guiliani, N.; Valenzuela, L.; Beard, S.; Jerez, C. A.; (2004) Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 4491-4498.
- Rawlings, D. E. (2002) Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology* 56: 65-91.
- Reed, D. J. (1995) Toxicity of Oxygen. In: De Matteis, F.; Smith L. L. (eds.), Molecular and Cellular Mechanism of Toxicity. *Boca Raton: CRC Press* 35-68.
- Rolfe, R. D.; Hentges, D. J.; Campbell, B. J.; Barrett, J. T. (1978) Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 36(2): 306-313.

- Rohwerder, T.; Gehrke, T.; Kinzler, K.; Sand, W. (2003) Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 239-248.
- Russel, M.; Model, P.; Holmgren, A. (1990). Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribonucleotide synthesis. *The Journal of Bacteriology* 172: 1923-1929.
- Sansone, A.; Watson, P. R.; Wallis, T. S.; Langford, P. R.; Kroll, J. S. (2002) The role of two periplasmic copper- and zinc-cofactored superoxide dismutases in the virulence of *Salmonella choleraesuis*. *Microbiology* 148: 719-726.
- Scandalios, J. G. (2002) Oxidative stress responses – what have a genome-scale studies taught us? *Genome Biology* 3(7): 10191-10196.
- Schippers, A.; Sand, W. (1999) Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms *via* thiosulfate or *via* polysulfides and sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 319-321.
- Shiratori, T.; Sonta, H. (1993) Application of iron-oxidizing bacteria to hydrometallurgical flue dust treatment and H₂S desulfurization. *FEMS Microbiology Reviews* 11: 165-174.
- Shiratori, T.; Inoue, C.; Sugawara, K.; Kusano, T.; Kitagawa, Y. (1989) Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 171: 3458-3464.
- Storz, G.; Imlay, J. A. (1999) Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology* 2: 188-194.

- Tuovinen, O. H.; Kelly, D. P. (1972) Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie* 12: 31-346.
- Tuovinen, O. H.; Niemela, S. I.; Gyllenberg, H. G. (1971) Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie van Leeuwenhoek* 37(4): 489-496.
- Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R. J.; Tettelin, H., Blake, R II.; Eisen, J. A.; Holmes, D. S. (2008) *Acidithiobacillus ferrooxidans* Metabolism: From Genome Sequence to Industrial Applications. *BMC Genomics* 9:(1) 597 doi:10.1186/1471-2164-9-597.
- Valdés, J.; Veloso, F.; Jedlicki, E.; Holmes, D. (2003) Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics* 4(1): 51.
- Vlami-Gardikas, A (2008) The multiple functions of the thiol-based electron flow pathways of *Escherichia coli*: Eternal concepts revisited. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780(11): 1170-1200.
- Vlami-Gardikas, A.; Holmgren, A. (2002) Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods in Enzymology* 347: 286-296.
- Watling, H. R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review. *Hydrometallurgy* 84: 81-108.
- Wuerges, J.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Yim, H. S.; Kang, S. O.; Djinojic Carugo K. (2004) Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(23): 8569-8574.

- Yarzabal, A.; Brasseur, G.; Ratouchniak, J.; Lund, K.; Lemesle-Meunier, D.; DeMoss, J. A.; Bonnefoy, V. (2002) The high-molecular-weight cytochrome c C_{yc2} of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *Journal of Bacteriology* 184: 313-317.
- Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *The Biochemical Journal* 318 (3): 889-896.