

Abstract

Studies involving the human gastrointestinal microbiota and its metabolites have revealed the presence of sulfate reducing bacteria (SRB) within the gut. These microorganisms have been implicated in inflammatory bowel diseases due to the toxic effects of sulfide production by SRB that lead to cell inflammation. The reduction of sulfite to sulfide is carried out by the dissimilatory sulfite reductase, DsrAB, and also involves the DsrC protein, which is a major protein in the cell and contains two conserved redox-active cysteines in a flexible C-terminal arm. The disulfide bond formed between these two conserved cysteines during sulfite reduction is believed to be reduced by several proteins that are related to the catalytic subunits of the heterodisulfide reductases (Hdr) of methanogens, namely HdrB and HdrD.

This work aimed to study the impact of DsrC variant strains from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough in cell growth while providing ethanol or pyruvate as an electron donor and search for new physiological partners of DsrC during dissimilatory sulfate reduction in lactate-sulfate or ethanol-sulfate conditions. This work shows that a single point mutation in one of the strictly conserved cysteines (Cys93) of DsrC results in a severe decrease in cell growth indicating that DsrC, and in particular Cys93, is of major importance in the energy metabolism of these organisms. Pull down assays of DsrC coupled to mass spectrometry data and Western blot analysis showed that under ethanol-sulfate condition DsrC interacts with the FloxABCD/HdrABC complex, ferredoxin and alcohol dehydrogenase, suggesting that these proteins are organized in a supramolecular structure. This result is in agreement with DsrC variant strains being affected under ethanol-sulfate condition and it experimentally validates a previous proposal that implicated DsrC in ethanol oxidation pathway via the Flox/Hdr complex. Here, through DsrC, it is shown a link between the carbon metabolism and the sulfate reduction metabolism that has never been identified before.

Keywords: Inflammatory Bowel Diseases, Sulfate-reducing Bacteria, Dissimilatory sulfate reduction, DsrC, Growth Studies, Pull down assays, Mass spectrometry, Western blot.

Resumo

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crónicas que provocam a inflamação do tecido intestinal. Vários estudos realizados à flora intestinal em pacientes com DII revelaram o envolvimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) no desenvolvimento destas doenças devido aos efeitos tóxicos provocados pelo produto final do seu metabolismo, o sulfureto, que é produzido durante a redução dissimilativa de sulfato. A redução de sulfato a sulfureto, nestes microorganismos é levada a cabo pela redutase dissimilativa de sulfato, DsrAB, e envolve uma outra proteína designada de DsrC, que possui um papel crucial dentro da célula. Esta proteína possui duas cisteínas altamente conservadas no braço flexível do C-terminal que durante a produção de sulfureto forma uma ligação dissulfureto entre as cisteínas. Nesta forma, a DsrC encontra-se no estado oxidado e acredita-se que para voltar à sua forma reduzida, várias proteínas relacionadas com as subunidades catalíticas das reductases de heterodissulfureto de organismos metanogénicos (HdrB e HdrD) actuam como possíveis parceiros fisiológicos.

Este trabalho focou-se no estudo do impacto da DsrC no crescimento de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough durante a redução dissimilativa de sulfato ou em condições fermentativas, fornecendo respectivamente etanol ou piruvato como doadores de electrões. Outro foco foi encontrar os possíveis parceiros fisiológicos da DsrC em células crescidas em meio lactato-sulfato e etanol-sulfato.

Este trabalho mostra que a mutação provocada numa das cisteínas altamente conservadas (Cys93) resulta num decréscimo acentuado no crescimento das células, o que indica que a DsrC, e em particular a Cys93, desempenha um papel crucial no metabolismo energético da célula. Os ensaios de pull down da DsrC acoplados à análise por espectrometria de massa e Western blot mostraram que a DsrC interage com o complexo FloxABCD/HdrABC e com as proteínas ferredoxina e álcool desidrogenase na condição etanol-sulfato. Este resultado valida uma proposta já efectuada anteriormente onde a DsrC tinha sido implicada na oxidação de etanol via complexo Flox-Hdr.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais, bactérias redutoras de sulfato, redução dissimilativa de sulfato, DsrC, Estudos de crescimento, Ensaios de Pull down assays, Espectrometria de Massa, Western blot.