UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BIANCA BONTEMPI BATISTA

**Mecanismos de captação de ferro por sideróforos em *Chromobacterium
violaceum***

Ribeirão Preto, SP, Brasil

2018

BIANCA BONTEMPI BATISTA

**Mecanismos de captação de ferro por sideróforos em *Chromobacterium
violaceum***

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ribeirão Preto, SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Batista, Bianca Bontempi

Mecanismos de captação de ferro por sideróforos em *Chromobacterium violaceum*. Ribeirão Preto, 2018.

86 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: da Silva Neto, José Freire.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Sideróforo. 3. Homeostase de ferro. 4. Captação de ferro. 5. Fisiologia bacteriana. 6. Virulência bacteriana.

Nome: BATISTA, Bianca Bontempi

Título: Mecanismos de captação de ferro por sideróforos em *Chromobacterium violaceum*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Aprovada em: __/__/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Mecanismos de captação de ferro por sideróforos em Chromobacterium violaceum*”, registrado com o número **151/2016**, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. José Freire da Silva Neto**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de agosto de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 100 camundongos Balb/c fêmeas pesando 20g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/08/2016 a 20/10/2018.

We certify that the Protocol nº 151/2016, entitled “*Mechanisms of siderophore-mediated iron uptake in Chromobacterium violaceum*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/29/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 100 female Balb/c mice weighing 20g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 10/20/2018.

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Ao meu Avô Walter, a pessoa mais importante da minha vida que sempre me apoiou e acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Freire da Silva Neto, pela oportunidade de realizar o mestrado em seu laboratório, por toda a sua paciência, seus ensinamentos, sua excelente orientação e por sempre estar presente. Tenho uma imensa admiração e inspiração profissional;

Aos meus colaboradores, Profa. Dra. Monica Tallarico Pupo e sua aluna Taise Tomie Hebihara Fukuda, por nos ajudarem nos experimentos de HPLC, e à Prof. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira e ao Dr. Rafael Ricci de Azevedo pela ajuda nos experimentos com neutrófilos *in vitro*;

Aos laboratórios da FMRP-USP pelo uso de equipamentos, em especial dos professores Dario Zamboni, Paulo Coelho, Maria Cristina Barreira;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;

Aos meus amigos do laboratório Maristela, Juliana, Júlia, Renato, Kelly, Carlos e Waldir pelos momentos compartilhados e troca de conhecimento; Em especial ao Renato por colaborar neste trabalho;

À técnica do nosso laboratório Cláudia, pelo suporte técnico, pela sua ajuda e por nos acolher como uma mãe;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos pelo apoio institucional e infraestrutura;

À secretária do nosso departamento Gabriela Bunhotto Zamoner, por estar sempre a nossa disposição para ajudar e esclarecer dúvidas;

À minha família, meus pais Vera e Sergio, meus irmãos Amanda e Walter, minhas avós Lucia e Claudete e meu Avó Walter, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim, por serem meu porto seguro, por me incentivarem durante esses anos e por serem o motivo de toda a minha dedicação;

À minha segunda família Silvia, Tadeu, Vitoria e Tiago por sempre estarem presentes na minha vida, me ajudarem e torcerem por mim, em especial a Vitoria por ser minha melhor amiga e confidente;

Ao meu namorado Cleyson pelos anos juntos e por ser aquele que sempre está por perto, me apoiando e dividindo a vida acadêmica;

Aos meus amigos Vinicius e Greicy por serem duas pessoas maravilhosas que sempre estão comigo nos momentos bons e ruins, e aos amigos do departamento Relber, Flávia e Lívia pelos momentos juntos.

RESUMO

Batista, BB. Mecanismos de captação de ferro por sideróforos em *Chromobacterium violaceum*. 2018. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A pouca solubilidade do ferro impõe desafios para sua captação por bactérias e outros organismos. Uma solução eficaz para este problema é a utilização de sideróforos próprios ou exógenos para solubilizar o ferro do ambiente ou de proteínas do hospedeiro e transportá-lo para o interior da célula bacteriana. Neste trabalho, identificamos vias de produção e captação de ferro por sideróforos e definimos o papel destas moléculas na virulência da bactéria *Chromobacterium violaceum*, um abundante componente da microbiota de solo e água que ocasionalmente causa graves infecções em humanos. Por meio de análises *in silico*, vários genes relacionados com a síntese e captação de sideróforos foram encontrados no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 em dois *clusters* de síntese de metabólitos secundários. Obtenção de linhagens mutantes de vários destes genes e caracterização destas linhagens por ensaios de CAS, curvas de crescimento em carência de ferro e ensaios de estimulação de crescimento revelaram que *C. violaceum* produz sideróforos endógenos. Essa produção mostrou-se dependente do precursor comum 2,3-DHBA produzido pelas enzimas codificadas pelos genes *entCEBA* (CV_1485-84-83-82) e de duas enzimas sintetases de peptídeo não ribossômicas (NRPSs CV_1486 e CV_2233), as quais provavelmente montam dois sideróforos distintos do tipo catecolato. Cada sideróforo foi captado por um receptor dependente de TonB (RDTB) específico, com o sideróforo produzido via NRPS CV_1486 sendo captado pelo RDTB CV_1491, e o sideróforo produzido via NRPS CV_2233 sendo captado pelo RDTB CV_2230, uma vez que mutantes sem esses RDTBs acumularam sideróforos no meio externo no ensaio de CAS. Além de seus sideróforos endógenos, *C. violaceum* foi capaz de utilizar xenosideróforos do tipo catecolato de outras bactérias via o RDTB CV_1491. Ensaios de infecção em camundongos revelaram que tanto a síntese quanto a captação de seus sideróforos endógenos são importantes para a virulência de *C. violaceum*, pois as linhagens mutantes que não produzem sideróforos (Δ CV_1485-84-83-82, Δ CV_1485-84-83-82/1486::pNPT e Δ CV_1486/2233::pNPT) ou são incapazes

de captá-los ($\Delta CV_2230/1491$) tiveram sua virulência diminuída em relação a linhagem selvagem. Os dados mostrando que o mutante que não capta ambos sideróforos de *C. violaceum* teve atenuação mais acentuada da virulência e induziu menor produção de NET em ensaios com neutrófilos *in vitro* sugerem que o acúmulo de sideróforos na infecção pode ser benéfico para o hospedeiro. Por fim, demonstramos a possibilidade de gerar mutantes de transposon em *C. violaceum* e ao realizarmos varredura de uma coleção destes mutantes identificamos ao menos um potencial novo fator de transcrição envolvido na regulação da síntese de sideróforo nesta bactéria. Portanto, os dados obtidos neste trabalho revelaram que *C. violaceum* utiliza-se de diferentes sideróforos endógenos para captação de ferro e que estas moléculas são importantes para seu estabelecimento no hospedeiro.

Palavras-chave: Captação de ferro, Homeostase de ferro, Sideróforos, *Chromobacterium violaceum*, Fisiologia bacteriana, Virulência bacteriana.

ABSTRACT

Batista, BB. Mechanisms of iron uptake by siderophores in *Chromobacterium violaceum*. 2018. 86 p. Dissertation – Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo.

The low solubility of iron imposes challenges for its uptake by bacteria and other organisms. An effective solution to this problem is the use of own or exogenous siderophores to solubilize the iron from environmental or host sources and transport it into the bacterial cell. In this work, we identified pathways for production and uptake of siderophores, and we defined the role of these molecules in virulence of the bacterium *Chromobacterium violaceum*, an abundant component of the microbiota of soil and water, which occasionally causes serious infections in humans. By performing an *in silico* analysis, we found several genes related with synthesis and uptake of siderophores in the genome of *C. violaceum* ATCC 12472 within two secondary metabolite biosynthesis gene clusters. Obtaining mutant strains from several of these genes and characterizing these strains by CAS assays, growth curves under iron deficiency and growth stimulation assays revealed that *C. violaceum* produces endogenous siderophores. This production was shown to be dependent on the common precursor 2,3-DHBA produced by the enzymes encoded by the genes *entCEBA* (CV_1485-84-83-82) and on two non-ribosomal peptide synthetase enzymes (NRPSs CV_1486 and CV_2233), which probably build two distinct catecholate siderophores. Each siderophore was picked up by a specific TonB-dependent receptor (RDTB), with the siderophore produced via NRPS CV_1486 being picked up by RDTB CV_1491, and the siderophore produced via NRPS CV_2233 being picked up by RDTB CV_2230, since mutants without those RDTBs accumulated siderophores in the external environment in the CAS assays. In addition to its endogenous siderophores, *C. violaceum* was able to use catecholate-type xenosiderophores from other bacteria via the RDTB CV_1491. Infection assays in mice revealed that both the synthesis and the uptake of its endogenous siderophores are important for the virulence of *C. violaceum*, since mutant strains that do not produce siderophores (Δ CV_1485-84-83-82, Δ CV_1485-84-83-82/1486 :: pNPT and Δ CV_1486/2233 :: pNPT) or are unable to uptake them (Δ CV_2230/1491) had their virulence decreased relative to the wild type strain. The data showing that the mutant strain unable to uptake both siderophores of

C. violaceum had more pronounced attenuation of virulence and induced lower NET production in *in vitro* neutrophil assays suggest that the accumulation of siderophores in the infection may be beneficial to the host. Finally, we demonstrated the possibility of generating transposon mutants in *C. violaceum*, and by screening a collection of these mutants we identified at least one potential novel transcription factor involved in the regulation of siderophore synthesis in this bacterium. Therefore, the data obtained in this work revealed that *C. violaceum* uses different endogenous siderophores for iron uptake and that these molecules are important for its establishment in the host.

Keywords: Iron uptake, Iron homeostasis, Siderophores, *Chromobacterium violaceum*, Bacterial physiology, Bacterial virulence.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens e plasmídeos.	28
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para obtenção e confirmação de mutantes .	31
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nos mutantes de transposon.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Clusters</i> gênicos de síntese dos sideróforos enterobactina e crisobactina.	20
Figura 2: Exportação, captação e utilização do sideróforo enterobactina..	21
Figura 3: A batalha pelo ferro entre hospedeiro e bactéria.....	24
Figura 4: Características da bactéria <i>Chromobacterium violaceum</i>	27
Figura 5: Esquema para obtenção dos mutantes nulos.	33
Figura 6: Esquema para obtenção dos mutantes por inserção.	34
Figura 7: Mapa do vetor pIT2 contendo o transposon IS <i>lacZ</i> /hah (T8).	35
Figura 8. Análise <i>in silico</i> de genes envolvidos na síntese de metabolitos secundários.	44
Figura 9. Confirmação das linhagens mutantes de genes relacionados a produção e captação de sideróforos.	46
Figura 10. Confirmação dos mutantes obtidos por inserção de vetor.....	47
Figura 11. Curvas de crescimento das linhagens em condições de suficiência e carência de ferro.	49
Figura 12. Ensaio de viabilidade das linhagens mutantes.....	521
Figura 13. Quantificação do tamanho das colônias da linhagem selvagem e mutantes.	52
Figura 14.. Níveis de expressão das NRPSs em suficiência e carência de ferro por fase de crescimento.	53
Figura 15. Caracterização da produção de sideróforos por <i>C. violaceum</i>	54
Figura 16. Utilização dos sideróforos produzidos por <i>C. violaceum</i> via seus receptores dependentes de TonB.	56
Figura 17. Utilização de xenosideróforos por <i>C. violaceum</i> via receptores dependentes de TonB.....	57
Figura 18. Padrões cromatográficos dos sobrenadantes de culturas de <i>C. violaceum</i> .	58
Figura 19. Sideróforos são necessários para infecção por <i>C. violaceum</i>	60
Figura 20. Padronização da obtenção de mutantes por inserção do transposon IS <i>lacZ</i> /hah em <i>C. violaceum</i>	62
Figura 21. Caracterização dos mutantes de Transposon 1A15 e 1B14.....	64
Figura 22. Identificação do sitio de inserção do transposon nas linhagens mutantes.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Homeostase de ferro em bactérias	15
1.2 Captação de ferro em bactérias: a importância dos sideróforos	17
1.3 O ferro no contexto da relação patógeno-hospedeiro	21
1.4 <i>Chromobacterium violaceum</i>	24
2. OBJETIVO	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Linhagens e Plasmídeos	28
3.2. Meios de cultura e condições de cultivo	29
3.3. Análises <i>in silico</i>	29
3.4. Procedimentos gerais de clonagem	29
3.4.1. Reações de PCR	29
3.4.2. Digestão de DNA com enzimas de restrição	30
3.4.3. Ligação de DNA e transformação por eletroporação	30
3.4.4. Sequenciamento de DNA	30
3.5. Construção das linhagens mutantes em <i>C. violaceum</i>	32
3.5.1. Construção de mutantes nulos por troca alélica	32
3.5.2. Construção de mutantes por inserção	34
3.5.3. Obtenção de mutantes por transposição	35
3.5.3.1 Confirmação dos mutantes de transposição por Southern Blot	37
3.5.3.2. Identificação do sitio de inserção do transposon	37
3.6. Extração de RNA e Northern Blot	38
3.7. Ensaios fenotípicos em carência ou suficiência de ferro	39
3.7.1. Curvas de crescimento	39
3.7.2. Ensaios de viabilidade	39
3.8. Caracterização da produção de sideróforos em <i>C. violaceum</i>	39

3.8.1. Ensaio de CAS	39
3.8.2. Ensaio de utilização de sideróforo.....	40
3.8.3. Ensaio de utilização de xenosideróforos	40
3.9. Purificação e caracterização de sideróforos produzidos por <i>C. violaceum</i>	41
3.10. Papel dos sideróforos na patogênese de <i>C. violaceum</i>	41
3.10.1. Ensaio de virulência	41
3.10.2. Ensaio da carga bacteriana em órgãos.....	42
3.10.3. Ensaio de produção de NET por neutrófilos <i>in vitro</i>	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Análise <i>in silico</i> de vias de síntese de metabólitos secundários de <i>C. violaceum</i>	43
4.2. Construção das linhagens mutantes para genes de produção e captação de sideróforos em <i>C. violaceum</i>	45
4.3 Caracterização das linhagens mutantes em carência e suficiência de ferro	48
4.4. Análise da expressão de genes relacionados a síntese de sideróforos	52
4.5. Caracterização da produção e utilização de sideróforos por <i>C. violaceum</i>	53
4.6. Isolamento e purificação dos sideróforos de <i>C. violaceum</i>	58
4.7. Sideróforos de <i>C. violaceum</i> apresentam papel na patogênese bacteriana ...	59
4.8. Obtenção de mutantes por inserção de transposon e varredura para produção de sideróforos	61
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Homeostase de ferro em bactérias

O ferro é um micronutriente fundamental para todos os organismos vivos, pois atua como cofator de enzimas envolvidas com muitos processos biológicos importantes tais como: a fotossíntese, a respiração, o transporte de oxigênio, a regulação gênica, a biossíntese de DNA, entre outros (ANDREWS *et al.*, 2003; KREWULAK e VOGEL, 2008). Este metal de transição é biologicamente indisponível na maioria dos ambientes. Na presença de oxigênio em pH neutro a forma reduzida solúvel de ferro ferroso (Fe^{2+}) é rapidamente oxidada na forma de ferro férrico (Fe^{3+}) insolúvel. Além de sua baixa solubilidade, o ferro também é escasso para patógenos bacterianos devido ao seu sequestro em proteínas de hospedeiros eucariotos (SCHAIBLE e KAUFMANN, 2004; BRAUN e HANTKE, 2011; CASSAT e SKAAR, 2013). Por outro lado, em altas concentrações o ferro pode ser tóxico para o organismo por causar estresse oxidativo e danificar macromoléculas. Isto ocorre porque o Fe^{2+} reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando Fe^{3+} e radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), uma espécie reativa de oxigênio que danifica DNA, lipídeos e proteínas (IMLAY, 2013).

Considerando que a privação de ferro pode limitar drasticamente a multiplicação bacteriana e seu excesso pode causar danos para as maquinarias celulares, é fundamental que a homeostase de ferro seja mantida. De acordo com Andrews e colaboradores (2003), os mecanismos que bactérias e outros organismos possuem para manter o ferro em níveis fisiológicos podem ser categorizados em: sistemas de transporte de alta afinidade para captar o ferro em suas várias formas; proteínas para estocagem e sequestro de ferro intracelular, tais como ferritinas; sistemas regulatórios que coordenam a expressão de muitos genes de acordo com a disponibilidade de ferro.

Em bactérias, os genes cuja expressão é modulada de acordo com a disponibilidade de ferro estão sob controle de fatores de transcrição globais de resposta a ferro, como Fur em bactérias Gram-negativas e DxtR em algumas bactérias Gram-positivas, além de pequenos RNAs regulatórios (sRNA) de resposta a ferro (LEE e HELMANN, 2007; OGLESBY-SHERROUSE e MURPHY, 2013; FILLAT,

2014). Além desta regulação global, existem também sistemas de regulação locais, como fatores de transcrição e fatores sigma alternativos, que respondem a fontes específicas de ferro, como heme e sideróforos. Bem caracterizados em *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, estes sistemas envolvem uma cascata de sinalização transmembrana que resulta na ativação de fatores sigma da subfamília de função extracitoplasmática (ECF), chamados sigmas ECF do tipo Fecl ou sigmas de carência a ferro (BRAUN e MAHREN, 2005; LLAMAS *et al.*, 2014).

O fator de transcrição Fur é uma metalo-proteína dimérica descrita pela primeira vez na década de 80 como um repressor de genes que codificam sistemas de captação de ferro em *E. coli* (HANTKE, 1981). Quando há suficiência de ferro, o regulador Fur é ativado, tendo Fe^{2+} como co-regulador. O complexo metalo-proteína Fur e Fe^{2+} se liga a uma sequência específica do DNA, chamada Fur box, normalmente localizada entre os elementos -10 e -35 do promotor de alguns genes, reprimindo a expressão dos mesmos (ANDREWS *et al.*, 2003; LEE e HELMANN, 2007; FILLAT, 2014). Além de atuar como repressor direto, Fur também exerce regulação positiva na expressão de alguns genes, seja de modo direto (CARPENTER *et al.*, 2009; DA SILVA NETO *et al.*, 2009) ou indiretamente via sRNAs (OGLESBY-SHERROUSE e MURPHY, 2013).

Em 2002, Massé e Gosttesman identificaram um sRNA regulado por Fur, denominado RyhB, que medeia esta regulação indireta. Em condições de alto nível de ferro, Fur reprime a produção de RyhB e assim os genes que são reprimidos por RyhB encontram-se expressos. Já em condições de baixo nível de ferro, o Fur libera a expressão de RyhB e este sRNA parecia no mRNA dos genes alvos, levando à degradação destes mRNAs (MASSÉ e GOSTTESMAN, 2002). O RyhB e outros sRNAs análogos em *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis* atuam reprimindo a expressão de genes que codificam proteínas de armazenamento de ferro e enzimas de utilização de ferro, levando assim a uma redistribuição do ferro intracelular em situação de limitação deste metal (OGLESBY-SHERROUSE e MURPHY, 2013). Em patógenos, Fur e RyhB controlam vários processos importantes para virulência, tais como: a aquisição de ferro e heme; invasão e sobrevivência em células eucarióticas; motilidade, quimiotaxia e formação de biofilme; síntese de cápsula; resistência a ácido; resistência ao estresse oxidativo (PORCHERON e DOZOIS, 2015).

1.2 Captação de ferro em bactérias: a importância dos sideróforos

As bactérias possuem estratégias para captar ferro em suas mais variadas formas e o arsenal de sistemas de transporte depende de quais fontes de ferro estarão mais disponíveis no ambiente ocupado pelo micro-organismo (ANDREWS *et al.*, 2003; WANDERSMAN e DELEPELAIRE, 2004). O Fe^{2+} , que predomina em ambientes anaeróbicos e ácidos, é transportado por sistemas localizados na membrana citoplasmática, como FeoAB e EfeUOB (LAU *et al.*, 2015). Já o Fe^{3+} , encontrado na forma insolúvel ou fortemente ligado a proteínas, pode ser transportado por dois mecanismos gerais: usando quelantes de ferro de baixo peso molecular, denominados sideróforos, os quais são transportados por receptores; ou sequestro de ferro por receptores de patógenos bacterianos direto de fontes do hospedeiro, como transferrinas, lactoferrinas, hemoglobinas e heme (KREWULAK e VOGEL, 2008; BRAUN e HANTKE, 2011; CASSAT e SKAAR, 2013). No caso do heme livre ou em hemoproteínas, além do transporte direto via receptores também ocorre a captação mediada por hemóforos, proteínas secretadas capazes de sequestrar heme, permitindo seu transporte (WANDERSMAN e DELEPELAIRE, 2012).

A estratégia mais comum e disseminada para a captação de ferro em bactérias de vida livre e patógenos é através de sideróforos, moléculas de baixo peso molecular que sequestram o ferro na forma de Fe^{3+} com alta afinidade, solubilizando-o do ambiente ou removendo de proteínas do hospedeiro como transferrinas (FARALDO-GOMEZ e SANSOM, 2003; MIETHKE e MARAHIEL, 2007; BILITEWSKI *et al.*, 2017). Esta estratégia mostra-se bem-sucedida porque as bactérias podem utilizar tanto sideróforos endógenos produzidos por vias próprias, quanto sideróforos exógenos (xenosideróforos) produzidos por outras bactérias, ou ainda por fungos e plantas, bastando para isto possuir receptores, chamados de receptores dependentes de TonB, para uma dada classe de sideróforos (CROSA e WALSH, 2002). Por exemplo, a bactéria *Caulobacter crescentus*, que não apresenta uma via própria de produção de sideróforos, consegue utilizar xenosideróforos do tipo hidroxamato ou captar ferro na forma de heme, por apresentar diversos receptores dependentes de TonB em seu genoma (BALHESTEROS *et al.*, 2017).

Dependendo da natureza química dos sideróforos, a sua biossíntese ocorre através de diferentes mecanismos. Eles são sintetizados por sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS, do inglês *nonribosomal peptide synthetases*) (CROSA e

WALSH, 2002) ou por vias de síntese independentes de NRPS (NIS, do inglês NRPS *independent siderophore biosynthesis pathway*) (CHALLIS, 2005). As NRPSs são grandes enzimas multifuncionais envolvidas com a síntese de diversos metabólitos secundários, incluindo sideróforos e antibióticos. Essas enzimas são organizadas em um ou mais módulos e atuam como uma linha de montagem para sintetizar um produto peptídico específico, com cada módulo sendo responsável pela incorporação de uma unidade específica do peptídeo (SINGH *et al.*, 2017). Uma NRPS apresenta três domínios catalíticos principais: um domínio de condensação (C), que catalisa a formação de ligações peptídicas entre substratos aminoacil específicos; um domínio de adenilação (A), responsável pela seleção e ativação do substrato por meio da adenilação do mesmo; e um domínio de tiolação (T), o qual atua transportando o substrato por uma ligação tioéster pelos domínios. Os módulos que incorporam D-aminoácidos contêm um domínio de epimerização (E) e o módulo C-terminal geralmente é um domínio tioesterase (Te) a partir do qual o metabólito sintetizado é liberado (Figura 1). Os módulos das NRPSs também podem conter domínios adicionais responsáveis por modificações de substrato (DORRESTEIN e KELLEHER, 2006; REITZ *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017). Em muitos casos, os genes que codificam NRPSs envolvidas na síntese de sideróforos (exemplos *entF* e *cbsF*) localizam-se no genoma em agrupamentos (*clusters*) com outros genes que codificam proteínas envolvidas na captação de ferro via aquele sideróforo (Figura 1).

Embora exista um número enorme de sideróforos sintetizados via NRPS já caracterizados, eles são essencialmente peptídeos modificados classificados em três grupos, com base na sua estrutura: hidroxamatos, catecolatos e alfa-hidroxicarboxilatos. Além disso, hoje já se sabe da existência de sideróforos mistos, que apresentam mais de um grupo em sua estrutura (CROSA e WALSH, 2002; MIETHKE e MARAHIEL, 2007). Já os sideróforos sintetizados via NIS começaram a ser estudados mais recentemente e ao invés de peptídeos são montados a partir de ácidos dicarboxílicos e diaminas por sintetases da família *lucA/lucC*, inicialmente descritas na via de síntese do sideróforo aerobactina de *E. coli* (CHALLIS, 2005). Estes grupos químicos garantem a formação de complexos de alta afinidade e com uma grande estabilidade termodinâmica entre o Fe^{3+} e o sideróforo (FARALDO-GOMEZ e SANSOM, 2003; MIETHKE e MARAHIEL, 2007).

Figura 1: Clusters gênicos de síntese dos sideróforos enterobactina e crisobactina. Genes envolvidos na síntese dos sideróforos enterobactina e crisobactina das bactérias *E. coli* e *Dickeya dadantii*, ambos sideróforos tri-catecolatos. Estão mostrados os genes que codificam: enzimas envolvidas na produção do precursor 2,3-DHBA (azul, verde, amarelo e laranja), proteínas de transporte dos sideróforos (branco), enzima esterase que faz a dissociação entre o ferro e o sideróforo (cinza), proteína MbtH-like de função ainda desconhecida (preto) e as enzimas NRPS (vermelho) que fazem a montagem do sideróforo. Estão mostrados ainda os módulos (1 e 2) e os domínios (C, A, T, E e Te) presentes em cada enzima NRPS (EntF e CbsF). Modificada de REITZ *et al.*, 2017 e SINGH *et al.*, 2017.

Os sideróforos, sintetizados em condições de limitação de ferro e exportados para o meio extracelular, formam complexos ferri-sideróforos, os quais são reconhecidos por receptores específicos e transportados ativamente para o interior da célula bacteriana (BRAUN e HANTKE, 2011). Este processo será ilustrado abaixo para o sideróforo enterobactina, como representativo do que ocorre em bactérias Gram-negativas (Figura 2). A enterobactina é exportada por meio da proteína EntS e de bombas de efluxo que atuam em conjunto com TolC (HORIYAMA e NISHINO, 2014). No meio extracelular, a enterobactina associa-se ao ferro e estes complexos ferri-sideróforos são transportados através da membrana externa por receptores dependentes de TonB (RDTB) como FepA. Como os RDTBs localizam-se na membrana externa, a energia para este transporte provém de força próton-motriz transmitida pelo complexo trimérico das proteínas TonB/ExbB/ExbD, localizado na membrana interna (NOINAJ *et al.*, 2010) (Figura 2). Os RDTBs são proteínas com 22

folhas- β enoveladas na forma de barril- β , o qual é ocluído por um domínio N-terminal (KREWULAK e VOGEL, 2008). Esses receptores transportam não apenas complexos ferri-sideróforos, mas também outros complexos com ferro ou ainda moléculas distintas como vitamina B12, açúcares e outros metais (NOINAJ *et al.*, 2010). Uma vez no periplasma, os complexos ferri-sideróforos associam-se a proteína FepB e são transportados para o citoplasma por transportadores do tipo ABC (FepCDG), utilizando energia da hidrólise de ATP. No citoplasma bacteriano o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} por uma esterase (Fes) e o sideróforo pode sofrer degradação ou ser reciclado (Figura 2) (KREWULAK e VOGEL, 2008).

Figura 2: Exportação, captação e utilização do sideróforo enterobactina. O sideróforo enterobactina é produzido pelas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, principalmente pela bactéria *E. coli*. Aqui podemos observar que a enterobactina é exportada para o meio externo, onde forma complexos com Fe^{3+} . Estes complexos são captados pela célula bacteriana por meio de transportadores e o ferro é liberado no citoplasma. Modificada de ADLER *et al.*, 2014.

Os sideróforos têm sido usados como uma nova estratégia de terapia no controle de patógenos bacterianos. Essa estratégia, conhecida como Cavalo-de-Troia, representa uma nova abordagem para a entrega de antibióticos, melhorando a sua captação celular e permitindo o seu transporte através de bio-barreiras impermeáveis (GÓRSKA *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016). A conjugação de sideróforos com antibióticos resulta em moléculas conhecidas como sideromicinas,

nas quais o antibiótico entra na célula pela via de captação do complexo ferro-sideróforo, e o mesmo é liberado dentro da célula para poder agir em seu alvo. Essa estratégia tem permitido que antibióticos de uso para bactérias Gram-positivas sejam usados em bactérias Gram-negativas, como, por exemplo, o conjugado de sideróforo-cefalosporina-oxazolidinona, no qual a cefalosporina é usada como ponte, para que a oxazolidinona seja liberada por meio da ação de β -lactamases (SCHALK, 2018). A estratégia de Cavalo-de-Troia também pode ser usada para entregar metais pesados, como o gálio, cujo transporte para a célula bacteriana pode interromper o metabolismo bacteriano de ferro e prevenir a formação de biofilme (BANIN *et al.*, 2008). Em um cenário de surgimento de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos, estas abordagens de controle tornam-se cada vez mais necessárias e urgentes.

1.3 O ferro no contexto da relação patógeno-hospedeiro

No corpo humano, a homeostase do ferro envolve sua captação no intestino (transportador DMT1 em enterócitos no duodeno), seu transporte para os vários tipos celulares ligado a transferrina (sobretudo para a medula óssea onde ele é incorporado ao grupo heme durante a eritropoiese), a reciclagem de eritrócitos senescentes por macrófagos no baço e a estocagem do ferro no fígado em ferritinas (CASSAT e SKAAR, 2013). O controle sistêmico destes processos é exercido pelo hormônio peptídico hepcidina, produzido no fígado em resposta ao excesso de ferro extracelular ou como parte da resposta inflamatória para reduzir a quantidade de ferro circulante no plasma (GANZ e NEMETH, 2015). A hepcidina liga-se e causa a degradação do receptor ferroportina, o exportador de ferro presente em enterócitos, macrófagos do baço e hepatócitos, de modo que tanto a absorção quanto a mobilização do ferro estocado são inibidas (CASSAT e SKAAR, 2013; SHELDON *et al.*, 2016). Este mecanismo de indução da hepcidina é particularmente importante durante a infecção por patógenos (chamado de "anemia de infecção") como uma forma de reduzir os níveis de ferro circulante no hospedeiro (DRAKESMITH e PRENTICE, 2012).

Assim, uma importante estratégia de hospedeiros vertebrados no combate às infecções bacterianas, conhecida como imunidade nutricional, é restringir o acesso de ferro aos patógenos, evitando assim sua proliferação (WEINBERG, 1975; CASSAT e SKAAR, 2013; PARROW *et al.*, 2013). Por sua vez, as bactérias possuem mecanismos eficazes para “roubar” o ferro do hospedeiro, gerando assim uma batalha por este metal (Figura 3) (CHU *et al.*, 2010; BARBER e ELDE, 2015). A maior fonte

de ferro do corpo, o grupo heme ligado sobretudo a hemoglobina, é protegido dentro de hemácias ou sequestrado pela haptoglobina (hemoglobina livre) ou pela hemopexina (heme livre). Através da endocitose os complexos de hemoglobina-haptoglobina e heme-hemopexina são absorvidos por macrófagos ou hepatócitos, e o ferro ligado pode ser armazenado ou devolvido ao ciclo do ferro. No entanto, bactérias patogênicas acessam esta fonte de ferro produzindo hemolisinas que degradam as hemácias e TBDRs que captam o heme e a hemoglobina (Figura 3A) (SHELDON *et al.*, 2016; HOOD e SKAAR, 2012). O sequestro do ferro circulante pelo hospedeiro envolve sobretudo a ação de proteínas com alta afinidade por ferro, tais como a transferrina e a lactoferrina. Enquanto a transferrina é utilizada para transporte de ferro no plasma, distribuindo-o por diferentes tipos celulares e fazendo com que haja a escassez de ferro durante uma infecção, a lactoferrina é encontrada no leite, em secreções mucosas e nos grânulos secundários dos neutrófilos (CASSAT e SKAAR, 2013; SHELDON *et al.*, 2016). Para subverter estes sistemas de sequestro de ferro do hospedeiro, as bactérias produzem moléculas chamadas de sideróforos que extraem o ferro dessas proteínas (Figura 3B-D).

Além da lactoferrina, os neutrófilos também liberam nos locais de infecção bacteriana a lipocalina (siderocalina), que tem afinidade em se ligar nos sideróforos do tipo catecolato, evitando assim a captação de ferro pelo patógeno (Figura 3E) (SIA *et al.*, 2013). Um mecanismo de evasão bacteriana é produzir sideróforos modificados livres da ação da lipocalina. Em condições normais do hospedeiro, o transporte de ferro pela lipocalina é supostamente auxiliado pelo sideróforo de mamíferos, o ácido 2,5-dihidroxibenzoato (2,5-DHBA), que é estruturalmente similar ao sideróforo de *E. coli*. Assim, o 2,5-DHBA se liga ao ferro livre e, quando ligado a lipocalina, pode ser transportado através das membranas celulares, facilitando a captação de ferro mitocondrial. Mas já foi visto que a bactéria *E. coli* consegue utilizar o 2,5-DHBA para seu crescimento, por isso durante a infecção essa molécula é negativamente regulada (Figura 3F) (KHAN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2014). Em infecções por patógenos intracelulares os macrófagos utilizam a proteína de resistência natural de macrófago 1 (NRAMP1) para exportar ferro e outros metais essenciais do compartimento fagossômico, deixando o ambiente intracelular escasso em ferro (Figura 3G).

Figura 3: A batalha pelo ferro entre hospedeiro e bactéria. Esquema mostrando os mecanismos usados pelas células do hospedeiro e pela bactéria para a competição pelo ferro durante a infecção. A. Bactérias produzem hemolisinas para liberar a hemoglobina (Hb) das hemácias. Embora protegida pela haptoglobina (Hp), a hemoglobina ou o heme livre podem ser captados pelas bactérias como fonte de ferro. B, C e D. Os sideróforos produzidos pelas bactérias roubam o ferro presente nas proteínas transferrinas (Tf) e lactoferrinas (Lf). E. Os neutrófilos liberam a lipocalina que sequestra os sideróforos das bactérias. F. O sideróforo de mamíferos (2,5-DHBA) pode ser usado por algumas bactérias como fonte de ferro. G. NRAMP1 e ferroportina alteram a concentração de Fe^{2+} intracelular por meio do hormônio hepcidina. Modificada de Sheldon *et al.*, 2016.

1.4 *Chromobacterium violaceum*

Em termos taxonômicos a *Chromobacterium violaceum* (*C. violaceum*) pertence ao filo Proteobacteria, classe β -proteobacteria, ordem Neisseriales e família Neisseiraceae. A *C. violaceum* é uma bactéria Gram-negativa, saprofítica e anaeróbia facultativa, sendo um componente abundante da microbiota de solos. Além de ser encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais de todos os continentes, incluindo os biomas Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica brasileira (LIMA-BITTENCOURT *et al*, 2007), esta bactéria também é um patógeno oportunista de humanos (YANG e LI, 2011; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017). Recentemente, o gênero *Chromobacterium* passou por diversas alterações, com a descrição de mais de uma dezena de espécies, além da espécie tipo *C. violaceum*, sendo que a maioria delas foi isolada de fontes ambientais (BATISTA e DA SILVA NETO, 2017).

Uma das características marcantes de *C. violaceum* é a produção de um pigmento insolúvel em água de cor violeta chamado violaceína (Figura 4A e B). A violaceína é sintetizada a partir do L-triptofano na presença de oxigênio por enzimas codificadas pelo operon *vioABCDE*, cuja expressão é regulada por *quorum sensing* via sistema Cvil (sintase do autoindutor L-homoserina lactona) e CviR (fator de transcrição) (MCCLEAN *et al*, 1997; STAUFF e BASSLER, 2011). A violaceína tem sido muito estudada devido sua ação *in vitro* antibacteriana, antiparasitária, antiviral e indução de apoptose em células cancerosas (DURAN *et al.*, 2007; DURAN *et al.*, 2016). Além da violaceína, *C. violaceum* e/ou outras espécies do gênero *Chromobacterium* produzem outros metabólitos secundários de interesse biotecnológico incluindo vários antibióticos (aerocianidina, aerocavina e monobactam SB-26.180), cianeto de hidrogênio e o depsipeptídeo antitumoral FR901228 (DURAN e MENCK, 2001; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017).

Embora raros, os casos de infecção por *C. violaceum* em humanos e outros animais são caracterizados por rápida disseminação e alta mortalidade. Alguns relatos de casos clínicos já foram observados na Colômbia (DÍAZ PÉREZ *et al.*, 2007), Brasil (DE SIQUEIRA *et al.*, 2005), Índia (KUMAR, 2012), além de muitos outros países de clima tropical e subtropical (YANG e LI, 2011; HAGIYA *et al.*, 2014; SWAIN, 2014; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017). Os pacientes, geralmente indivíduos com baixa

imunidade, desenvolvem lesões na pele (Figura 4C e D) e abscessos no fígado e pulmão, evoluindo para um quadro de septicemia fatal. A rota mais provável de entrada no corpo são ferimentos em contato com solo ou água parada contendo a bactéria (YANG e LI, 2011).

Trabalhos pioneiros usando camundongos como modelo de infecção têm demonstrado o papel de um sistema de secreção do tipo III (T3SS) localizado na ilha de patogenicidade Cpi1/1a como determinante de virulência em *C. violaceum*, pois linhagens mutantes neste sistema são bastante atenuadas para virulência (MIKI *et al.*, 2010; MIKI *et al.*, 2011; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017). Os genes presentes na ilha Cpi1/1a são ativados pelo regulador global de virulência CilA em resposta a sinais ainda não identificados (MIKI *et al.*, 2011). Recentemente, um trabalho revelou que um fator de transcrição da família MarR, o regulador OhrR, está relacionado com a virulência de *C. violaceum*. Foi demonstrado que OhrR funciona como um sensor de hidroperóxidos orgânicos e regula genes de defesa ao estresse oxidativo (*ohrA*) e genes relacionados com virulência, como aqueles codificando enzimas extracelulares (DA SILVA NETO *et al.*, 2012; PREVIATO-MELLO *et al.*, 2017).

A contenção da infecção provocada por *C. violaceum* depende tanto do mecanismo de piroptose de macrófagos infectados, quanto da ativação de células *natural killer* (NK) no fígado, liberando a bactéria do ambiente intracelular para ação de neutrófilos (Figura 4E) (MALTEZ *et al.*, 2015). A ocorrência deste mecanismo de morte celular programada nos macrófagos chamado piroptose depende da ativação do inflamassoma NLRC4 via agulha do T3SS de *C. violaceum* em células murinas e humanas. Uma vez ativado, o inflamassoma NLRC4 leva a ativação de caspase 1, a qual processa e promove a secreção de citocinas IL-1 β e IL-18, sendo estas citocinas responsáveis por desencadear a piroptose em macrófagos no baço e a ativação da citotoxicidade de células NK para remoção de nichos replicativos no fígado (Figura 4E) (ZHAO *et al.*, 2011; MALTEZ *et al.*, 2015; MALTEZ e MIAO, 2016). Assim, *C. violaceum* parece ser um bom modelo de patógeno oportunista ambiental, que embora não tenha evoluído com hospedeiros vertebrados, possui fatores de virulência que a torna potencialmente letal se não controlada pela imunidade do hospedeiro (MALTEZ e MIAO, 2016).

Figura 4: Características da bactéria *Chromobacterium violaceum*. A. *C. violaceum* semeada em placa LB, evidenciando a presença de seu pigmento roxo, a violaceína. B. Imagem mostrando colônias isoladas de *C. violaceum*. C e D. Lesões na pele causadas pela infecção por *C. violaceum*. E. Esquema evidenciando a ativação do sistema imune inato contra *C. violaceum* durante a infecção. A ativação do inflamassoma NLRC4 por meio do T3SS causa a ativação da caspase 1. Esta, por sua vez, processa citocinas que uma vez liberadas levam a piroptose ou ativação de células NK. Em ambos os casos a bactéria é liberada para morte por neutrófilos. Modificada de Richard *et al*, 2015 (C e D) e Maltez e Miao, 2016 (E).

Em 2003 foi realizado o sequenciamento do genoma completo da linhagem ATCC 12472 de *C. violaceum* por um consórcio de pesquisadores de todo Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Seu cromossomo circular único possui 4.571.080 pb com 64.83% de conteúdo G+C, tendo sido anotadas 4.431 ORFs (*Open Reading Frame*). A sequência do genoma revelou grande potencial para adaptação ao ambiente de vida livre, bem como a presença de genes codificando fatores de virulência (VASCONCELOS *et al.*, 2003; GRANGEIRO *et al.*, 2004; HUNGRIA *et al.*, 2004). Considerando que o genoma indica o potencial ainda não investigado de produção e utilização de sideróforos por *C. violaceum*, nossa hipótese é que esta bactéria produza estas moléculas quelantes como uma estratégia para superar a imunidade nutricional e se estabelecer de modo efetivo no ambiente limitante de ferro do hospedeiro ou ainda para captar ferro como uma bactéria de vida livre.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar as vias de produção dos possíveis sideróforos produzidos e utilizados por *Chromobacterium violaceum* para captação de ferro, além de definir o papel destas moléculas na virulência desta bactéria oportunista.

Para isto, foram utilizadas as seguintes estratégias experimentais:

- Verificação da produção de sideróforos endógenos por *C. violaceum* e subsequente caracterização destas moléculas;
- Identificação das vias de produção de sideróforo através de mutagênese dirigida e varredura de mutantes de transposon;
- Caracterização fenotípica dos mutantes deficientes na produção de sideróforos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens e Plasmídeos

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens e plasmídeos

Linhagens	Genótipo/Finalidade	Origem/Referência
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96</i> <i>relA1</i>	HANAHAN, 1983
S17-1	Conjugação de plasmídeos	SIMON <i>et al.</i> , 1983
SM10 λ pir	Conjugação para obtenção de mutantes de transposon	JACOBS <i>et al.</i> , 2003
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	Linhagem selvagem. Sequenciada, isolado de água, patogênica, produz violaceína	Fundação André Tosello (Campinas)
CVNAL	Mutante espontâneo resistente ao ácido nalidíxico com mutação pontual no gene <i>gyrA</i>	Este trabalho
Δ CV_1486	Mutante nulo com deleção do gene CV_1486	Este trabalho
CV_1486::pNPT	Mutante por inserção do vetor pNPTS138 no gene CV_1486	Este trabalho
CV_2233::pNPT	Mutante por inserção do vetor pNPTS138 no gene CV_2233	Este trabalho
Δ CV_1486/2233::pNPT	Mutante nulo com deleção do gene CV_1486 e com inserção do vetor pNPTS138 no gene CV_2233	Este trabalho
Δ CV_1485-84-83-82	Mutante nulo com deleção do genes CV_1485-84-83-82	Este trabalho
Δ CV_1485-84-83- 82/1486::pNPT	Mutante nulo com deleção do genes CV_1485-84-83-82 e inserção do vetor pNPTS138 no gene CV_1486	Este trabalho
Δ CV_1491	Mutante nulo com deleção do gene CV_1491	Este trabalho
Δ CV_2230	Mutante nulo com deleção do gene CV_2230	Este trabalho
Δ CV_2230/1491	Mutante nulo com deleção do genes CV_1491 e CV_2230	Este trabalho
1B14	Mutante por inserção de transposon no gene CV_1057	Este trabalho

1A15	Mutante por inserção de transposon no gene CV_3542	Este trabalho
Plasmídeos	Características*	Origem/Referência
pNPTS138	Vetor suicida para mutagenese, Can ^r	M.R.K. Alley
pIT2	Vetor contendo o transposon IS/acZ/hah, Tet ^r , Amp ^r	JACOBS <i>et al.</i> , 2003

*Abreviaturas: Can, canamicina; Tet, tetraciclina; Amp, ampicilina; r, resistência

3.2. Meios de cultura e condições de cultivo

As linhagens de *E. coli* DH5 α (clonagem), S17-1 (conjugação) e SM10 λ pir (conjugação do transposon) foram cultivadas a 37 °C, em meio rico Luria-Bertani (LB) e suplementadas com canamicina (50 μ g/ml), tetraciclina (12 μ g/ml) e ampicilina (100 μ g/ml), quando necessário. As linhagens de *C. violaceum* (Tabela 1) foram cultivadas a 37 °C em meio LB e em meio mínimo M9 (SAMBROOK e RUSSELL, 2001) modificado com adição de 0,1% de hidrolisado de caseína (M9HC), e suplementadas com os antibióticos canamicina (50 μ g/ml) e tetraciclina (10 μ g/ml), quando necessário. Em condições de carência de ferro o meio LB foi suplementado com 150 μ M e 200 μ M de 2,2'-Dipyridyl (DP, Sigma), um quelante de alta afinidade ao ferro, e o meio M9HC foi suplementado com 50 μ M de DP. Já em condições de suficiência de ferro foram adicionados 250 μ M de FeSO₄ (Sigma) aos meio LB e M9HC.

3.3. Análises *in silico*

Foi realizada uma análise *in silico* do genoma completo de *C. violaceum* ATCC 12472 com a ferramenta antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) para identificar os genes relacionados com a produção de metabólitos secundários nesta bactéria.

3.4. Procedimentos gerais de clonagem

3.4.1. Reações de PCR

Os fragmentos dos genes de interesse para as clonagens foram amplificados por PCR com enzima de alta fidelidade. Utilizou-se em cada reação: 0,5 μ l do DNA molde (DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472), 0,5 μ l de cada oligonucleotídeo a 50 μ M (Tabela 2), 1,0 μ l de dNTP mix a 10 mM, 10 μ l de 5x Phusion HF Buffer, 0,3 μ l de Phusion DNA polimerase (Thermo Scientific), 1,5 μ l de DMSO e água mili-Q para um volume final de 50 μ l. Esse PCR foi feito nas seguintes condições: 98 °C por 3

minutos; 30 ciclos compostos por 3 etapas cada ciclo (98 °C por 10 segundos, 63 °C por 30 segundos e 72 °C por 23 segundos); 72 °C por 5 minutos e resfriamento a 4 °C. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1% e 0,8%. As bandas foram recortadas e recuperadas do gel, seguindo protocolo do kit Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega). O PCR de colônia para confirmação das clonagens ou confirmação dos mutantes de *C. violaceum* foi feito como descrito acima, com as seguintes diferenças: as colônias bacterianas foram utilizadas diretamente como molde de DNA e foi utilizada uma Taq DNA polimerase comum (Thermo Scientific).

3.4.2. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Os produtos das reações de PCR e os plasmídeos utilizados para as clonagens foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas (Tabela 2) em tampão fornecido pelo fabricante (Thermo Scientific) por 2 ou 3 horas, dependendo da enzima, a 37 °C. As digestões foram purificadas usando o kit Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega) e analisadas em gel de agarose 1% ou 0,8%.

3.4.3. Ligação de DNA e transformação por eletroporação

A ligação dos insertos nos vetores digeridos com as enzimas de restrição apropriadas foi feita usando a enzima T4 DNA ligase (Biolabs) em tampão apropriado, por 16 horas a 16 °C. A ligação (3 µl) foi transformada em *E. coli* DH5α (40 µl de células) por eletroporação em cubetas de 0,2 cm (Biorad), usando os seguintes parâmetros: 2500 V, 200 Ω, 25 µF. Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 600 µl de meio LB por 1 hora sob agitação e espalhadas em placas de meio LB suplementado com antibiótico adequado. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

3.4.4. Sequenciamento de DNA

As reações foram feitas utilizando o kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems), com oligonucleotídeos adequados, conforme protocolo do fabricante. A precipitação das reações foi feita com isopropanol 62,5% final e a lavagem com etanol 70%. Os sequenciamentos foram feitos no ABI 3500XL do Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para obtenção e confirmação de mutantes

Nome	Sequência 5'→3'	Descrição
CV_1486-del1	cctagc <u>gggccc</u> gttcgaatcgctgatggtgg	Fragmento <i>Apal/HindIII</i> 664 pb, mutação do gene CV_1486
CV_1486-del2	ggcctaaagcttctcggtcatgaggatgtctg	
CV_1486-del3	cctagcaagcttctggattgcgaccacttcgg	Fragmento <i>HindIII/EcoRI</i> 702 pb, mutação do gene CV_1486
CV_1486-del4	ggcctagaattccgaattgctcgatggcctgg	
CV_1491-del1	cctagc <u>gggccc</u> gtttccaggatcagccgcc	Fragmento <i>Apal/HindIII</i> 743 pb, mutação do gene CV_1491
CV_1491-del2	ggcctaaagcttcagcatggccaggcggaag	
CV_1491-del3	cctagcaagcttggcaagtctaaaccccgcg	Fragmento <i>HindIII/BamHI</i> 663 pb, mutação do gene CV_1491
CV_1491-del4	ggcctaggatcccgtaggtctgcgggtccag	
Operon_1485-del1	cctagcaagcttcattgatggacagctacccg	Fragmento <i>HindIII/BamHI</i> 673 pb, mutação dos genes CV_1485-84-83-82
Operon_1485-del2	ggcctaaggatccggtgtgcatgattgcgctcc	
Operon_1485-del3	cctagcggatcccacgtcacgatgcaggacat	Fragmento <i>BamHI/EcoRI</i> 664 pb, mutação dos genes CV_1485-84-83-82
Operon_1485-del4	ggcctagaattccagctatagaggtcggccag	
CV_2230-del1	cctagcaagcttgatcggagatggcctgtcc	Fragmento <i>HindIII/PstI</i> 721 pb, mutação do gene CV_2230
CV_2230-del2	ggccta <u>ctgcag</u> cagggcatcgtgtttgcgg	
CV_2230-del3	cctagc <u>ctgcag</u> tgatcggccttcgtctttg	Fragmento <i>PstI/EcoRI</i> 649 pb, mutação do gene CV_2230
CV_2230-del4	ggcctagaattcgattggctgatgcgcgtgc	
CV_1486Mut_FW	cctagcaagcttcgcatttcgtctccagcgcc	Fragmento <i>HindIII/BamHI</i> 627 pb, mutação por inserção no gene CV_1486
CV_1486Mut_RV	cgctaggatccgcgcgtccaacgtcacgaag	
CV_1486Conf	ctacctgctctacacctc	Confirmar a inserção do vetor pNPT no gene
CV_2233Mut_FW	cctagcaagcttaccggctggcctacatgatc	Fragmento <i>HindIII/BamHI</i> 753 pb, mutação por inserção no gene CV_2233
CV_2233Mut_RV	ggcctaggatccccatctggccatgggcgttc	
CV_2233Conf	ctgtgcctggatgatggc	Confirmar a inserção do vetor pNPT no gene

M13_FW	gtaaaacgacggccagt	Confirmar a inserção do vetor pNPT no gene e sequenciamento das clonagens.
M13_RV	agcggataacaatttcac	Sequenciamento das clonagens.

A região sublinhada indica os sítios das enzimas de restrição.

3.5. Construção das linhagens mutantes em *C. violaceum*

As linhagens mutantes foram obtidas por deleção (troca alélica) ou inserção de vetor (recombinação homóloga simples) em genes específicos de interesse, ou ainda pelo uso de transposon com inserção aleatória no genoma.

3.5.1. Construção de mutantes nulos por troca alélica

Para obtenção de mutantes nulos (Figura 5), as regiões flangeadoras dos genes de interesse (CV_1486, CV_1485-84-83-82, CV_1491 e CV_2230) foram amplificadas por meio da técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos identificados como del1/del2 e del3/del4 (Tabela 2). Os produtos obtidos foram digeridos com uma enzima de restrição interna comum (sítios de restrição em del2/del3), e cada par de fragmentos foi ligado com a enzima T4 DNA ligase e usado como molde em reação de PCR com os oligonucleotídeos del1/del4 (Tabela 2). O fragmento completo, contendo as regiões flangeadoras unidas, foi digerido na região externa (sítios de restrição em del1/del4), assim como o vetor pNPTS138, com as enzimas de restrição indicadas na Tabela 2. Em seguida, foi feita a ligação, transformação e confirmação da clonagem, conforme descrito acima. Os vetores com os insertos clonados foram extraídos por meio do kit Wizard plus SV Minipreps DNA purification System (Promega). A sequência correta dos insertos foi verificada por sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos del1, del4, M13_FW e M13_RV (Tabela 2).

As construções finais no vetor pNPTS138 foram transformadas em *E. coli* S17-1 por eletroporação e transferidas para *C. violaceum* por conjugação. Após 24 horas em placa LB, as conjugações foram espalhadas em placas LB com ampicilina (100 µg/ml) e canamicina (50 µg/ml) para a seleção da primeira recombinação homóloga (inserção do vetor no genoma) (Figura 5). Colônias transconjugantes de *C. violaceum*, confirmadas por PCR de colônia, foram cultivadas em meio LB líquido por 48 horas em agitação de 250 rpm à 37 °C para que ocorresse a segunda recombinação homóloga (Figura 5). Para selecionar as bactérias nas quais ocorreu o evento de

segunda recombinação homóloga foi feita a seleção em placas LB com 12% de sacarose, uma vez que o vetor pNPTS138 possui o gene *sacB*, o qual codifica uma enzima que metaboliza a sacarose em um produto tóxico para as bactérias que apresentam a integração do vetor. As colônias resistentes à sacarose foram testadas para sensibilidade a canamicina (50 µg/ml). Nas colônias sensíveis a canamicina, a segunda recombinação homóloga pode ter ocorrido de duas maneiras, resultando na reversão ao genótipo selvagem (linha contínua), ou na deleção do gene de interesse (linha tracejada, Figura 5). A confirmação dos mutantes foi feita por PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos del1 e del4 de cada gene (Tabela 2). As linhagens mutantes foram congeladas em 20% de glicerol no freezer -80 °C.

Figura 5: Esquema para obtenção dos mutantes nulos. As regiões flanqueadoras do gene a ser deletado, clonadas no vetor suicida pNPTS138, permitem a inserção por recombinação homóloga da construção inteira no genoma da *C. violaceum* ATCC 12472 (primeira recombinação homóloga). Por meio de eventos de recombinação homóloga intragênica pode ocorrer ou reversão para a linhagem selvagem (linha contínua) ou deleção do gene de interesse (linha tracejada), gerando a linhagem mutante (eventos de segunda recombinação homóloga). Os oligonucleotídeos indicados (del1 a del4) foram utilizados para clonagem dos fragmentos e confirmação dos mutantes (par del1/del4).

3.5.2. Construção de mutantes por inserção

Foram feitas construções de mutantes pela inserção do vetor pNPTS138, interrompendo a região codificadora dos genes de interesse. Por meio de PCR, um fragmento contendo a região interna dos genes de duas NRPSs (CV_1486 e CV_2233) foi amplificado usando oligonucleotídeos identificados na Tabela 2. Esses fragmentos e o vetor pNPTS138 foram digeridos com as enzimas indicadas (Tabela 2). Em seguida, foi feita a ligação, transformação, confirmação da clonagem por meio de PCR de colônia e extração do DNA plasmidial como descrito acima.

As construções finais no vetor pNPTS138 foram transferidas para *C. violaceum* por conjugação. Colônias transconjugantes de *C. violaceum* resistentes a canamicina resultam de inserção do vetor dentro do gene a ser interrompido por recombinação homóloga (Figura 6). A inserção do vetor foi confirmada por PCR de colônia utilizando um oligonucleotídeo dentro do vetor (M13_FW) e outro encontrado no gene de interesse fora da região de recombinação (Tabela 2; Figura 6). Após confirmação da inserção do vetor, as linhagens mutantes foram congeladas em 20% de glicerol no freezer -80 °C. Os mutantes duplos de deleção e deleção/inserção foram obtidos por repetição sequencial destes procedimentos.

Figura 6: Esquema para obtenção dos mutantes por inserção. Após a clonagem no vetor pNPTS138 de uma região interna do gene de interesse a ser interrompido (verde), a construção inteira é inserida por recombinação homóloga, causando interrupção e inativação do gene. As setas indicam a posição dos oligonucleotídeos utilizados para confirmar a inserção específica do vetor no gene de interesse.

3.5.3. Obtenção de mutantes por transposição

Para a obtenção de mutantes de transposon em *C. violaceum* foi utilizado o transposon IS/*lacZ*/hah (T8) presente no plasmídeo pIT2 (JACOBS *et al.*, 2003), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Rodrigo Galhardo (ICB-USP). Este plasmídeo conjugativo, mobilizável a partir da linhagem de *E. coli* SM10 λ pir, contém em sua sequência o gene da transposase, um gene de resistência a ampicilina e o transposon IS/*lacZ*/hah (T8), o qual apresenta uma marca de resistência a tetraciclina e o gene *lacZ* sem promotor (Figura 7). Como a *E. coli* SM10pir λ contendo pIT2 é resistente a ampicilina, o antibiótico utilizado para selecionar a *C. violaceum* nas conjugações, foi necessário selecionar um mutante espontâneo de *C. violaceum* resiste a ácido nalidíxico. Para isto, a *C. violaceum* selvagem ATCC 12472 foi cultivada em LB e plaqueada em concentrações crescentes de ácido nalidíxico (4, 8, 16, 32, 64 μ g/ml). As colônias selecionadas foram sequenciadas para mutações no gene *gyrA* utilizando oligonucleotídeos para região QRDR deste gene (Tabela 3). Assim, foi selecionada uma linhagem mutante, chamada de CVNAL, que é resistente a ácido nalidíxico devido a uma mutação pontual no gene *gyrA* (Tabela 1).

Figura 7: Mapa do vetor pIT2 contendo o transposon IS/*lacZ*/hah (T8). Os genes de resistência a ampicilina (*bla*, em vermelho) e da enzima transposase (em amarelo) localizam-se fora do transposon. A sequência do transposon T8 de 6.162 pb, delimitada pelas regiões de reconhecimento da transposase (ME), contém um gene de resistência a tetraciclina (*tet*, em verde) e um gene repórter sem promotor (*lacZ*, em azul), além de sítios loxP.

Assim, a *E. coli* SM10λpir contendo pIT2 foi conjugada com a CVNAL, usando uma proporção de 2:1 da receptora para a doadora. Após 24h em placa LB, a conjugação foi espalhada em placas LB suplementadas com ácido nalidíxico (20 µg/ml) e tetraciclina (10 µg/ml). As colônias de *C. violaceum* selecionadas foram então cultivadas em 100 µl de meio LB com ácido nalidíxico (20 µg/ml) e tetraciclina (10 µg/ml) em placas de 96 poços por 24h a 37 °C sem agitação. As bactérias nestas placas foram congeladas no freezer -80 °C, após adição de 20% de glicerol, para posterior varredura dos mutantes quanto a produção de sideróforos.

Para confirmar a inserção do transposon no genoma de *C. violaceum* foi feito o PCR de colônias selecionadas utilizando os oligonucleotídeos na região do gene de resistência a tetraciclina (Tabela 3, Figura 7), além da verificação da presença ou ausência do plasmídeo pIT2 replicativo nestas colônias, por meio de extração de DNA com o kit wizard plus SV Minipreps DNA purification System (Promega).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nos mutantes de transposon

Nome	Sequência 5'→3'	Descrição*
GyrA-QRDR-FW	atgaccgataacctgttcgcc	Fragmento de 419 pb utilizado para sequenciar a região QRDR do gene <i>gyrA</i> de <i>C. violaceum</i>
GyrA-QRDR-RV	atgtcggccaacagctcgtg	
ISTet_FW	tggacagcatggcctgcaac	Fragmento de 560 pb no gene de resistência a tetraciclina para confirmar a presença do transposon
ISTet_RV	tttcggcgtgggtatggtgg	
CEKG2A	ggccacgcgtcgactagtagtacnnnnnnnnnnagag	Oligonucleotídeos randômicos utilizados na identificação do sítio de inserção do transposon
CEKG2B	ggccacgcgtcgactagtagtacnnnnnnnnnnacgcc	
CEKG2C	ggccacgcgtcgactagtagtacnnnnnnnnnnngatat	
CEKG4	ggccacgcgtcgactagtagtac	
<i>lacZ</i> -211	tgcgggcctcttcgctatta	Oligo ancorado utilizado para identificação do sítio de inserção do transposon
<i>lacZ</i> -148	gggtaacgccagggttttcc	Oligo localizado dentro do transposon utilizado para identificação do sítio de inserção do transposon

3.5.3.1 Confirmação dos mutantes de transposição por Southern Blot

Para verificar se a inserção do transposon ocorreu de forma aleatória no genoma de *C. violaceum* foi realizado o ensaio de Southern Blot. Para isso, foi feita extração de DNA genômico da linhagem CVNAL e de alguns mutantes de transposon congelados. Após cultivo em 5 ml de meio LB até uma DO_{600nm} de 2, as células foram lisadas, os sobrenadantes foram tratados com clorofórmio e o DNA foi precipitado e lavado com etanol (CHEN e KUO, 1993), seguido de digestão com a enzima *EcoRI*. Os fragmentos foram separados em um gel de agarose 0,8%. Após a corrida, o gel foi lavado em água destilada e colocado em uma solução desnaturante por 45 minutos e depois em uma solução neutralizante por 40 minutos. A transferência do DNA para a membrana de nylon foi feita por capilaridade (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A sonda utilizada para hibridização, que compreende um fragmento interno do gene de resistência a tetraciclina, foi amplificada por PCR com os oligonucleotídeos específicos (Tabela 3). Este produto de PCR (25 ng) foi usado para marcar a sonda com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (PerkinElmer) com o kit Exo-Klenow enzyme DECAprime II (Ambion). A membrana foi pré-hibridizada em 10 ml de ULTRAhyb (Ambion) a 42 °C por 30 minutos e incubada com a sonda marcada a 42°C por 16 h. A membrana foi lavada duas vezes a 42°C por 5 minutos em 2 x SSC com 0,1% SDS e duas vezes a 42°C por 15 minutos em 0,1 x SSC com 0,1% SDS. Após as lavagens a membrana foi seca e exposta em hyperfilm ECL (Amersham).

3.5.3.2. Identificação do sítio de inserção do transposon

A identificação do sítio de inserção do transposon foi realizada como descrito por Jacobs *et al* (2003), por meio de PCR semi-degenerado de dois estágios e reação de sequenciamento. Em uma primeira reação de PCR foi utilizado o seguinte protocolo: 1 µl de 10x Taq buffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 µl de 10 mM dNTPs mix; 1,5 µl de MgCl_2 10 mM; 0,5 µl do oligonucleotídeo *lacZ*-211 a 10 pmol/µl (esse oligonucleotídeo irá parear dentro do transposon no gene *lacZ*) e 0,17 µl de cada um dos oligonucleotídeos semi-degenerados (CEKG2A, CKEG2B e CKEG2C) a 10 pmol/µl (Tabela 3); 5,7 µl de água miliQ, 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Thermo Scientific) e 0,5 µl das colônias para serem usadas como molde. Esse PCR foi feito nas seguintes condições: 94 °C por 12 minutos; 6 ciclos compostos por 3 etapas (94 °C por 30 segundos, 42 °C por 30 segundos, caindo a temperatura um grau por ciclo, e a 72 °C por 3 minutos); após esses 6 ciclos foram feitos 25 ciclos compostos por 3 etapas (94

°C por 30 segundos, 64 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos); e 72 °C por 7 minutos. Após esta amplificação, foi feita uma segunda reação de PCR com o mesmo protocolo, mas utilizando um oligonucleotídeo dentro do transposon chamado de *lacZ*-148, que se encontra *downstream* ao *lacZ*-211, juntamente com um oligonucleotídeo que apresenta uma sequência ancorada aos oligonucleotídeos semi-degenerados (CEKG4, Tabela 3) e como molde foi usado o produto da primeira reação de amplificação. A reação foi feita nas seguintes condições: 94 °C por 10 minutos, 30 ciclos de 3 etapas (94 °C por 30 segundos, 64 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos); 72 °C por 7 minutos. Os produtos da segunda reação foram submetidos ao tratamento com Exonuclease I (Thermo Scientific) e fosfatase alcalina de camarão (Thermo Scientific) e então utilizados como molde para a reação de sequenciamento com o oligonucleotídeo *lacZ*-148, utilizando o kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems), conforme descrito acima.

3.6. Extração de RNA e Northern Blot

Foi feito pré-inóculo com a linhagem *C. violaceum* ATCC 12472 em 5 ml de LB. Dessa cultura de 24 horas foi feito inóculo em 50 ml de LB diluindo a cultura para DO_{600nm} de 0,01; essa cultura foi mantida sob agitação até atingir DO_{600nm} de 0,6; 2,0; 5,0 e 7,0. Em cada ponto foram coletados 4,5 ml da cultura para extração do RNA, tanto destas sem tratamento, quanto das mesmas tratadas com 200 µM de DP por 30 minutos, para estabelecer uma situação de carência de ferro. As culturas coletadas foram submetidas a centrifugação a 16000 x g por 1 minuto e os pellets foram ressuspensos em 1 ml de Trizol (Invitrogen). Os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos e em seguida foram adicionados 200 µl de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada, invertendo os tubos por 15 segundos, e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 12000 x g a 4°C, a fase aquosa foi coletada e o RNA foi purificado usando o kit illustra RNAspin Mini, conforme recomendação do fabricante (GE Healthcare). As sondas, que compreendem um fragmento interno dos genes CV_1486 e CV_2233, foram amplificadas por PCR com os oligonucleotídeos específicos (oligonucleotídeos utilizados para construir os mutantes de inserção, Tabela 2). Estes produtos de PCR (25 ng) foram usados para marcar as sondas com [α -³²P]-dCTP (PerkinElmer) com o kit Exo-Klenow enzyme DECAprime II (Ambion). Os RNAs foram separados em gel desnaturante de agarose 1,2%, com formaldeído, e sua transferência para a membrana de nylon foi realizada

por capilaridade. Após fixação com UV, as membranas foram pré-hibridizadas em 10 ml de ULTRAhyb (Ambion) a 42 °C por 30 minutos e incubadas com as sondas marcadas a 42 °C por 16 horas. As membranas foram lavadas duas vezes a 42°C por 5 minutos em 2 x SSC com 0,1% SDS e duas vezes a 42°C por 15 minutos em 0,1 x SSC com 0,1% SDS. Após as lavagens, as membranas foram secas e expostas em hyperfilm ECL (Amersham).

3.7. Ensaios fenotípicos em carência ou suficiência de ferro

3.7.1. Curvas de crescimento

Para avaliar o crescimento das linhagens mutantes ao longo do tempo foram feitas curvas de crescimento. Para realizar esse experimento as linhagens selvagem e mutantes foram retiradas do freezer em placas LB e foi feito um pré-inóculo em 2 ml de LB líquido mantido a 37 °C em uma agitação de 250 rpm por 24h. Em seguida, foi feita a diluição desses pré-inóculos em 20 ml de meio LB para uma DO_{600nm} de 0,01. Essas culturas foram então mantidas a 37 °C sob agitação de 250 rpm e a DO_{600nm} foi medida em espectrofotômetro de uma em uma hora por oito pontos e também nos pontos de 24 e 48 horas. As curvas de crescimento também foram realizadas com todas as linhagens no meio M9HC. Para estabelecer uma condição de carência de ferro, foram feitas curvas de crescimento da linhagem selvagem com adição de diferentes concentrações de DP (100, 150, 200, 250 e 300 μM) ao meio LB.

3.7.2. Ensaios de viabilidade

Para esse ensaio foram feitos pré-inóculos em 2 ml de meio LB das linhagens mutantes e selvagem, os quais foram mantidos a 37 °C em uma agitação de 250 rpm por 24h. Em seguida, as culturas foram diluídas para uma DO_{600nm} de 0,01 em 5 ml de LB e mantidas nas mesmas condições de cultivo por 20h. Após as 20 horas, essas culturas (2 ml) foram centrifugadas a 13000 rpm por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 ml de PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*). Após diluição seriada em PBS, um volume de 100 μl das diluições de 10^{-7} foi plaqueado em LB em triplicata. As placas foram mantidas a 37 °C por 24h para contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

3.8. Caracterização da produção de sideróforos em *C. violaceum*

3.8.1. Ensaios de CAS

Para verificar se *C. violaceum* produz sideróforos foi utilizado o ensaio universal Cromo Azurol S (ensaio CAS), no qual a presença de sideróforos é detectada pela mudança da cor do meio de azul para laranja. A cor azul na solução *blue dye* resulta do complexo formado pelo Cromo azurol S (Sigma), cloreto férrico (Sigma) e HDTMA (*Hexadecyltrimethylammonium bromide*, Sigma), sendo que a cor muda para laranja quando o ferro é quelado pelo sideróforo (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Como *C. violaceum* apresentou deficiência em crescer em placas CAS convencionais tendo o meio mínimo MM9 como base (SCHWYN; NEILANDS, 1987), este foi substituído pelo meio peptona sacarose ágar (PSA, *Peptone-Sucrose Agar*), como descrito para *Xanthomonas oryzae* (CHATTERJEE e SONTI, 2002; PANDEY e SONTI, 2010). Assim, 60 ml do meio PSA foi misturado com 7,2 ml da solução *blue dye* para a realização do ensaio de CAS neste trabalho. Todas as linhagens bacterianas foram cultivadas nestas placas CAS para verificar a produção de sideróforos (halos laranja).

3.8.2. Ensaios de utilização de sideróforo

A utilização de sideróforos endógenos foi verificada por ensaios de zona de estimulação de crescimento em disco (JIN *et al.*, 2006; BURNSIDE *et al.*, 2015). Nestes ensaios, as linhagens de *C. violaceum* selvagem ou mutantes (ΔCV_1491 , ΔCV_2230 , $\Delta CV_2230/1491$) foram cultivadas em LB até uma DO_{600nm} entre 0,6 e 0,7 e semeadas com *swab* em placas LB contendo 150 μM de DP. Sobre estas culturas foram adicionados discos de papel impregnados com sobrenadantes filtrados de culturas das diferentes linhagens testadas cultivadas em meio M9HC por 48h. Crescimento em torno do disco indica a capacidade de utilizar o sideróforo presente no sobrenadante, que liga o ferro do meio com mais afinidade que o quelante.

3.8.3. Ensaios de utilização de xenosideróforos

A utilização de xenosideróforos por *C. violaceum* foi verificada por ensaios de zona de estimulação de crescimento em que as linhagens de *C. violaceum* foram embebidas no ágar e as bactérias produtoras de sideróforos foram colocadas na superfície (WYCKOFF *et al.*, 2015; BALHESTEROS *et al.*, 2016). Um volume de 20 μl de culturas de 24h em LB das linhagens mutantes de *C. violaceum* ($\Delta CV_1486/2233::pNPT$, ΔCV_1491 , ΔCV_2230 e $\Delta CV_2230/1491$) foi embebido em LB ágar com 200 μM de DP. Após a solidificação desse meio, 10 μl de culturas de 24h em LB das bactérias testadas para produção de xenosideróforos foram adicionados a

superfície do ágar. As placas foram mantidas a 37 °C para análise da estimulação do crescimento das linhagens embebidas de *C. violaceum*. As bactérias produtoras de sideróforos testadas foram *E. coli* (enterobactina), *Salmonella sp* (salmoquelina), *P. aeruginosa* (pioverdina e pioquelina) e *Staphylococcus aureus* (estafiloferina A).

3.9. Purificação e caracterização de sideróforos produzidos por *C. violaceum*

A partir do sobrenadante de culturas de diferentes linhagens de *C. violaceum* foi feita a tentativa de isolar os sideróforos produzidos por esta bactéria. Para isso, as linhagens selvagem e mutantes foram cultivadas em 50 ml de meio M9HC por 48h, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante foi filtrado. Esse sobrenadante foi misturado em um balão volumétrico com o solvente acetato de etila na proporção de 3:1. Após partição por três vezes da fase aquosa com o solvente, a fase orgânica foi seca e a massa deste extrato foi quantificada por pesagem em balança analítica. Os extratos foram analisados em HPLC analítico (sistema Shimadzu), utilizando cromatógrafo acoplado a duas bombas modelo Nexera XR LC-20AD, sistema de controle CBM-20A, detectores DAD SPD-M20A e ELSD-LTII, injetor automático Nexera SIL-20A, forno CTO-20A e software LabSolution. Utilizou-se coluna Ascentis Express Phenyl-Hexyl, 10 cm x 4,6 mm, 2,7 µm, com gradientes compostos por Acetonitrila (ACN):H₂O, iniciando com 10% de ACN, chegando a 100% em 20 min, permanecendo em 100% até 30 min, voltando a 10% em 32 min, e permanecendo em 10% até 37 min para estabilização da coluna. Este ensaio foi realizado em colaboração com a Profa. Mônica T. Pupo e sua aluna Taise Fukuda (FCFRP-USP).

3.10. Papel dos sideróforos na patogênese de *C. violaceum*

3.10.1. Ensaio de virulência

Para verificar se a captação de ferro por sideróforos desempenha papel na patogênese de *C. violaceum* foram realizados ensaios de virulência em camundongos, utilizando as linhagens mutantes, conforme descrito (MIKI *et al.*, 2010). Para isso, as linhagens bacterianas foram cultivadas em 5 ml de meio LB a 37 °C em uma agitação de 250 rpm por 20h. Após diluição seriada dessas culturas em PBS, a diluição 10⁻³, contendo uma dose de 10⁶ UFC, foi injetada por via intraperitoneal em camundongos fêmeas da linhagem BALB/c de 5-6 semanas de vida. A sobrevivência dos animais infectados foi acompanhada por uma semana. Para verificar se a dose injetada estava correta, foi feito plaqueamento de 100 µl da diluição 10⁻⁷ em meio LB para contagem

das UFCs após 24h das placas mantidas em estufa a 37 °C. Todos os experimentos com camundongos foram realizados no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP, de acordo com protocolo de ética animal 151/2016 aprovado pela CEUA da FMRP-USP.

3.10.2. Ensaio da carga bacteriana em órgãos

Além das curvas de morte dos animais, também foi avaliada a carga bacteriana no fígado dos camundongos, conforme descrito (MIKI *et al.*, 2010). Os camundongos foram infectados como descrito acima (10^6 UFC), e após 16h de infecção, os animais foram sacrificados e os fígados foram coletados assepticamente em tubos contendo PBS. Após a pesagem desses órgãos, eles foram homogeneizados em PBS, e em seguida 100 µl do homogenato foi colocado em uma placa de 96 poços e foram feitas diluições seriadas (diluição até 10^{-4}). Um volume de 10 µl das diluições foi plaqueado em meio LB para posterior contagem das UFCs.

3.10.3. Ensaio de produção de NET por neutrófilos *in vitro*

Para verificar a produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET, do inglês *Neutrophil Extracellular Trap*) durante a infecção por *C. violaceum* foram feitos ensaios de infecção *in vitro* em neutrófilos. Os neutrófilos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c após 6 horas da injeção de 2 ml de tioglicolato neste local. Para a coleta, os camundongos foram sacrificados e 5 ml de meio HBSS 1x foi adicionado na cavidade peritoneal, seguido de massagem na região. O lavado peritoneal foi então centrifugado por 10 minutos a 350 g a 30 °C e as células sedimentadas foram ressuspensas em 3 ml de HBSS 1X com adição de soro fetal bovino a 2%. As células foram contadas em câmara de Neubauer e analisadas quanto a morfologia celular. A infecção dos neutrófilos com as diferentes linhagens de *C. violaceum* cultivadas em meio LB por 20h foi feita com um MOI de 10:1 (10^6 bactérias para 10^5 neutrófilos por poço), mantendo as placas de 96 poços a 37 °C em estufa com CO₂ por 3h. Para a quantificação da produção de NET, foi adicionado às placas 1 µM de Sytox (Invitrogen), um corante que não entra em células vivas, e a quantificação de fluorescência decorrente da presença de DNA extracelular foi feita pela leitura no equipamento SpectraMax i3x (Molecular Devices). Os resultados foram analisados no software SoftMax Pro 6.4. Este ensaio foi realizado em colaboração com a Profa. Maria Cristina R. Barreira e o Dr. Rafael Ricci de Azevedo (FMRP-USP).

4. RESULTADOS

4.1. Análise *in silico* de vias de síntese de metabólitos secundários de *C. violaceum*

Para verificar quais metabólitos secundários são potencialmente produzidos por *C. violaceum*, realizamos uma análise *in silico* do genoma completo da linhagem ATCC 12472 com a ferramenta antiSMASH (WEBER *et al.*, 2015). Por meio desta análise foram encontrados sete *clusters* de genes relacionados com a síntese de metabólitos secundários (Figura 8). Dois destes *clusters* estão envolvidos na produção de metabólitos de *C. violaceum* já conhecidos: os genes da síntese de violaceína (operon *vioABCDE*), um pigmento roxo microbida; o gene para a produção de homoserina lactona (*cviI*), a molécula envolvida na ativação do *quorum sensing* de *C. violaceum* via regulador CviR (DURAN *et al.*, 2016). Outros dois *clusters* possuem genes envolvidos na possível produção de terpenos, moléculas de importância comercial e com aplicações medicinais, e na produção de bacteriocinas, moléculas de natureza proteica ou peptídica com atividade antibacteriana produzidas por bactérias. Os três outros *clusters* possuem genes que codificam enzimas modulares NRPSs (Figura 8A), geralmente envolvidas na síntese de antibióticos e sideróforos (SINGH *et al.*, 2017).

Um dos *cluster* de NRPS apresenta duas dessas enzimas, aqui chamadas de NRPS3 e NRPS4 (CV_2802 e CV_2803; Figura 8A). Ambas NRPSs apresentam três módulos, com cada módulo sendo formado por domínios de condensação, adenilação e tiolação (Figura 8B). Isto sugere que haverá a adição pelo menos três aminoácidos diferentes por enzima, uma vez que é o domínio de adenilação que seleciona o aminoácido a ser incorporado pela enzima. Como apenas a NRPS3 (CV_2802) apresenta um domínio de tioesterase, isso sugere que as duas enzimas estão produzindo o mesmo metabólito juntas, uma vez que esse domínio é necessário para a liberação do peptídeo formado. Em uma análise com o programa NRPSPredictor3 da ferramenta antiSMASH, que faz predição a partir dos domínios de adenilação de quais aminoácidos podem estar sendo adicionados, encontramos que CV_2803 deve incorporar uma serina e uma valina, enquanto CV_2802 poderia adicionar uma treonina, uma valina e uma leucina. Portanto, estas análises *in silico* sugerem que as

enzimas NRPS3 e NRPS4 devem produzir um único metabólito secundário constituído de diferentes aminoácidos cuja estrutura e função permanecem por ser estudadas.

Figura 8. Análise *in silico* de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários. A. Sete *clusters* gênicos no genoma de *C. violaceum* codificando enzimas para a síntese de metabólitos secundários foram encontrados usando a plataforma antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Estes *clusters* são anotados como NRPS, produção de terpenos, síntese de violaceína, produção de bacteriocinas e síntese de homoserina lactona. Os dois primeiros *clusters* de NRPSs contêm genes que codificam sistemas de transporte de ferro. B. Arquitetura de domínios das enzimas NRPS1 (CV_1486), NRPS2 (CV_2233), NRPS3 (CV_2802) e NRPS4 (CV_2803), destacando os domínios de condensação, adenilação, epimerização, tiolação e tioesterase.

Já os outros dois *clusters* gênicos de NRPSs, aqui chamados NRPS1 e NRPS2, apresentaram similaridade com genes envolvidos na produção de sideróforos: NRPS1 apresenta 30% de similaridade com os genes da síntese de turnerbactina e NRPS2 apresenta 21% de similaridade com os genes da síntese do mirubactina. Também observamos que os genes que codificam estas duas NRPSs (CV_1486 e CV_2233)

estão próximos a genes envolvidos com a captação de ferro, como receptores dependentes de TonB e transportadores do tipo ABC (Figura 8A). No entanto, essas duas NRPSs e seus *clusters* gênicos apresentam diferenças (Figura 8). A NRPS1 (CV_1486, EntF) é formada por apenas um módulo, contendo domínios de condensação, adenilação, tiolação e tioesterase (Figura 8B), apresentando assim a adição de apenas um tipo de aminoácido, que de acordo com análise pelo NRPSPredictor3 poderia ser uma lisina. Neste *cluster* temos a presença de genes anotados como o operon *entCEBA*, que está relacionado com a produção de sideróforos do tipo catecolato, sendo a EntE formada apenas de um domínio de adenilação que faria a adição do precursor 2,3-DHBA ao sideróforo.

Já a NRPS2 (CV_2233) é formada por dois módulos, cada um contendo domínios de condensação, adenilação e tiolação, além de um domínio de epimerização (conversão de L para D-aminoácido) e um domínio de tioesterase. Os aminoácidos preditos a serem adicionados pelos domínios de adenilação dessa enzima são uma ornitina e uma serina. Neste *cluster* temos a presença de uma enzima esterase, que está relacionada com a dissociação do complexo ferro-sideróforo (*fes*). Observando a organização dos genes de cada um dos *clusters* NRPS1 e NRPS2 e a arquitetura dos domínios destas enzimas NRPSs (Figura 8), podemos observar uma semelhança com o arranjo visto nos genes e na modularidade das enzimas da síntese do enterobactina e crisobactina (Figura 1), respectivamente. Portanto, estas análises sugerem que os *clusters* gênicos biossintéticos NRPS1 e NRPS2 devem estar relacionados com a produção de sideróforos por *C. violaceum* (via enzimas NRPS1 e NRPS2) e com a captação destas moléculas em situação de limitação de ferro (via sistemas transportadores).

4.2. Construção das linhagens mutantes para genes de produção e captação de sideróforos em *C. violaceum*

Após a análise *in silico* foi feita a seleção dos genes possivelmente envolvidos na síntese e na captação de sideróforo, para que então fosse feita a mutação desses genes. Para as vias de síntese foram selecionadas as enzimas NRPS1 e NRPS2 (CV_1486 e CV_2233) e o operon *entCEBA* (CV_1485-84-83-82). Já para os genes envolvidos na captação de ferro via sideróforo foram selecionados os dois RDTBs (CV_1491 e CV_2230). Assim, os genes escolhidos estão todos presentes nos *clusters* NRPS1 e NRPS2 (Figura 8A). Para os genes CV_1486, CV_1491, CV_2230

e o operon CV_1485-84-83-82 foi feita a construção de mutantes nulos por meio de dupla recombinação homóloga, de modo que nas linhagens mutantes obtidas a quase totalidade da região codificadora destes genes foi deletada do genoma. Uma linhagem mutante dupla com deleção de ambos os genes dos RDTBs (CV_1491 e CV_2230) foi obtida pelo mesmo procedimento. Todas estas linhagens mutantes foram confirmadas por meio de PCR de colônia (Figura 9).

Figura 9. Confirmação das linhagens mutantes de genes relacionados a produção e captação de sideróforos. As linhagens mutantes foram confirmadas por PCR de colônia com os oligonucleotídeos del1/del4 (Tabela 2). Foram obtidos fragmentos com o tamanho esperado em cada caso: (canaletas 1), linhagem selvagem com o tamanho dos fragmentos sendo a soma das regiões flangeadoras com o gene; (canaletas 2), linhagens mutantes apresentando apenas as regiões flangeadoras. A. Deleção do gene CV_1486; B. Deleção do gene CV_1491; C. Deleção dos genes CV_1485-84-83-82; D. Deleção do gene CV_2230; E. Mutante duplo com deleção dos genes CV_1491 (canaleta 2) e CV_2230 (canaleta 4). M: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Foram obtidas também linhagens mutantes pela inserção do vetor pNPTS138 dentro dos genes das NRPSs, CV_1486 e CV_2233 (Figura 10). Devido ao gene CV_2233 apresentar quase 8 Kb isso dificultaria a seleção do mutante nulo, uma vez que o produto de PCR da linhagem selvagem seria de quase 10 Kb, por isso foi feita a mutação por inserção. Essas construções também foram utilizadas para fazer mutações duplas, inserindo-as em mutantes nulos. Assim, foram obtidas as linhagens Δ CV_1486/2233::pNPT (mutante duplo sem ambas as NRPSs) e Δ CV_1485-84-83-82/1486::pNPT (mutante do operon *entFCEBA*). As linhagens por inserção também foram confirmadas por PCR de colônia (Figura 10). Nenhum dos genes se mostrou essencial, uma vez que conseguimos obter todas as linhagens mutantes de interesse.

Figura 10. Confirmação dos mutantes obtidos por inserção de vetor. As linhagens mutantes indicadas foram confirmadas por PCR de colônia utilizando um oligonucleotídeo dentro do vetor (M13_FW) e outro encontrado no gene de interesse fora da região de recombinação (ver Figura 6). Foram obtidos produtos do tamanho esperado para as linhagens mutantes com a inserção do vetor (canaletas 2 e 4), mas estes produtos estavam ausentes quando se utilizou a linhagem selvagem ATCC 12472 (canaletas 1 e 3). M: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.3 Caracterização das linhagens mutantes em carência e suficiência de ferro

Para verificar se as linhagens mutantes apresentam deficiência em crescer em meios com suficiência e carência de ferro foram feitas curvas de crescimento em diferentes condições (Figura 11). Quando cultivadas em meio LB, uma condição de conhecida suficiência de ferro, quase todas as linhagens mutantes tiveram o crescimento comparado ao da linhagem selvagem, com exceção do mutante $\Delta CV_2230/1491$ que apresentou um atraso de crescimento, mas a partir de 6 horas se igualou ao crescimento da selvagem (Figura 11A). Foram feitas também curvas de crescimento no meio M9HC, um meio definido menos rico que o meio LB. De fato, neste meio a linhagem selvagem atingiu uma DO_{600nm} final em torno de 4, enquanto no meio LB ela atingiu uma DO_{600nm} de até 8. Assim como no meio LB, quando cultivadas em meio M9HC as linhagens mutantes se comportaram de modo semelhante a linhagem selvagem, com exceção do mutante $\Delta CV_2230/1491$ que novamente apresentou um atraso no crescimento, mas nesse caso o atraso foi maior em relação ao meio LB (Figura 11B).

Por fim, para estabelecer uma condição de carência de ferro, foram feitas curvas de crescimento em meio LB com a adição de 200 μM de DP. De fato, nesta condição a linhagem selvagem apresentou um atraso no crescimento em relação ao seu cultivo em meio LB (Figura 11C). De acordo com seu crescimento nesta condição de carência de ferro, os mutantes podem ser divididos em quatro grupos: (i) os mutantes ΔCV_1486 e ΔCV_1491 tiveram crescimento similar ao da linhagem selvagem; (ii) os mutantes $CV_2233::pNPT$ e ΔCV_2230 apresentaram forte redução do crescimento, retomando somente a partir de 8 horas de cultivo; (iii) os mutantes duplos das NRPSs ($\Delta CV_1486/2233::pNPT$) e dos RDTBs ($\Delta CV_2230/1491$) só apresentaram crescimento a partir de 24 horas de cultivo; (iv) e os mutantes $\Delta CV_1485-84-83-82$ e $\Delta CV_1485-84-83-82/1486::pNPT$ não apresentaram crescimento nessa condição (Figura 11C). A semelhança nos perfis de crescimento das linhagens mutantes entre os pares de NRPS e RDTB de cada *cluster* (ΔCV_1486 e ΔCV_1491 *versus* $CV_2233::pNPT$ e ΔCV_2230) sugerem que cada uma das enzimas pode estar produzindo sideróforos diferentes e que cada RDTB presente em seu *cluster* deve fazer a captação de cada uma dessas moléculas. A retomada do crescimento dos mutantes duplos a partir de 24h foi melhor investigada. A coleta de pontos da curva a partir deste tempo indicou que a linhagem $\Delta CV_1486/2233::pNPT$

inicia sua fase log com 26 horas, enquanto a linhagem $\Delta CV_2230/1491$ inicia sua fase log com aproximadamente 30 horas de cultivo, e ambas atingem a fase estacionária por volta de 40h de cultivo (Figura 11D). A hipótese de que este crescimento tardio nestas linhagens ocorresse devido a acidificação do meio, favorecendo a captação de Fe^{2+} por meio do sistema FeoAB, foi descartada, pois o pH destas culturas, medido com 48 horas de cultivo, estava neutro. Portanto, os dados das curvas de crescimento indicam que mutação em genes presentes nos *clusters* NRPS1 e NRPS2, seja de potenciais vias de síntese ou captação de sideróforos, reduzem de modo significativo a capacidade de *C. violaceum* de crescer em condições de carência de ferro.

Figura 11. Curvas de crescimento das linhagens em condições de suficiência e carência de ferro. A. Crescimento das linhagens selvagem e mutantes em meio LB. B. Crescimento das linhagens selvagem e mutantes no meio M9HC. C. Crescimento das linhagens selvagem e mutantes em carência de ferro, pela adição de 200 μM de DP ao meio LB. D. Crescimento dos mutantes duplos das NRPSs e dos RDTBs em carência de ferro (LB com adição de 200 μM de DP). As curvas foram obtidas por medida da DO_{600nm} das culturas de alíquotas retiradas nas oito primeiras horas (intervalos de 1h) e nos pontos de 24 e 48 horas de cultivo (itens A, B e C) ou ainda em intervalos de 1h nos pontos entre 24 e 48 horas (item D).

Além das curvas de crescimento, foram feitos ensaios de viabilidade com todas as linhagens mutantes obtidas cultivadas em meio LB por 20h, a condição de cultivo utilizada para os ensaios de virulência com *C. violaceum* em nosso laboratório. Os resultados indicaram que não houve diferença na viabilidade das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem, indicando que a mutação destes genes não afeta a sobrevivência dessas linhagens, ao menos em condições favoráveis de cultivo *in vitro* (Figura 12). Este resultado é concordante com as curvas de crescimento em meio LB (Figura 11A), nas quais os mutantes não haviam mostrado problemas de crescimento.

Figura 12. Ensaio de viabilidade das linhagens mutantes. A viabilidade das linhagens selvagem e mutantes foi feita a partir de 1,7 ml de uma cultura de 20h em meio LB. Após diluição seriada em PBS, a diluição 10^{-7} foi plaqueada em LB e as placas foram mantidas a 37 °C. Após 24h, as colônias foram contadas para verificar as unidades formadoras de colônia.

No entanto, ao realizar a viabilidade das linhagens mutantes observamos que algumas linhagens apresentavam colônias de tamanho menor do que as colônias da linhagem selvagem com o mesmo tempo de cultivo nas placas LB, e que esta diferença desaparecia em tempos prolongados de cultivo. Então, estaria havendo um atraso no crescimento dessas linhagens em relação à linhagem selvagem que não estaria afetando o número de células viáveis. A hipótese mais plausível, de que este atraso se daria por deficiência de ferro nas placas LB, foi testada pelo plaqueamento da linhagem selvagem e dos mutantes em placas LB e placas LB com a adição de

250 μM de FeSO_4 , seguido de quantificação do tamanho dessas colônias (Figura 13). De fato, as linhagens $\Delta\text{CV_1486/2233::pNPT}$, $\Delta\text{CV_1485-84-83-82}$, $\Delta\text{CV_1485-84-83-82/1486::pNPT}$ e $\Delta\text{CV_2230/1491}$ apresentaram tamanho reduzido das colônias em meio LB, mas quando adicionamos 250 μM de FeSO_4 ocorreu a reversão do tamanho das colônias para o tamanho próximo ao das colônias da linhagem selvagem (Figura 13). Vale lembrar que o atraso de crescimento destas linhagens foi restrito ao meio LB sólido e não ao LB líquido, talvez por diferenças de solubilidade do ferro nestas duas condições. Portanto, estes diferentes fenótipos das linhagens mutantes confirmam que os genes selecionados estão envolvidos na homeostase de ferro de *C. violaceum*.

Figura 13. Quantificação do tamanho das colônias da linhagem selvagem e mutantes.

A. Imagens mostrando os tamanhos das colônias isoladas das linhagens selvagem e mutantes com ou sem a adição de 250 μM de FeSO_4 . B. Quantificação do tamanho das colônias por meio do programa ImageJ, cultivadas em placas LB ou LB com adição de 250 μM de FeSO_4 para as diferentes linhagens. Análise estatística por *one-way ANOVA* seguido por teste das variantes *Kruskal-Wallis test* para comparações múltiplas; ***, $P < 0.0001$.

4.4. Análise da expressão de genes relacionados a síntese de sideróforos

Visto que as linhagens mutantes ΔCV_1486 e $CV_2233::pNPT$ apresentaram diferenças na suscetibilidade à carência de ferro ao longo das fases de crescimento (Figura 11C), foi realizado um ensaio de Northern Blot para verificar os níveis de expressão das NRPSs em suficiência e carência de ferro em fases de crescimento distintas (Figura 14). A expressão da NRPS CV_1486 mostrou-se aumentada tanto em suficiência quanto em carência de ferro quando visto no início da fase log (DO_{600nm} de 0,6). Em suficiência de ferro os níveis da expressão então diminuíram, enquanto em carência de ferro manteve-se até a DO_{600nm} de 2,0, depois diminuiu e voltou a aumentar sua expressão na fase estacionária (Figura 14A). Já a expressão da NRPS CV_2233 foi indetectável em suficiência de ferro ao longo de toda a curva de crescimento, tendo aumento de sua expressão apenas em fase log (DO_{600nm} de 0,6 e 2,0) em carência de ferro (Figura 14B). Assim, podemos concluir que ambas NRPSs tem sua expressão aumentada em carência de ferro, como esperado para enzimas de síntese de sideróforos, que este aumentado é mais pronunciado em fase log, e que a expressão ao longo da curva de crescimento difere um pouco entre elas.

Figura 14. Níveis de expressão das NRPSs em suficiência e carência de ferro por fase de crescimento. A expressão dos genes CV_1486 e CV_2233 foi avaliada por Northern blot na linhagem *C. violaceum* ATCC 12472 cultivada em suficiência (meio LB) e carência de ferro (tratada com 200 μM de DP, por 30 minutos) nos quatro pontos indicados da curva de crescimento. O RNA ribossômico foi usado como controle do carregamento de RNA. A. Expressão da NRPS CV_1486 . B. Expressão da NRPS CV_2233 .

4.5. Caracterização da produção e utilização de sideróforos por *C. violaceum*

Para verificar se *C. violaceum* produz sideróforos foi feito o ensaio de CAS, no qual a formação de um halo laranja indica a produção de sideróforo pela bactéria. Como *C. violaceum* não teve crescimento adequado em placas CAS convencionais (dados não mostrados), utilizamos a versão PSA-CAS em que o meio base é mais rico (CHATTERJEE e SONTI, 2002). Nestas placas observamos que a linhagem selvagem ATCC 12472 de *C. violaceum* produz sideróforo, uma vez que houve a formação de halo no ensaio (Figura 15A e B). As linhagens mutantes de cada NRPS (ΔCV_1486 e $CV_2233::pNPT$) tiveram seus halos diminuídos em relação à selvagem, mas ainda houve a produção de sideróforo em cada linhagem. Já na linhagem duplo mutante para as NRPSs ($\Delta CV_1486/2233::pNPT$) não houve mais a formação de halo, indicando que *C. violaceum* produz dois sideróforos por duas NRPSs diferentes. Para os mutantes $\Delta CV_1485-84-83-82$ e $\Delta CV_1485-84-83-82/1486::pNPT$ não houve formação de halo no ensaio de CAS, indicando que os dois possíveis sideróforos produzidos pela *C. violaceum* apresentam a mesma via de produção do seu precursor, podendo assim serem ambos do tipo catecolato. Já os mutantes para os RDTBs (ΔCV_1491 , ΔCV_2230 e duplo $\Delta CV_2230/1491$) tiveram seus halos aumentados em relação à linhagem selvagem (Figura 15A e B), indicando que estes transportadores são necessários para a captação dos sideróforos endógenos de *C. violaceum* e na falta dos mesmos os sideróforos estão sendo acumulados no meio externo.

Além do ensaio de CAS, também foi feito um ensaio de estimulação de crescimento, no qual a linhagem selvagem foi semeada em placas LB carenciadas de ferro e sobre este inóculo foram colocados sobrenadantes filtrados das culturas das linhagens selvagem e mutantes (Figura 15C). Na presença dos sobrenadantes da linhagem selvagem, ΔCV_1486 e $CV_2233::pNPT$ houve um mesmo estímulo, indicando a presença de sideróforos produzidos por essas linhagens. Já na presença dos sobrenadantes das linhagens $\Delta CV_1486/2233::pNPT$, $\Delta CV_1485-84-83-82$ e $\Delta CV_1485-84-83-82/1486::pNPT$ não houve estímulo de crescimento da linhagem selvagem, indicando que não há a presença de sideróforos nos sobrenadantes dessas linhagens. Os sobrenadantes dos mutantes ΔCV_1491 , ΔCV_2230 e $\Delta CV_2230/1491$ levaram a um aumento do halo de estimulação, assim como no ensaio de CAS, mais uma vez demonstrando o acúmulo dos sideróforos produzidos que não estão sendo

captados por estas linhagens mutantes (Figura 15C). Assim, esses resultados indicam a produção de dois possíveis sideróforos pela *C. violaceum* envolvendo duas enzimas NRPS e sua captação por meio de dois RDTBs.

Figura 15. Caracterização da produção de sideróforos por *C. violaceum*. A. Ensaio de CAS indicando a produção de sideróforos pelas linhagens indicadas inoculadas em placas PSA-CAS. B. Quantificação do tamanho dos halos do ensaio de CAS pelo programa ImageJ (área do halo subtraída da área de crescimento bacteriano). C. Ensaio de estimulação de crescimento na presença dos sobrenadantes de culturas das linhagens indicadas cultivadas por 48h em meio M9HC. A linhagem selvagem foi estriada em placas carenciadas de ferro com DP e os sobrenadantes foram colocados em disco sobre o inóculo. A produção de estímulo de crescimento indica que nos sobrenadantes os sideróforos estão sendo usados pela linhagem selvagem para crescer. 1-WT; 2- ΔCV_1486 ; 3- $2233::pNPT$; 4- ΔCV_2230 ; 5- ΔCV_1491 ; 6- $\Delta CV_2230/1491$; 7- $\Delta CV_1486/2233::pNPT$; 8- $\Delta CV_1485-84-83-82$; 9- $\Delta CV_1485-84-83-82/1486::pNPT$; 10- 1 mM de $FeSO_4$ (controle positivo).

Para verificar a relação entre os sideróforos produzidos por *C. violaceum* e os RDTBs utilizados para captá-los foi feito um ensaio de estimulação de crescimento no qual as linhagens selvagem, ΔCV_2230 , ΔCV_1491 e $\Delta CV_2230/1491$ foram semeadas em placas LB carenciadas de ferro e os sobrenadantes das linhagens selvagem, ΔCV_1486 , $CV_2233::pNPT$ e $\Delta CV_1486/2233::pNPT$ foram colocados sobre os inóculos (Figura 16). A linhagem selvagem foi capaz de crescer na presença de todos os sobrenadantes testados, com exceção do sobrenadante da linhagem $\Delta CV_1486/2233::pNPT$, mostrando que ela foi capaz de utilizar os sideróforos presentes nos sobrenadantes (Figura 16A). Já a linhagem ΔCV_1491 não cresceu na presença do sobrenadante do $CV_2233::pNPT$ (onde acumularia apenas o sideróforo da NRPS CV_1486), indicando que o RDTB CV_1491 realiza a captação apenas do sideróforo produzido via NRPS CV_1486 (Figura 16B). A linhagem ΔCV_2230 não cresceu na presença do sobrenadante do ΔCV_1486 (onde acumularia apenas o sideróforo da NRPS CV_2233), demonstrando assim que o RDTB CV_2230 está relacionado com a captação do sideróforo produzido pela NRPS CV_2233 (Figura 16C). Quando testamos a linhagem $\Delta CV_2230/1491$ ela foi capaz de crescer fracamente apenas na presença de 1 mM de $FeSO_4$ (controle positivo) que é captado por outra via, que não a de sideróforo (Figura 16D). Esses resultados indicam que os sideróforos produzidos por *C. violaceum* são captados pelos RDTBs CV_1491 e CV_2230 e esses são específicos para o sideróforo feito pela enzima NRPS do seu respectivo *cluster* gênico.

Para investigar se *C. violaceum* é capaz de utilizar sideróforos produzidos por outras bactérias (xenosideróforos) foi realizado um ensaio de utilização de sideróforo. Neste, a linhagem $\Delta CV_1486/2233::pNPT$ (incapaz de produzir sideróforos) foi embebida em placa LB contendo 200 μM de DP e sobre ela foram pipetados 10 μl de culturas de bactérias produtoras de sideróforo (*C. violaceum* ATCC 12472, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella* sp e *E. coli*). Na presença de *C. violaceum* selvagem foi observado o crescimento da linhagem mutante embebida no meio, indicando que a mesma não produz sideróforo próprio, mas pode utilizar o sideróforo produzido pela selvagem (Figura 17A). Na presença de *Salmonella* sp e *E. coli* foi visto o estímulo do crescimento da linhagem mutante embebida, mostrando que a mesma foi capaz de utilizar os sideróforos produzidos por essas bactérias, enquanto não houve estímulo na presença de *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Figura 17A).

Figura 16. Utilização dos sideróforos produzidos por *C. violaceum* via seus receptores dependentes de TonB. As linhagens indicadas foram semeadas em placa LB carenciadas de ferro (150 μ M de DP) e discos contendo 10 μ l dos sobrenadantes das linhagens indicadas por números (culturas de 48h em meio M9HC) foram adicionados sobre o inóculo. As placas foram mantidas por 24h a 37 °C e o estímulo do crescimento em volta dos filtros significou a utilização do sideróforo presente no sobrenadante pelas bactérias semeadas. 1- 1mM de FeSO_4 ; 2- WT; 3- ΔCV_{1486} ; 4- $\text{CV}_{2233}::\text{pNPT}$; 5- $\Delta\text{CV}_{1486/2233}::\text{pNPT}$.

Visto que *C. violaceum* foi capaz de utilizar os sideróforos de *E. coli* e *Salmonella* sp. decidimos verificar se os mesmos são utilizados via RDTBs CV_1491 e CV_2230. Para isso foi realizado o mesmo experimento, mas dessa vez as linhagens ΔCV_{1491} , ΔCV_{2230} e $\Delta\text{CV}_{2230/1491}$ foram embebidas nas placas LB carenciadas de ferro. O mutante ΔCV_{2230} foi capaz de utilizar tanto o sideróforo de *E. coli* quanto o de *Salmonella* sp, demonstrando que esse receptor não é necessário para que ocorra a captação dos mesmos (Figura 17B). Já para as linhagens ΔCV_{1491} e $\Delta\text{CV}_{2230/1491}$ não observamos o estímulo do crescimento na presença tanto da *E. coli* quanto da *Salmonella* sp, indicando que o RDTB CV_1491

é necessário para utilização desses xenosideróforos por *C. violaceum* (Figura 17C e D). Esses resultados indicam que *C. violaceum* pode utilizar xenosideróforos produzidos por *E. coli* e *Salmonella*, ambas conhecidas por produzir sideróforos do tipo catecolato. Essa utilização foi feita por meio do RDTB CV_1491 que também é usado para captar o sideróforo endógeno produzido pela NRPS CV_1486, sugerindo que esse receptor seja específico para sideróforos do tipo catecolato.

Figura 17. Utilização de xenosideróforos por *C. violaceum* via receptores dependentes de TonB. As linhagens mutantes de *C. violaceum* indicadas foram embebidas em placas LB com 200 μ M de DP. Culturas de 24h em LB (10 μ l) das linhagens indicadas por números foram adicionadas sobre os inóculos e o estímulo do crescimento das linhagens embebidas foi observado (regiões de maior turbidez dentro do ágar em volta dos inóculos, indicadas por setas). 1- *C. violaceum* ATCC 12472; 2- *E. coli*; 3- *P. aeruginosa*; 4- *Salmonella* sp; 5- *S. aureus*.

4.6. Isolamento e purificação dos sideróforos de *C. violaceum*

Dadas as nossas evidências genéticas de que *C. violaceum* é capaz de produzir dois sideróforos endógenos, nós tentamos isolar essas moléculas para caracterizá-las quanto a sua estrutura química. Para isso, o sobrenadante filtrado de culturas de 48h em meio M9HC de algumas linhagens (selvagem, ΔCV_{1491} , ΔCV_{2230} e $\Delta CV_{1485-84-83-82}$) foi submetido à partição com solvente orgânico e os extratos foram analisados por HPLC (Figura 18).

Figura 18. Padrões cromatográficos de sobrenadantes de culturas de *C. violaceum*. Os extratos dos sobrenadantes das linhagens indicadas foram analisados por meio de HPLC analítico em coluna de *Phenyl-Hexyl* resultando nos cromatogramas mostrados. A. Cromatogramas dos extratos das linhagens selvagem (preto) e ΔCV_{1491} (azul). B. Cromatogramas dos extratos das linhagens selvagem (preto) e ΔCV_{2230} (azul). C. Comparação entre os cromatogramas da selvagem (verde), ΔCV_{1491} (azul) e ΔCV_{2230} (rosa). D. Cromatogramas dos extratos das linhagens selvagem (preto) e $\Delta CV_{1485-84-83-82}$ (azul).

Dentre os picos obtidos para a amostra da linhagem selvagem, alguns mostraram-se aumentados, tanto na amostra da linhagem ΔCV_{1491} (Figura 18A), quanto na amostra da linhagem ΔCV_{2230} (Figura 18B), ambas linhagens associadas ao acúmulo de sideróforos no meio externo (ensaios de CAS). Este aumento foi mais pronunciado com a amostra da linhagem ΔCV_{2230} , como fica evidente na comparação dos cromatogramas das três linhagens (Figura 18C). Por outro lado, na amostra da linhagem $\Delta CV_{1485-84-83-82}$, que não teve atividade de CAS, todos os picos característicos da linhagem selvagem revelaram-se extremamente diminuídos (Figura 18D). Esses resultados sugerem que os picos observados nos cromatogramas possam ser os sideróforos produzidos pela *C. violaceum*, uma vez que os padrões vistos são relacionados com o que é visto no ensaio de CAS. No entanto, são necessários mais experimentos para conseguirmos isolar e caracterizar essas moléculas.

4.7. Sideróforos de *C. violaceum* apresentam papel na patogênese bacteriana

Sideróforos apresentam um papel importante durante a infecção, uma vez que conseguem capturar o ferro escasso e complexado a proteínas no hospedeiro (SHELDON *et al.*, 2016). Em *P. aeruginosa* o sideróforo pioverdina mostrou-se necessário para a infecção dessa bactéria, pois uma linhagem mutante incapaz de sintetizá-lo é menos virulenta que a linhagem selvagem (MINANDRI *et al.*, 2016). Para investigar se em *C. violaceum* a presença dos sideróforos seria necessária para a infecção, foram realizados ensaios de virulência avaliando a curva de morte de camundongos infectados com as linhagens selvagem e mutantes (Figura 19A). A infecção com as linhagens ΔCV_{1486} , $CV_{2233}::pNPT$, ΔCV_{1491} e ΔCV_{2230} resultou na mesma curva de morte que a infecção com a linhagem selvagem, com os animais morrendo entre o primeiro e terceiro dia de infecção. Já as linhagens $\Delta CV_{1486/2233}::pNPT$, $\Delta CV_{1485-84-83-82}$ e $\Delta CV_{1485-84-83-82/1486}::pNPT$ tiveram sua virulência diminuída em relação à linhagem selvagem, pois os animais infectados com elas sobreviveram por um tempo maior, havendo animais que sobreviveram ao final de 8 dias. Por fim, o mutante $\Delta CV_{2230/1491}$ foi avirulento nesta dose testada, tendo 100% dos animais sobrevivido à infecção por essa linhagem (Figura 19A). Portanto, as linhagens que não produzem nenhum sideróforo se mostraram menos virulentas, evidenciando a importância dos dois possíveis sideróforos de *C. violaceum* durante a infecção, enquanto a linhagem que produz

sideróforos mas não é capaz de utilizá-los se mostrou avirulenta, indicando que, além do efeito da escassez de ferro para este mutante, o acúmulo dos sideróforos nos sítios de infecção pode ser benéfico para o hospedeiro.

Figura 19. Sideróforos são necessários para infecção por *C. violaceum*. A. Ensaio de virulência em camundongos Balb/c. Os animais foram infectados por via intraperitoneal com 10^6 bactérias de cada linhagem indicada. Análise estatística por *Log-rank (Mantel-Cox) Test*; $P < 0.005$. B. Ensaio de carga bacteriana no fígado. Camundongos Balb/c foram infectados com 10^6 bactérias, após 16 horas de infecção o fígado foi coletado, pesado e homogeneizado. O homogenato foi diluído e plaqueado, e a UFC foi quantificada. Análise estatística com *t test*; $P < 0,05$. C. Ensaio de liberação de NET. Os neutrófilos derivados do peritônio de camundongos foram infectados *in vitro* com as linhagens indicadas e foi feita a quantificação do DNA liberado por meio de fluorescência, para a quantificação da produção de NET. Crt- apenas os neutrófilos, PMA- controle positivo. Análise estatística por *one-way ANOVA* seguido por teste das variantes *Kruskal-Wallis test* para comparações múltiplas; $P < 0.05$.

Como o fígado é um dos locais mais colonizados por *C. violaceum* durante a infecção (MIKI *et al.*, 2010), realizamos a quantificação da carga bacteriana presente no fígado de camundongos durante a infecção pelas linhagens selvagem, $\Delta CV_{1486}/2233::pNPT$, $\Delta CV_{1485-84-83-82}$, $\Delta CV_{1485-84-83-82}/1486::pNPT$ e

$\Delta CV_2230/1491$ (Figura 19B). Nos fígados de animais infectados por 16 horas com as linhagens $\Delta CV_1486/2233::pNPT$, $\Delta CV_1485-84-83-82$ e $\Delta CV_1485-84-83-82/1486::pNPT$ foi detectada uma carga bacteriana similar àquela encontrada nos fígados de animais infectados com a linhagem selvagem, sugerindo que para esse tempo de infecção, embora estas linhagens mutantes sejam menos virulentas, elas conseguem se estabelecer neste órgão. Já o mutante $\Delta CV_2230/1491$ não foi detectado no fígado, indicando que esse mutante não está conseguindo estabelecer uma infecção neste órgão como as outras linhagens, o que corrobora seu fenótipo de menor virulência em relação aos outros mutantes.

O fato do mutante $\Delta CV_2230/1491$ ser bastante atenuado para virulência nos levou a questionar se a presença do sideróforo acumulado na infecção estaria beneficiando a resposta imune do hospedeiro contra a bactéria. Visto que o neutrófilo é uma das principais linhas de defesas contra a infecção por *C. violaceum* (MALTEZ *et al.*, 2015) e trabalhos já demonstraram que o acúmulo de sideróforo pode levar a diminuição das funções dos neutrófilos (SAHA *et al.*, 2017), nós resolvemos investigar como estaria a atividade de NET de neutrófilos peritoneais infectados *in vitro* com diferentes linhagens mutantes de *C. violaceum*, medindo fluorescência decorrente da liberação de DNA extracelular (Figura 19C). Na presença das bactérias da linhagem selvagem observamos um aumento de 5 vezes do DNA liberado, até maior do que no controle positivo na presença de PMA (*Phorbol Myristate Acetate*), indicando que durante a infecção por *C. violaceum* há geração de NET. Comparadas à linhagem selvagem, as linhagens que não produzem sideróforos ($\Delta CV_1486/2233::pNPT$ e $\Delta CV_1485-84-83-82$) causaram um pequeno aumento na liberação de DNA, enquanto a linhagem que não capta os sideróforos ($\Delta CV_2230/1491$) teve menor liberação do DNA, indicando uma menor produção de NET. Esses resultados sugerem que os sideróforos podem estar inibindo a produção de NET, uma vez que o acúmulo do mesmo na infecção levou a uma diminuição do DNA liberado pelo neutrófilo.

4.8. Obtenção de mutantes por inserção de transposon e varredura para produção de sideróforos

Para tentar identificar genes relacionados com a produção de sideróforos de maneira não enviesada, foi desenvolvido um protocolo para a obtenção de uma coleção de mutantes pela inserção de um transposon no genoma de *C. violaceum*. Uma vez que ainda não existem bibliotecas de transposon para esta bactéria, foi feita

a padronização para a seleção desses mutantes usando o transposon IS*lacZ*/hah (T8) presente no plasmídeo pIT2 (JACOBS *et al.*, 2003) (Figura 7). Como este sistema estava sendo usado pela primeira vez em *C. violaceum*, foi necessário validar as diferentes etapas de obtenção dos mutantes de transposição (Figura 20). A conjugação de *E. coli* SM10 λ pir contendo o pIT2 com a linhagem CVNAL (mutante espontâneo resistente a ácido nalidíxico derivado da linhagem selvagem ATCC 12472) resultou em colônias de *C. violaceum* resistentes a tetraciclina. A presença do transposon em algumas destas colônias resistentes a tetraciclina selecionadas foi confirmada por PCR pela amplificação de fragmento interno do gene de resistência a tetraciclina presente no transposon (Figura 20A).

Figura 20. Padronização da obtenção de mutantes por inserção do transposon IS*lacZ*/hah em *C. violaceum*. A. PCR das linhagens indicadas para o gene de resistência a tetraciclina. M, marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific); 1, *C. violaceum* ATCC 12472; 2, CVNAL; 3, *E. coli* SM10 λ pir; 4 a 11, colônias de *C. violaceum* resistentes a tetraciclina; 12, controle negativo. B. Eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar a presença do vetor pIT2 nas colônias selecionadas por meio de minipreparação de DNA das linhagens indicadas. M, marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder; 1, *E. coli* SM10 λ pir; 2 a 9, colônias de *C. violaceum* resistentes a tetraciclina. C. Southern blot com a sonda específica para o gene de resistência a tetraciclina presente no transposon para verificar os fragmentos com a presença do transposon inserido no genoma das colônias. 1- CVNAL; 2 a 16, colônias de *C. violaceum* resistentes a tetraciclina.

Uma possibilidade seria que nestas colônias o transposon ainda estivesse no pIT2, caso este plasmídeo fosse replicativo em *C. violaceum*. No entanto, minipreparação de DNA plasmidial isolou este plasmídeo apenas da *E. coli* SM10λpir e não das colônias testadas, confirmando assim que esse vetor é suicida em *C. violaceum* e que o gene de tetraciclina amplificado por PCR estava inserido no genoma e não presente no vetor (Figura 20B). A verificação de que a inserção do transposon ocorreu de forma aleatória no genoma foi feita por Southern blot com o DNA da linhagem selvagem CVNAL e de algumas colônias selecionadas, usando como sonda um fragmento de DNA do gene de resistência a tetraciclina. A ausência de bandas na linhagem CVNAL e a presença de uma banda cujo tamanho variou nas diferentes colônias indica a ocorrência de eventos únicos e aleatórios de inserção do transposon no genoma (Figura 20C), validando assim o uso deste transposon para obtenção de bibliotecas de mutantes em *C. violaceum*.

Visto que a inserção do transposon estava ocorrendo de maneira correta, foram selecionados e congelados aproximadamente 1600 mutantes de transposon, os quais foram todos testados para a produção de sideróforo em placas CAS. Destes, dois mutantes apresentaram padrões diferentes no meio CAS comparados à linhagem selvagem: o mutante 1B14 apresentou aumento enquanto o mutante 1A15 apresentou diminuição do halo laranja indicativo da produção de sideróforo. A presença do transposon nessas duas linhagens foi confirmada por PCR para o gene de resistência a tetraciclina (Figura 21A). O ensaio de CAS foi repetido e confirmamos o fenótipo encontrado na varredura, ou seja, o mutante 1B14 apresenta um aumento na produção de sideróforos enquanto o mutante 1A15 apresenta sua produção diminuída (Figura 21B). Os sobrenadantes em meio M9HC desses mutantes foram utilizados em um ensaio de estimulação de crescimento, no qual verificamos um estímulo igual ao da selvagem para o mutante 1A15 e um estímulo aumentado para o mutante 1B14 (Figura 21C), corroborando o que foi visto no ensaio de CAS, sobretudo para o mutante 1B14. Curvas de crescimento realizadas em meio LB (Figura 21D), em meio M9HC (Figura 21E) e em meio LB com a adição de 200 µM de DP (Figura 21F) indicaram que as linhagens mutantes 1B14 e 1A15 apresentaram crescimento similar ao da linhagem selvagem, diferentemente do que foi observado para os mutantes nos genes dos *clusters* NRPS1 e NRPS2. Isto sugere que estas mutações por transposição possam ser em genes diferentes dos analisados anteriormente.

Figura 21. Caracterização dos mutantes de transposon 1A15 e 1B14. A. PCR das linhagens indicadas para o gene de resistência a tetraciclina presente no transposon, para confirmar a sua inserção no genoma dos mutantes. M- Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific); 1- WT; 2- *E. coli* SM10λpir; 3- 1A15 e 4- 1B14. B. Ensaio de CAS para verificar a produção de sideróforos pelas linhagens indicadas. C. Ensaio de estimulação de crescimento da linhagem selvagem na presença dos sobrenadantes de culturas em meio M9HC das linhagens indicadas. 1- WT; 2- 1 mM de FeSO₄; 3- 1A15 e 4- 1B14. D. Curvas de crescimento das linhagens indicadas em meio LB. E. Curvas de crescimento das linhagens indicadas em meio M9HC. F. Curvas de crescimento das linhagens indicadas em meio LB com a adição de 200 μM de DP (carência de ferro).

A etapa seguinte foi identificar o sítio de inserção do transposon nestes dois mutantes de transposon com fenótipo alterado de produção de sideróforos por meio de PCR semi-degenerado e sequenciamento, conforme descrito (JACOBS *et al.*, 2003). Assim, após dois *rounds* de PCR, o produto foi limpo e usado como molde para a reação de sequenciamento utilizando o oligonucleotídeo *lacZ*148 (Tabela 3). Por

estar localizado dentro do gene *lacZ* e direcionado para fora do transposon este oligonucleotídeo permite sequenciar o início do gene *lacZ*, a sequência *loxP* (reconhecida pela enzima Cre recombinase para a retirada ou inversão do transposon), a sequência ME (reconhecida pela transposase para que ocorra a inserção do transposon no genoma), a borda da inserção e um trecho do DNA genômico no local em que ocorreu a inserção do transposon no cromossomo de *C. violaceum* (Figura 22A). Análise do sequenciamento dos mutantes 1B14 e 1A15 revelou a presença de todos estes sítios do final do transposon e permitiu identificar o nucleotídeo exato em que ocorreu a inserção do transposon no genoma de cada linhagem (Figura 22B).

Figura 22. Identificação do sítio de inserção do transposon nas linhagens mutantes. A. Esquema da estratégia usada para a identificação do sítio de inserção do transposon. A seta preta indica o oligonucleotídeo utilizado no sequenciamento o qual irá sequenciar uma região inicial do gene *lacZ* (azul) e as sequências *loxP* (laranja) e ME (verde) presentes na borda do transposon (linha preta). Após a sequência ME virá o sítio onde o transposon foi inserido no genoma (linha vermelha). B. Sequências obtidas a partir do sequenciamento dos mutantes 1A15 e 1B14, indicando os genes e sequências encontradas no transposon e a região do DNA genômico próxima a inserção (vermelho). O nucleotídeo marcado em vermelho indica o primeiro nucleotídeo do genoma de *C. violaceum* após o transposon. C. Mapa mostrando os genes onde houve a inserção do transposon nos mutantes 1A15 e 1B14. O local da inserção está identificado pelo triângulo preto. Assim, podemos visualizar a região onde houve a inserção do transposon, evidenciando o gene com a inserção em vermelho, e os genes vizinhos em cinza.

O alinhamento das sequências obtidas de cada mutante com o genoma completo da *C. violaceum* ATCC 12472 revelou que no mutante 1A15 o transposon inseriu no gene CV_3245 (Figura 22C), anotado como *ndk*, o qual codifica uma nucleosídeo difosfato quinase. Este é o primeiro gene do que parece ser um operon com a presença de genes com diversas funções, mas aparentemente nenhum desses apresenta uma função relacionada com a homeostase de ferro. Já no mutante 1B14 a inserção ocorreu no gene CV_1057 (Figura 22C), que está anotado como uma proteína hipotética, assim como os demais genes localizados nesta região. A presença de um domínio de ligação ao DNA na proteína codificada pelo gene CV_1057 sugere que ela possa ser um regulador transcricional. Portanto, embora os genes em que ocorreu a inserção do transposon nos mutantes 1B14 e 1A15 não tenham ainda uma conexão direta com homeostase de ferro descrita, os fenótipos apresentados por estes mutantes sugerem que esses genes podem estar agindo sobre a síntese ou captação dos sideróforos de *C. violaceum*.

5. DISCUSSÃO

O ferro é micronutriente essencial para as bactérias. Sua captação por meio de sideróforos é uma estratégia quase universal em bactérias de vida livre e patógenos. Como uma bactéria ambiental amplamente distribuída na natureza com habilidade de causar um quadro grave de infecção em humanos, *Chromobacterium violaceum* desponta como um interessante modelo para estudar mecanismos de homeostase de ferro, sobretudo sistemas de captação de ferro por sideróforos. No entanto, nenhum trabalho identificou as vias de produção e captação de ferro por sideróforos em *C. violaceum* e sua importância na virulência desse patógeno oportunista. Neste trabalho, identificamos por meio de análises *in silico* que vários genes relacionados com a síntese e utilização de sideróforos estão localizados no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 em dois *clusters* de síntese de metabólitos secundários. Obtenção e caracterização de linhagens mutantes de vários destes genes revelou que *C. violaceum* produz sideróforos endógenos, sendo provavelmente dois sideróforos distintos do tipo catecolato sintetizados por duas enzimas NRPSs (CV_1486 e CV_2233) a partir de um precursor comum produzido pelas enzimas codificadas pelos genes *entCEBA* (CV_1485-84-83-82). Estes sideróforos são captados via os RDTBs CV_1491 e CV_2230, sendo que um deles também está relacionado com a captação de xenosideróforos produzidos por *E. coli* e *Salmonella* sp. Por meio de ensaios em camundongos, demonstramos também que os sideróforos produzidos por *C. violaceum* são ambos necessários para a infecção, uma vez que as linhagens que não produzem sideróforos são menos virulentas que a linhagem selvagem, e que o acúmulo de sideróforo no hospedeiro se mostrou benéfico para o mesmo, pois a linhagem mutante incapaz de captar estes sideróforos mostrou-se ainda mais atenuada para virulência.

A análise *in silico* revelou que dentre os sete *clusters* de biossíntese de metabólitos secundários encontrados em *C. violaceum* dois *clusters* contem genes relacionados com síntese de sideróforos e captação de ferro. Estes *clusters* apresentam maior similaridade aos *clusters* de síntese de turnerbactina e mirubactina, ambos sideróforos do tipo catecolato. O sideróforo turnerbactina é produzido pela bactéria endossimbionte *Teredinibacter turnerae* via genes semelhantes aos da síntese de enterobactina de *E. coli*. Estes genes codificam enzimas para produção do

percursor 2,3-DHBA contendo o grupo catecolato (*entCEBA*) e uma NRPS que apresenta dois módulos, os quais incorporam uma ornitina e uma serina na montagem da estrutura da turnerbactina (HAN *et al.*, 2013). Já a mirubactina é produzida pela actinobactéria *Actinosynnema mirum* por uma via similar ao descrito acima, sendo adicionadas pela NRPS uma arginina e uma orinitina à sua estrutura (GIESSEN *et al.*, 2012). Como *C. violaceum* possui os genes *entCEBA* em um dos *clusters* e duas enzimas NRPSs (uma em cada *cluster*) seria plausível que seus sideróforos fossem do tipo catecolato, assim como a enterobactina, a turnerbactina e a mirubactina. No entanto, como a similaridade dos *clusters* não envolve necessariamente as enzimas NRPSs e as NRPSs dessas bactérias não se assemelham as de *C. violaceum*, não é possível ter uma ideia clara de como seriam os sideróforos de *C. violaceum* apenas por predição *in silico*.

Nossos dados experimentais usando linhagens mutantes e ensaios de detecção de sideróforo revelaram que houve a perda total da produção dos sideróforos apenas quando foram deletados os genes das duas enzimas NRPSs ou das enzimas da via de síntese do 2,3-DHBA, sendo que estes continuaram sendo produzidos nos mutantes individuais das NRPSs. Nossa interpretação para estes dados é que *C. violaceum* está produzindo dois sideróforos do tipo catecolato por duas enzimas NRPSs distintas, ambas usando o 2,3-DHBA como precursor. Outra possibilidade seria a formação de sideróforos pela combinação das duas NRPSs atuando conjuntamente, como observado em *Azotobacter vinelandii* (BAARS *et al.*, 2015). Esta bactéria apresenta dois *clusters* para produção de sideróforos do tipo catecolato, que se assemelham aos de *C. violaceum*: um dos *clusters* apresenta as enzimas de síntese do precursor 2,3-DHBA e uma NRPS, enquanto o outro *cluster* apresenta duas NRPSs codificadas por genes em operon. Verificou-se que a partir dos módulos presentes nestas enzimas podem ser produzidos diversos sideróforos por combinações diferentes entre essas enzimas a partir do mesmo precursor (BAARS *et al.*, 2015). Ensaios de espectrometria de massas e ressonância magnética a partir dos sideróforos purificados por HPLC deverão reforçar nossos dados genéticos de que *C. violaceum* produz dois sideróforos distintos, além de revelar suas estruturas finais.

Para entender como estes sideróforos endógenos de *C. violaceum* estavam sendo captados, foram obtidos mutantes com deleção de cada um e de ambos os

RBTDs (CV_1491 e CV_2230) presentes nos *clusters* das NRPSs de síntese de sideróforo. Os dados dos ensaios de CAS, ensaio de estimulação de crescimento e curvas de crescimento em carência de ferro revelaram que estes RDTBs estão envolvidos na captação dos sideróforos de *C. violaceum* de modo específico, ou seja, o sideróforo produzido via NRPS CV_1486 é captado pelo RDTB CV_1491 e o sideróforo produzido via NRPS CV_2233 é captado pelo RDTB CV_2230. Esta conclusão foi apoiada pelas seguintes evidências experimentais: (i) em carência de ferro os mutantes ΔCV_1486 e ΔCV_1491 tiveram fenótipo de atraso do crescimento similar entre si, mas diferente do fenótipo de atraso mais acentuado dos mutantes CV_2233::pNPT e ΔCV_2230 , ou seja, o fenótipo de não produzir seria o mesmo de não captar o sideróforo em cada par de mutantes; (ii) nos ensaios de estimulação de crescimento os sobrenadantes dos mutantes de cada NRPS (onde apenas um dos sideróforos estava sendo liberado) estimularam especificamente cada mutante de um RDTB, conforme a associação de cada par observada nas curvas de crescimento. Essa concordância de fenótipos é observada para outras bactérias, como a *Xanthomonas campestris*. Nesta bactéria, linhagens mutantes para a via de síntese e captação do sideróforo xantoferrina apresentaram o mesmo fenótipo em carência de ferro, e quando o meio foi suplementado com o sideróforo purificado apenas a linhagem mutante para síntese conseguiu recuperar seu crescimento, indicando ser o RDTB essencial para a captação do sideróforo (PANDEY *et al.*, 2017).

As linhagens mutante duplo sem as NRPSs ($\Delta CV_1486/2233::pNPT$) ou sem os RDTBs ($\Delta CV_2230/1491$) apresentaram o mesmo atraso acentuado do crescimento em carência de ferro, mas passaram a crescer com aproximadamente 30 horas de cultivo. Assumindo que esta retomada tardia do crescimento não deve ser por utilização de ferro via sistema FeoAB, pois o pH da cultura não diminuiu, sugerimos três hipóteses como explicação. A primeira é que poderia estar havendo um acúmulo do precursor 2,3-DHBA (no caso do mutante das NRPSs), e este estaria sendo utilizado como um sideróforo, uma vez que foi visto em *E. coli* que em carência de ferro essa molécula pode ser utilizada para captar o ferro (LIU *et al.*, 2014). A segunda hipótese é que poderia estar ocorrendo a captação de ferro por uma via alternativa independente de sideróforos e do sistema FeoAB. Em *P. aeruginosa*, uma linhagem que não apresenta nenhum dos mecanismos convencionais para captar ferro (sideróforos e sistema *feoAB*) apresentou crescimento em carência de ferro,

captando este metal por uma via alternativa por meio de PQS ligada a proteína TseF presente em vesículas (LIN *et al.*, 2017). A terceira hipótese é que poderia estar ocorrendo a seleção de mutantes espontâneos, uma vez que as duas linhagens mutantes estão em uma condição extrema de carência de ferro, fazendo com que ocorresse o aparecimento nas culturas de uma população com mutações supressoras capazes de reverter o fenótipo de atraso de crescimento dessas linhagens. Em *Rhodobacter capsulatus* foi visto que eventos de mutação supressora emergiram em vários genes de maquinaria de homeostase de ferro em culturas de um mutante do regulador HbrL mantidas em condições de carência de ferro (ZAPPA e BAUER, 2013). Para identificar qual dessas hipóteses estaria correta no caso das linhagens mutantes sem as NRPSs ou sem os RDTBs, seriam necessários mais ensaios.

Uma questão interessante é por que certas bactérias produzem mais de um sideróforo. Em *P. aeruginosa*, uma situação de carência de ferro moderada leva a produção apenas do sideróforo pioquelina, enquanto em condições mais extremas de carência de ferro ocorre a síntese do sideróforo pioverdina. Neste caso, isto ocorre porque a pioverdina apresenta uma maior afinidade ao ferro e um custo de energia alto para sua produção, enquanto a pioquelina apresenta uma afinidade menor e um custo menor de energia para sua produção (DUMAS *et al.*, 2013). Nossos dados sugerem que os dois possíveis sideróforos de *C. violaceum* produzidos via NRPSs CV_1486 e CV_2233 também não são redundantes. Por exemplo, a linhagem mutante CV_2233::pNPT apresentou uma deficiência de crescimento em carência de ferro bem maior do que a linhagem Δ CV_1486, sobretudo na fase log de crescimento, sugerindo que o sideróforo produzido via NRPS CV_2233 seria mais necessário nesta condição. Além disso, a linhagem Δ CV_2230 apresentou um halo mais forte no ensaio de CAS, indicando que o sideróforo produzido via NRPS CV_2233 teria mais afinidade ao ferro do que aquele produzido via NRPS CV_1486. Por fim, os dados de expressão mostrando que o transcrito de CV_2233 somente foi detectado em carência de ferro enquanto o transcrito de CV_1486 foi detectado inclusive em meio LB reforçam a noção de que em *C. violaceum* deve estar ocorrendo algo semelhante ao que foi visto para *P. aeruginosa*, com o sideróforo produzido via NRPS CV_2233 tendo maior afinidade ao ferro e sendo mais necessário em condições extremas de carência de ferro. Os dados de expressão também mostraram que: (i) houve aumento da expressão de ambas as NRPSs em carência de ferro, como descrito para estas

enzimas em diversas bactérias (HASTIE *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2017; SEO *et al.*, 2014; THODE *et al.*, 2015); (ii) este aumento da expressão em carência de ferro foi maior no início da fase log, o que está de acordo com um trabalho em que foi visto uma maior expressão de genes de captação de ferro durante a fase lag e início da fase log de crescimento (ROLFE *et al.*, 2012).

Recentemente foi visto que bactérias não cultiváveis apresentaram crescimento em meios de cultura artificiais quando estes foram suplementados com sideróforos produzidos por linhagens auxiliares, indicando que os sideróforos são fundamentais para o crescimento bacteriano em comunidades microbianas (VARTOUKIAN *et al.*, 2016). De fato, existem bactérias que não produzem seu próprio sideróforo, mas são capazes de utilizar xenosideróforos, como a bactéria de vida livre *C. crescentus* (BALHESTEROS *et al.*, 2017), ou ainda a cianobactéria *Synechocystis* sp., que não apresenta uma via de síntese de sideróforo, mas consegue utilizar xenosideróforos, sendo essa captação dependente do sistema TonB-ExbD-ExbB (BABYKIN *et al.*, 2018; OBANDO *et al.*, 2018). Visto que *C. violaceum* é uma bactéria de vida livre encontrada em solos e água de regiões tropicais e que possui 12 genes que codificam RDTBs em seu genoma (VASCONCELOS *et al.*, 2003), foi verificado se essa bactéria seria capaz de utilizar xenosideróforos. Nossos resultados indicaram que *C. violaceum* foi capaz de utilizar os sideróforos produzidos por *E. coli* e *Salmonella* sp., ambos sideróforos do tipo catecolato, e que a captação desses foi dependente do RDTB CV_1491, o mesmo utilizado para captar um dos seus próprios sideróforos. Como foram testadas apenas poucas bactérias produtoras de algumas classes de sideróforos, seriam necessários ensaios com outras bactérias para verificar quais outros RDTBs estariam envolvidos com a captação de xenosideróforos em *C. violaceum*. Assim, as bactérias serem capazes de produzir e utilizar seus próprios sideróforos e ainda conseguirem utilizar xenosideróforos, faz com que no ambiente haja uma maior diversidade de maquinarias de captação de ferro que tanto podem ser compartilhadas entre a comunidade, como também ser um fator de competição entre as bactérias dessa comunidade (VARTOUKIAN *et al.*, 2016).

Neste trabalho, demonstramos que os sideróforos produzidos por *C. violaceum* são necessários para a virulência desta bactéria em um modelo de infecção por via intraperitoneal em camundongos, uma vez que os mutantes que não produzem ou não captam os sideróforos se mostraram menos virulentos em relação a linhagem

selvagem. A produção de sideróforos e a sua captação tem se mostrado essenciais para a infecção em diversas bactérias. Em *P. aeruginosa* os sideróforos pioverdina e pioquelina são necessários para o crescimento e virulência durante a infecção, mas a pioverdina apresenta um papel mais importante para a disseminação da infecção (TAKASE *et al.*, 2000a); ainda nesta bactéria, foi visto que o mutante sem o gene *tonB* não consegue crescer *in vivo* por não conseguir captar o ferro presente em transferrinas, sideróforos e heme (TAKASE *et al.*, 2000b; MINANDRI *et al.*, 2016). Em *X. campestris* a mutação dos genes para produção ou captação via RDTB do sideróforo xantoferrina resulta em atenuação da virulência, com diminuição das lesões causadas por esta bactéria em plantas (PANDEY *et al.*, 2017). O sistema de captação do sideróforo ornibactina produzido por *Burkholderia cenocepacia* é o mais importante durante a infecção pulmonar causada por esta bactéria (VISSER *et al.*, 2004). Por fim, yersiniabactina é o principal sistema de captação de ferro presente nas espécies mais virulentas de *Yersinia*, sendo que os genes de síntese, captação e regulação desse sideróforo estão localizados em uma ilha de patogenicidade que está distribuída na família *Enterobacteriaceae* (RAKIN *et al.*, 2012). Assim, podemos verificar que a captação de ferro via sideróforos durante a infecção é essencial para que as bactérias consigam crescer e se estabelecer no hospedeiro.

Embora esteja bem estabelecida a participação de sideróforos em virulência bacteriana, em bactérias que possuem mais de um sideróforo o papel de cada um deles pode ser diferente. No caso de *C. violaceum*, nossos dados indicam que ambos sideróforos desta bactéria são necessários durante a infecção, uma vez que os mutantes de cada NRPS individual (Δ CV_1486 e CV_2233::pNPT) não tiveram sua virulência diminuída, enquanto os mutantes incapazes de produzir qualquer sideróforo (Δ CV_1486/2233::pNPT, Δ CV_1485-84-83-82 e Δ CV_1485-84-83-82/1486::pNPT) apresentaram diminuição na virulência. Este cenário em *C. violaceum* diverge do que é visto em *P. aeruginosa*, na qual o sideróforo pioverdina é mais necessário durante a infecção pulmonar em camundongos do que o sideróforo pioquelina (MINANDRI *et al.*, 2016). A atenuação de virulência dessas linhagens mutantes que não produzem sideróforos deve ser devido a incapacidade destas em captar o ferro do hospedeiro, uma vez que durante a infecção o ferro encontra-se complexado a proteínas e armazenado intracelularmente (CASSAT e SKAAR, 2013; SHELDON *et al.*, 2016). Considerando que os sideróforos de *C. violaceum* tem diferenças quanto a sua síntese

em carência de ferro ou fase de crescimento e quanto a afinidade ao ferro, isso pode estar sendo usado como uma vantagem adaptativa durante a infecção. Em *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) a produção de quatro tipos de sideróforos (enterobactina, salmoquelina, yersiniabactina e aerobactina), cada um apresentando propriedades e regulação específicas, permite que a ExPEC se adapte a diferentes condições ambientais ou que supere a imunidade nutricional do hospedeiro (GARÉNAUX *et al.*, 2011).

Um resultado bastante interessante do nosso trabalho foi descobrir que um mutante duplo em RDTBs incapaz de captar ambos os sideróforos endógenos de *C. violaceum* ($\Delta CV_2230/1491$) mostrou-se bem mais atenuado para virulência do que os mutantes que não produzem estes sideróforos, sugerindo que além do problema de captação de ferro, estaria havendo alguma resposta do hospedeiro em relação ao acúmulo dos sideróforos nos sítios de infecção. Embora com efeito menos pronunciado, mutações em RDTB tem sido associadas a diminuição da virulência em algumas bactérias. Em *Pseudomonas fluorescens* mutantes individuais de três RDTBs apresentaram diminuição da virulência no modelo de infecção em peixe (ZHANG *et al.*, 2014). Os RDTBs envolvidos com a captação de heme também tem sido relacionados com virulência, como o caso da atenuação de virulência em um mutante de um RDTB para heme em *Riemerella anatipestifer* (LU *et al.*, 2013). Tem sido demonstrado ainda que mutantes em genes *tonB* são atenuados para virulência em várias bactérias como *P. aeruginosa* (TAKASE *et al.*, 2000b), *Edwardsiella ictaluri* (ABDELHAMED *et al.*, 2017) e *E. coli* uropatogênica (TORRES *et al.*, 2001), mas nestes casos a mutação leva a perda de funcionamento de todos os RDTBs que são energizados pelo sistema TonB-ExbB-ExbD (NOINAJ *et al.*, 2010).

Considerando (i) a hipótese mencionada acima de que o acúmulo de sideróforos na infecção poderia estar favorecendo o hospedeiro, (ii) um estudo recente mostrando que o sideróforo enterobactina inibe as funções dos neutrófilos como a produção de ROS e a formação de NET (SAHA *et al.*, 2017) e (iii) o importante papel dos neutrófilos na defesa do hospedeiro contra a infecção por *C. violaceum* (MALTEZ *et al.*, 2015), nós decidimos verificar como estaria a atividade dos neutrófilos (produção de NETs) infectados *in vitro* com diferentes linhagens mutantes de *C. violaceum*. A infecção por *C. violaceum* selvagem induziu robusta liberação de NET pelos neutrófilos, liberação esta um pouco aumentada na infecção com mutantes que

não produzem sideróforos ($\Delta CV_1486/2233::pNPT$ e $\Delta CV_1485-84-83-82$) e diminuída na infecção com o mutante que não capta sideróforos ($\Delta CV_2230/1491$), ou seja, o acúmulo dos sideróforos na infecção levou a diminuição da atividade de NET, como havia sido descrito para o sideróforo enterobactina (SAHA *et al.*, 2017). Nossa interpretação para estes resultados, considerando a grande atenuação de virulência do mutante $\Delta CV_2230/1491$, é que a diminuição de NET estaria sendo benéfica para o hospedeiro, tornando os camundongos mais resistentes a infecção por este mutante. Esta hipótese considera que na infecção por *C. violaceum* selvagem estaria havendo forte ativação da liberação de NETs com consequente aumento da resposta inflamatória e dano tecidual, e que a redução destes eventos seria favorável ao próprio hospedeiro. De fato, embora a produção de NET seja de grande importância contra infecções microbianas, sua liberação exagerada é prejudicial, sobretudo em doenças inflamatórias pulmonares (CHENG e PALANIYAR, 2013).

Uma contribuição importante deste trabalho foi demonstrar que o transposon *SlacZ/hah* (T8) (JACOBS *et al.*, 2003) pode ser usado para obtenção de mutantes de transposon em *C. violaceum*, uma ferramenta genética ainda pouco explorada nesta bactéria. Prova desta importância é que a varredura de uma pequena coleção de mutantes de transposon para a produção de sideróforos revelou dois genes ainda não caracterizados como importantes para a produção destas moléculas. A mutação que resultou na diminuição da produção de sideróforos ocorreu no gene *ndk* (CV_3245), o qual codifica uma nucleosídeo difosfato quinase. Em *P. aeruginosa* foi descrito que o gene *ndk* está envolvido em virulência, e o mutante nulo sem esse gene tem a diminuição da síntese de elastases, proteases, piocianina e do sideróforo pioverdina (YU *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2017). Assim, para essa mutação, há a possibilidade de que o gene *ndk* tenha um papel semelhante ao de *P. aeruginosa*, podendo estar relacionado com fatores de virulência. Outra possibilidade é que a inserção do transposon teve efeito polar e prejudicou a transcrição dos genes que estão em possível operon com *ndk*, dentre os quais o gene CV_3539 que codifica uma proteína hipotética com um domínio HTH de ligação ao DNA, podendo assim ser um regulador agindo como um ativador da síntese do sideróforo. Em um estudo em *Mycobacterium tuberculosis* foi descrito que o mutante *hupB* apresentava níveis diminuídos da síntese de sideróforos, e a proteína HupB foi capaz de se ligar a região promotora do gene de síntese do sideróforo regulando sua síntese positivamente (PANDEY *et al.*, 2014).

Já na linhagem mutante com fenótipo de aumento da produção de sideróforo, a inserção do transposon foi no gene CV_1057 o qual codifica uma proteína hipotética com um domínio HTH de ligação ao DNA, o que o caracterizaria como um regulador que agiria reprimindo a síntese do sideróforo. Surpreendentemente, ambos os possíveis reguladores (CV_3539 e CV_1057) apresentaram o motivo HTH da mesma superfamília (Cro) e da mesma família (SinR), levantando a possibilidade de termos um ativador e um repressor para a síntese de sideróforo que sejam da mesma família de reguladores ainda não associada a controle de homeostase de ferro. Esses achados levam a acreditar que em *C. violaceum* pode haver outros reguladores para a homeostase de ferro, além de Fur, cujo papel já vem sendo investigado em nosso laboratório. Esses reguladores poderiam estar agindo de forma mais localizada na síntese de sideróforos ou ser reguladores mais globais agindo em diferentes funções bacterianas. Recentemente, em *Xanthomonas campestris* foi descrito um regulador global chamado XibR da família NtrC que positivamente regula a motilidade e a captação e armazenamento de ferro, e negativamente regula a síntese de sideróforos em resposta aos níveis de ferro, além de ter relação com a virulência bacteriana (PANDEY *et al.*, 2016). Esse estudo mostra que em uma bactéria pode haver mais de um regulador global que responde aos níveis de ferro e não apenas Fur (PANDEY *et al.*, 2016). Portanto, são necessários mais estudos para caracterizar esses genes codificando possíveis fatores de transcrição, de modo a entender se eles atuam como reguladores mais globais ou se os mesmos agem de forma local na síntese de sideróforos, além de verificar qual seria a relação desses reguladores com o regulador Fur, expandindo assim a compreensão de como ocorre a regulação da maquinaria de homeostase de ferro em *C. violaceum*.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho identificamos e caracterizamos as vias de síntese e captação de sideróforos de *Chromobacterium violaceum*, além de determinar que essas moléculas têm papel na patogenicidade desta bactéria. As principais conclusões do trabalho foram:

- ✓ A bactéria *C. violaceum* é capaz de produzir sideróforos endógenos, provavelmente dois sideróforos do tipo catecolato, cuja síntese é dependente do precursor 2,3-DHBA e de duas enzimas NRPSs, pois nos ensaios para verificar a produção de sideróforo somente ocorreu a perda dos mesmos na falta do operon de síntese do precursor (CV_1485-84-83-82) e de ambas NRPSs (CV_1486 e CV_2233);
- ✓ Os sideróforos de *C. violaceum* são captados por dois RDTBs diferentes, sendo o sideróforo sintetizado via NRPS CV_1486 captado pelo RDTB CV_1491 e o sideróforo produzido via NRPS CV_2233 captado pelo RDTB CV_2230, uma vez que os mutantes sem estes RDTBs apresentaram acúmulo de sideróforo no meio externo;
- ✓ Além de seus sideróforos endógenos, *C. violaceum* é capaz de utilizar sideróforos do tipo catecolato produzidos por outras bactérias, provavelmente via o RDTB CV_1491, como determinado em ensaios de estimulação do crescimento;
- ✓ A produção e captação de sideróforos são importantes para o crescimento de *C. violaceum* em situações de limitação de ferro, pois mutantes deficientes nestas maquinarias apresentaram atraso no crescimento em carência deste metal;
- ✓ Ambos os sideróforos de *C. violaceum* são necessários durante a infecção por essa bactéria, uma vez que somente os mutantes que não produzem ou não captam qualquer destes sideróforos foram menos virulentos do que a linhagem selvagem em ensaios de infecção em camundongos;
- ✓ O acúmulo de sideróforos no hospedeiro leva a diminuição da produção de NET por neutrófilos fazendo com que haja um balanço na resposta imune beneficiando o hospedeiro contra a infecção, pois o mutante que não capta ambos sideróforos de *C. violaceum* é bastante atenuado para virulência e induz menor produção de NET em ensaios com neutrófilos *in vitro*;
- ✓ Em *C. violaceum* deve haver outros reguladores envolvidos na homeostase de ferro além de Fur, uma vez que a varredura de mutantes de transposon mostrou a mudança na produção de sideróforos em mutantes de possíveis fatores de transcrição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAMED, H.; LAWRENCE, M. L.; KARSI, A. The role of *Edwardsiella ictaluri* TonB mutant in *Edwardsiella ictaluri* virulence. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–8, 2017.
- ADLER, C. *et al.* The alternative role of enterobactin as an oxidative stress protector allows *Escherichia coli* colony development. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2014.
- ANDREWS SC, ROBINSON AK, RODRIGUEZ-QUINONES F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 27, n. 2-3, p. 215-237, 2003.
- BAARS, O; *et al.* The siderophore metabolome of *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n.1, p. 03160-15, 2015.
- BABYKIN MM, OBANDO TSA, ZINCHENKO VV. TonB-Dependent utilization of dihydroxamate xenosiderophores in *Synechocystis* sp . PCC 6803. **Current Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 117-123, 2018.
- BALHESTEROS, H; *et al.* TonB-dependent heme/hemoglobin utilization by *Caulobacter crescentus* HutA. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 6, p. 00723-16, 2017.
- BANIN, E; *et al.* The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 43, p. 16761–16766, 2008.
- BARBER MF, ELDE NC. Buried treasure: evolutionary perspectives on microbial iron piracy. **Trends Genet**, v. 31, n. , p. 627-636, 2015.
- BATISTA, JH.; DA SILVA NETO, JF. *Chromobacterium violaceum* pathogenicity: Updates and insights from genome sequencing of novel *Chromobacterium* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. nov, p. 1–7, 2017.
- BILITEWSKI, U; *et al.* Chemical and biological aspects of nutritional immunity—perspectives for new anti-infectives that target iron uptake systems. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 46, p. 14360–14382, 2017.
- BRAUN V, HANTKE K. Recent insights into iron import by bacteria. **Curr. Opin. Chem. Biol**, v. 15, n. 2,p. 328-334, 2011.
- BRAUN V, MAHREN S. Transmembrane transcriptional control (surface signalling) of the *Escherichia coli* Fec type. **FEMS Microbiol. Ver**, v. 29, n. 4, p. 673-684, 2005.
- BURNSIDE DM, WU Y, SHAFIAIE S, CIANCOTTO NP. The *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin is a polycarboxylate that is identical in structure to rhizoferrin. **Infect. Immun**, v. 83, n. 10, p. 3937-3945, 2015.
- CARPENTER BM, WHITMIRE JM, MERRELL DS. This is not your mother's repressor: the complex role of Fur in pathogenesis. **Infect. Immun**, v. 77, n. 7, p. 2590-2601, 2009.
- CASSAT JE, SKAAR EP. Iron in infection and immunity. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 5, p. 509-519, 2013.

- CHALLIS GL. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. **ChemBiochem**, v. 6, n. 4, p. 601-611, 2005.
- CHATTERJEE, S.; SONTI, R. V. *rpfF* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 15, n. 5, p. 463–471, 2002.
- CHEN, W.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 9, p. 2260, 1993.
- CHENG, O. Z.; PALANIYAR, N. NET balancing: A problem in inflammatory lung diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JAN, p. 1–13, 2013.
- CHU BC, *et al.* Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. **Biometals**, v. 23, n. 4, p. 601-611, 2010.
- CROSA JH, WALSH CT. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 66, n. 2, p. 223-249, 2002.
- DA SILVA NETO JF, BRAZ VS, ITALIANI VC, MARQUES MV. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 14, p. 4812-4825, 2009.
- DA SILVA NETO, J. F.; NEGRETTO, C. C.; NETTO, L. E. S. Analysis of the organic hydroperoxide response of *Chromobacterium violaceum* reveals that OhrR is a cys-based redox sensor regulated by thioredoxin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- DE SIQUEIRA IC, *et al.* *Chromobacterium violaceum* in Siblings, **Brazil. Emerg. Infect. Dis**, v. 11, n. 9, p. 1443-1445, 2005.
- DÍAZ PÉREZ JA, GARCÍA J, RODRIGUEZ VILLAMIZAR LA. Sepsis by *Chromobacterium violaceum*: first case report from Colombia. **Brazilian J. Infect. Dis**, v. 11, p. 441–442, 2007.
- DORRESTEIN, P. C.; KELLEHER, N. L. Dissecting non-ribosomal and polyketide biosynthetic machineries using electrospray ionization Fourier-Transform mass spectrometry. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 6, p. 893, 2006.
- DRAKESMITH, H; PRENTICE, AM. Hepcidin and the iron-infection axis. **Science**, v. 338, n. 6108, p. 768–772, 2012.
- DUMAS, Z.; ROSS-GILLESPIE, A.; KUMMERLI, R. Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1764, p. 20131055–20131055, 2013.
- DURAN N, MENCK CF. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Crit. Rev. Microbiol**, v. 27, n. 3, p. 201-222, 2001.
- DURÁN, N; *et al.* Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-lts

- main secondary metabolite: A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, 2016.
- FARALDO-GOMEZ JD, SANSOM MS. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 4, n. 2, p. 105-116, 2003.
- FERREIRA, D. *et al.* Targeting human pathogenic bacteria by siderophores: A proteomics review. **Journal of Proteomics**, v. 145, p. 153–166, 2016.
- FILLAT MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 546, p. 41-52, 2014.
- GANZ, T; NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **National Review of Immunology**, v. 15, n. 8, p. 500–510, 2015.
- GARÉNAUX, A.; CAZA, M.; DOZOIS, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 89–98, 2011.
- GIESSEN, T. W. *et al.* Isolation, structure elucidation, and biosynthesis of an unusual hydroxamic acid ester-containing siderophore from *Actinosynnema mirum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 905–914, 2012.
- GÓRSKA, A.; SLODERBACH, A.; MARSZAŁŁ, M. P. Siderophore-drug complexes: Potential medicinal applications of the “Trojan horse” strategy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 9, p. 442-9, 2014.
- GRANGEIRO TB, *et al.* Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Genet. Mol. Res**, v. 3, n. 1, p. 117-133, 2004.
- HAGIYA, H. *et al.* *Chromobacterium violaceum* nosocomial pneumonia in two Japanese patients at an intensive care unit. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 2, p. 139–142, 2014.
- HAN, A. W. *et al.* Turnerbactin, a novel triscatecholate siderophore from the shipworm endosymbiont *Teredinibacter turnerae* T7901. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.
- HANAHAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol**, v. 166, n. 4, p. 557, 1983.
- HANTKE K. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. **Mol. Gen. Genet**, v. 182, n. 2, p. 288-292, 1981.
- HASTIE, J. L.; HANNA, P. C.; CARLSON, P. E. Transcriptional response of *Clostridium difficile* to low iron conditions. **Pathogens and Disease**, v. 76, n. 2, p. 1–5, 2018.
- HOOD MI, SKAAR EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 525-537, 2012.
- HORIYAMA, T.; NISHINO, K. AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

- HUNGRIA M, *et al.* Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genet. Mol. Res**, v. 3, n. 1, p. 102-116, 2004.
- IMLAY JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 11, n. 7, p. 443-454, 2013.
- JACOBS, M. A. *et al.* Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14339–14344, 2003.
- JIN B, *et al.* Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. **Mol. Microbiol**, v. 59, n. 4, p. 1185-1198, 2006.
- KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. **Microbiological Research**, n. October, p. 0–1, 2017.
- KREWULAK KD, VOGEL HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, n. 9, p. 1781-1804, 2008.
- KUMAR R. *Chromobacterium violaceum* : A rare bacterium isolated from a wound over the scalp. **Int. J. Appl. Basic Med. Res**, v. 2, n. 1, p. 70-72, 2012.
- LAU CKY, KREWULAK KD, VOGEL HJ. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. **FEMS Microbiol. Rev**, v. 40, n. 2, p. 273-298, 2015.
- LEE JW, HELMANN JD. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. **BioMetals**, v. 20, n. 3-4, p. 485-499, 2007.
- LIMA-BITTENCOURT CI *et al.* Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 58, 2007.
- LIN, J. *et al.* A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–12, 2017.
- LIU, M. F. *et al.* Identifying the Genes Responsible for Iron-Limited Condition in *Riemerella anatipestifer* CH-1 through RNA-Seq-Based Analysis. **BioMed Research International**, 2017.
- LIU, Z. *et al.* Regulation of mammalian siderophore 2,5-DHBA in the innate immune response to infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 6, p. 1197–1213, 2014.
- LLAMAS MA, IMPERI F, VISCA P, LAMONT IL. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. **FEMS Microbiol. Rev**, v. 38, n. 4, p. 569-597, 2014.
- LU, F. *et al.* The role of TonB-dependent receptor TbdR1 in *Riemerella anatipestifer* in iron acquisition and virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3–4, p. 713–718, 2013.

- MALTEZ VI, *et al.* Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium. **Immunity**, v. 43, n. 5, p. 987-997, 2015.
- MALTEZ VI, MIAO EA. Reassessing the evolutionary importance of inflammasomes. **J. Immunol**, v. 196, n. 3, p. 956-962, 2016.
- MASSÉ E, GOTTESMAN S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 7, p. 4620-4625, 2002.
- MCCLEAN KH, *et al.* Quorum-sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiol**, v. 143, n. 13, p. 3703-3711, 1997.
- MIETHKE M, MARAHIEL MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.
- MIKI T, *et al.* *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. **Mol. Microbiol**, v. 77, n. 4, p. 855-872, 2010.
- MIKI T, *et al.* The *Chromobacterium violaceum* type III effector CopE, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42, is involved in bacterial invasion of epithelial cells and pathogenesis. **Mol. Microbiol**, v. 80, n. 5, p. 1186-1203, 2011.
- MINANDRI, F. *et al.* Role of iron uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 8, p. 2324–2335, 2016.
- NOINAJ N, GUILLIER M, BARNARD TJ, BUCHANAN SK. TonB-Dependent transporters: Regulation, structure, and function. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 64, p. 43-60, 2010.
- OBANDO, T. A.; BABYKIN, S. M. M.; ZINCHENKO, V. V. A cluster of five genes essential for the utilization of dihydroxamate xenosiderophores in *Synechocystis* sp . PCC 6803. **Current Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.
- OGLESBY-SHERROUSE AG, MURPHY ER. Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. **Metallomics**, v. 5, n. 4, p. 267-406, 2013.
- PANDEY, A.; SONTI, R. V. Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3187–3203, 2010.
- PANDEY, S. D. *et al.* Iron-regulated protein HupB of *Mycobacterium tuberculosis* positively regulates siderophore biosynthesis and is essential for growth in macrophages. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 10, p. 1853–1865, 2014.
- PANDEY, S. S. *et al.* Co-regulation of iron metabolism and virulence associated functions by iron and XibR, a novel iron binding transcription factor, in the plant pathogen *Xanthomonas*. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1–39, 2016.

- PANDEY, S. S. *et al.* Xanthoferrin, the α -hydroxycarboxylate-type siderophore of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, is required for optimum virulence and growth inside cabbage. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 7, p. 949–962, 2017.
- PARROW NL, FLEMING RE, MINNICK MF. Sequestration and scavenging of iron in infection. **Infect. Immun**, v. 81, n. 10, p. 3503-3514, 2013.
- PORCHERON GI, DOZOIS CM. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. **Vet. Microbiol**, v. 179, n. 1-2, p. 2-14, 2015.
- PREVIATO-MELLO, M. *et al.* Global transcriptional response to organic hydroperoxide and the role of OhrR in the control of virulence traits in *Chromobacterium violaceum*. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 8, p. 1–18, 2017.
- RAKIN, A.; SCHNEIDER, L.; PODLADCHIKOVA, O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. November, p. 1–7, 2012.
- REITZ, Z. L.; SANDY, M.; BUTLER, A. Biosynthetic considerations of triscatechol siderophores framed on serine and threonine macrolactone scaffolds. **Metallomics**, v. 9, n. 7, p. 824-839, 2017.
- ROLFE, M. D. *et al.* Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, 2012.
- SAHA, P. *et al.* Bacterial Siderophores Hijack Neutrophil Functions. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 11, p. 4293–4303, 2017.
- SAMBROOK J, RUSSELL D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHAIBLE UE, KAUFMANN SHE. Iron and microbial infection. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 2, n. 12, p. 946-953, 2004.
- SCHALK, I. J. A Trojan-Horse strategy including a bacterial suicide action for the efficient use of a specific gram-positive antibiotic on gram-negative bacteria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 9, p. 3842–3844, 2018.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.
- SEO, S. W. *et al.* Deciphering fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*. **Nature Communications**, v. 5, n. 4910, 2014.
- SHELDON, J. R.; LAAKSO, H. A.; HEINRICHS, D. E. Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 2, p. 43-85., 2016.

- SIA AK, ALLRED BE, RAYMOND KN. Siderocalins: Siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 17, n. 2, p. 150-157, 2013.
- SIMON R, PRIEFFER U, PUHLER A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 784-790, 1983.
- SINGH, M.; CHAUDHARY, S.; SAREEN, D. Non-ribosomal peptide synthetases: Identifying the cryptic gene clusters and decoding the natural product. **Journal of Biosciences**, v. 42, n. 1, p. 175–187, 2017.
- STAUFF DL, BASSLER BL. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. **J. Bacteriol**, v. 193, n.15, p. 3871-3878, 2011.
- SWAIN, B. Urinary tract infection by *Chromobacterium Violaceum*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 8, p. 6–7, 2014.
- TAKASE, H. *et al.* Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 1834–1839, 2000a.
- TAKASE, H. *et al.* Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene for high-affinity iron acquisition and infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4498–4504, 2000b.
- THODE, S. K. *et al.* The immediate global responses of *Aliivibrio salmonicida* to iron limitations. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.
- TORRES, A. G. *et al.* TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: Aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 10, p. 6179–6185, 2001.
- VARTOUKIAN, S. R. *et al.* *In vitro* cultivation of ‘unculturable’ oral bacteria, facilitated by community culture and media supplementation with siderophores. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2016.
- VASCONCELOS ATR, *et al.* The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 20, p. 11660-11665, 2003.
- VISSER, M. B. *et al.* Importance of the ornibactin and pyochelin siderophore transport systems in *Burkholderia cenocepacia* lung infections. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 5, p. 2850–2857, 2004.
- WANDERSMAN C, DELEPELAIRE P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 58, p. 611-647, 2004.
- WANDERSMAN C, DELEPELAIRE P. Haemophore functions revisited. **Mol. Microbiol**, v. 85, n. 4, p. 618-631, 2012.

- WEBER, T; *et al.* antiSMASH 3.0— a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. May, p. 237–243, 2015.
- WEINBERG ED. Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. **JAMA**, v. 231, n. 1, p. 39-41, 1975.
- WYCKOFF EE, ALLRED BE, RAYMOND KN, PAYNE SM. Catechol siderophore transport by *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol**, v. 197, n. 17, p. 2840-2849, 2015.
- YANG CH, LI YH. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection. **J. Chinese Med. Assoc**, v. 74, n. 10, p. 435-441, 2011.
- YU, H. *et al.* Ndk, a novel host-responsive regulator, negatively regulates bacterial virulence through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- YU, H.; RAO, X.; ZHANG, K. Nucleoside diphosphate kinase (Ndk): A pleiotropic effector manipulating bacterial virulence and adaptive responses. **Microbiological Research**, v. 205, n. June, p. 125–134, 2017.
- ZAPPA, S.; BAUER, C. E. The LysR-type transcription factor HbrL is a global regulator of iron homeostasis and porphyrin synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1277–1292, 2013.
- ZHANG, S. R.; ZHANG, L.; SUN, L. Identification and analysis of three virulence associated TonB-dependent outer membrane receptors of *Pseudomonas fluorescens*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 110, n. 3, p. 181–191, 2014.
- ZHAO Y, *et al.* The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 596-600, 2011.