

NAARA MARCONDES DOS SANTOS

**ESTUDO DO TRANSPORTE DE FERRO**  
**EM *CAULOBACTER CRESCENTUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo  
2019

NAARA MARCONDES DOS SANTOS

**ESTUDO DO TRANSPORTE DE FERRO EM *CAULOBACTER*  
*CRESCENTUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Marilis do Valle Marques

Versão Original

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Marcondes dos Santos, Naara  
Estudo do transporte de ferro em *Caulobacter  
crescentus* / Naara Marcondes dos Santos;  
orientadora Marilis do Valle Marques. -- São  
Paulo, 2019.  
133 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. ferro. 2. sideróforos. 3. transporte de ferro.  
4. receptores dependentes de TonB. 5. *Caulobacter  
crescentus* . I. do Valle Marques, Marilis ,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Naara Marcondes dos Santos

Título da Dissertação/Tese: Estudo do transporte de ferro em *Caulobacter crescentus*

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marilis do Valle Marques

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

**Aprovado(a)**                       **Reprovado(a)**

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....





Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **844/2016** referente ao projeto intitulado: "**Estudo do transporte de ferro em *Caulobacter crescentus***" sob a responsabilidade de **Naara Marcondes dos Santos** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Marilis do Valle Marques**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 22 de novembro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**  
Coordenador CEPSH ICB/USP

Declaro, para os devidos fins, que

**Naara Marcondes dos Santos**

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos",  
realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 30 março 2016  
(Declaração válida por 5 anos)



**Helayne Freitas**  
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos



**Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt**  
Diretor do ICB

Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos"

1ª aula:

Orientações Gerais  
FISPQ- Ficha de Segurança de Produto Químico  
Armazenamento de Produtos Químicos

2ª aula:

Manuseio de Produtos Químicos  
Equipamentos de Proteção Individual e Coletivo  
Prevenção de Acidentes

3ª aula:

Resíduos Químicos  
Produtos Químicos Controlados  
Tarefas dos Laboratórios do ICB

À Rute, Galdina (*in memoriam*) e Antônia  
(*in memoriam*) as mulheres que me  
ensinaram a sonhar, amar e conquistar em  
um mundo onde mulheres não são ouvidas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus porque Dele e por Ele são todas as coisas, pela dádiva da vida e por me permitir realizar os sonhos do meu coração, por seu infinito amor e misericórdia que me acompanham todos os dias da minha vida, e pela oportunidade de viver essa etapa me capacitando e fortalecendo a cada dia.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilis do Valle Marques pela oportunidade, orientação, paciência, acessibilidade e dedicação aos seus alunos e por todas as conversas enriquecedoras.

Aos professores Dr.<sup>a</sup> Andrea Balan, Dr.<sup>a</sup> Cristina E. A. Martinez e Dr. Welington Luiz de Araujo, por todas as sugestões e críticas em minha qualificação. E novamente a Prof.<sup>a</sup> Andrea Balan, por todos os conselhos e discussões na parte de proteínas.

Aos professores Dr. Phillip Klebba e Dr.<sup>a</sup> Salete Newton pela colaboração e pelas discussões para a realização deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Charlotte Borda pela a orientação durante minha graduação e por ser a primeira pessoa a me inspirar na biologia molecular e ciência.

Aos meus pais Ezequiel e Rute pela vida, carinho, dedicação, apoio e todo esforço que fizeram e fazem para que hoje eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão Felipe por toda a cumplicidade, carinho, amor e por ser um alicerce pra mim nesta vida. À minha cunhada Caroline pelo afeto e pela grande amizade que construímos durante todos esses anos.

À minha prima/irmã Ana Paula por estar ao meu lado desde nossos nascimentos, vivendo juntas as melhores aventuras, por me amparar em todos os momentos e por me presentear com minha afilhada.

Aos meus sobrinhos Davi, Miguel, Matheus e minha afilhada Lis por trazerem alegria a minha vida e por dividirem comigo seus sorrisos que enchem meu coração de ternura, amor e gratidão.

As minhas famílias Marcondes e Souza, por todo apoio e amor recebido por cada tio(a)s e primo(a)s e por todos os momentos de diversão compartilhados.

Aos meus queridos e incríveis amigos que essa jornada me trouxe Alexandre, Hugo, Juliana Santos, Juliana Sato, Julia, Laura, Larissa, Lucas, Marina, Marco, Rodolfo e Frank, saibam que a melhor coisa foi fazer ciência ao lado de vocês regado com boas e verdadeiras risadas. Obrigada pelo muito que me ensinaram com as suas vidas e por sempre estarem por perto quando eu precisei tanto para resolver um cálculo, compartilhar um café ou um abraço em dias difíceis.

À minha terapeuta Marilda pela amizade e ajuda nos momentos mais angustiantes e por me ensinar a levar a vida de forma mais leve.

Ao meu melhor amigo Felipe Magoga por todos os longos anos de amizade, amor, cumplicidade, carinho e diversão compartilhados e por todas as boas risadas sempre que estamos juntos.

À Larissa Gomes e Caio Samos por toda amizade e imenso apoio que sempre me deram e por serem as pessoas que possuem os maiores corações que já conheci.

Aos meus amigos queridos amigos Anderson, Gabriela, Jaine, Ligia, Monique, Samara e muitos outros pelos longos anos de amizade e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

À todas as mulheres da Hora Nona que sempre lembram de mim em suas orações.

À Iris e Carolina por toda a eficiência, conversas divertidas e apoio técnico imprescindível em todos os momentos.

À secretária Gisele pela amizade construída durante essa jornada e por toda imensa ajuda dada a mim.

À minha fiel companheira Lilica por toda a diversão e cumplicidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (processo nº 2017/02127 - 9) e à CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“All nature and science follow the sound of Your voice”  
So Will I (100 Billion X) – Hillsong United

## RESUMO

SANTOS, N. M. **Estudo do transporte de ferro em *Caulobacter crescentus***, 2019. N° 133 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

*Caulobacter crescentus* é uma  $\alpha$ -proteobacteria oligotrófica que vive em ambientes aquáticos e pode colonizar ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes, sofrendo constantemente com a carência nutricional. Os transportadores dependentes de TonB (TBDT) realizam o transporte de ferro ligado a sideróforos através da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Quando *C. crescentus* se encontra em carência de ferro, quatro TBDTs são altamente expressos, sendo eles codificados por CCNA\_00138, CCNA\_00028, CCNA\_03023 e CCNA\_02277 (*HutA*). *C. crescentus* NA1000 apresenta ainda em seu genoma dois genes que codificam proteínas TonB (CCNA\_02419 e CCNA\_02412), que são os componentes energizadores do transporte. Este trabalho buscou elucidar qual fonte de ferro é transportada por cada um destes quatro receptores e o papel de cada uma das proteínas TonB. Uma análise de sequências de aminoácidos entre os TBDTs mostrou que essas proteínas apresentam sequências pouco conservadas entre elas, diferentemente das proteínas TonB, que apresentam uma alta conservação. Uma análise estrutural foi efetuada por modelagem para todas as proteínas estudadas a fim de se caracterizar essas proteínas em *C. crescentus*, e foi possível identificar algumas regiões conservadas nos TBDTs, como o TonB Box e *plug*. Foram construídas linhagens mutantes para os seis genes codificando os TBDT e as proteínas TonB de *C. crescentus*. Para a análise fenotípica desses mutantes realizamos ensaios de crescimento e de viabilidade em diferentes fontes de ferro, onde somente o  $\Delta$ 00028 apresentou um crescimento diferente quando comparado a linhagem selvagem NA1000, e pode estar envolvido com transporte de íons férricos. As linhagens  $\Delta$ *tonB* não apresentaram nenhuma diferença de crescimento perante as fontes de ferro testadas, mas ensaios de crescimento em placas na presença de diferentes fontes de carbono mostraram crescimento diferente entre as linhagens mutantes e selvagens, em algumas dessas fontes. Mutações sitio-dirigidas no gene *hutA* foram realizadas alterando alguns aminoácidos para cisteína, para futuramente verificar quais seriam os aminoácidos nos *loops* importantes para o reconhecimento e transporte do sideróforo.

**Palavras-chave:** *Caulobacter crescentus*, ferro, sideróforos, receptores dependentes de TonB, sistema TonB-ExbB-ExbD.



## ABSTRACT

SANTOS, N. M. **Study of iron transport in *Caulobacter crescentus***, 2019. No. 133 f. Dissertation (Master in Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2019.

*Caulobacter crescentus* is an oligotrophic  $\alpha$ -proteobacterium that lives in aquatic environments and can colonize environments with little availability of nutrients constantly suffering from nutritional deficiency. TonB dependent transporters (TBDT) transport iron bound to siderophores through the outer membrane of Gram-negative bacteria. When *C. crescentus* is in iron deficiency, four TBDT are highly expressed, encoded by CCNA\_00138, CCNA\_00028, CCNA\_03023, and CCNA\_02277 (*HutA*). *C. crescentus* NA1000 presents in its genome two genes encoding TonB proteins (CCNA\_02419 and CCNA\_02412), which are the energizing components of the transport. This work aimed to elucidate which iron source is transported by each of these four receptors and the role of each of the TonB proteins. Amino acid sequence analyses of the TBDTs showed that these proteins present little conservation among them, unlike the TonB proteins that present high conservation. A structural analysis was carried out by modeling all studied proteins in order to characterize these proteins in *C. crescentus*, and it was possible to identify some conserved regions in the TBDTs, such as the TonB box and the plug. Mutant strains were constructed for the six *C. crescentus* genes encoding TBDT and TonB proteins. In the phenotypic analysis of these mutants, growth and viability assays were carried out in different iron sources, and only  $\Delta$ 00028 presented a different growth pattern when compared to the NA1000 wild type strain, and could have a role in transporting ferric ions. The  $\Delta$ tonB strains did not show any difference in growth with the iron sources tested, but growth assays in plates with different carbon sources, showed differences in growth between mutant and wild type strains, for some of the sources. Site-directed mutagenesis in *hutA* we carried out substituting some residues for Cysteine, in order to verify which amino acids in the loops are important for siderophore recognition and transport.

**Keywords:** *Caulobacter crescentus*, iron, siderophores, TonB-dependent receptors, TonB-ExbB-ExbD system.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplo representativo dos diferentes grupos de sideróforos .....	23
Figura 2 - Representação dos transportadores dependentes de TonB (TBDT) .....	26
Figura 3 - Esquema do modelo do sistema TonB-ExbB-ExBD .....	28
Figura 4 - Representação do ciclo celular de <i>C. crescentus</i> .....	31
Figura 5 - Localização dos genes TonBs de <i>C. crescentus</i> .....	34
Figura 6 - Esquema da construção dos mutantes .....	43
Figura 7 - Obtenção do cassete de espectinomicina .....	44
Figura 8 - Representação dos aminoácidos conservados no domínio TonB Box .....	50
Figura 9 - Alinhamento das sequências de aminoácidos dos genes CCNA_02419 (TonB1) e CCNA_02412 (TonB2) de <i>C. crescentus</i> .....	53
Figura 10 - Modelagem dos transportadores dependentes de TonB (TBDT) de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	55
Figura 11 - Modelos das proteínas TonB de <i>C. crescentus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	57
Figura 12 - Comparação entre as proteínas TonB de <i>C. crescentus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	59
Figura 13 - Confirmação por digestão das inserções dos fragmentos 1 e 2 no vetor pNPTS138. (1) receptores dependentes de TonB TBDTs .....	61
Figura 14 - Esquema representativo da clonagem dos fragmentos 1 e 2 no plasmídeo pNPTS138 para a construção das linhagens mutantes de cada TBDT .....	63
Figura 15 - Confirmação da deleção dos TBDTs por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	64
Figura 16 - Verificação das linhagens com o gene CCNA_00138 possivelmente deletado pela metodologia de Southern <i>blotting</i> .....	65
Figura 17 - Verificação das linhagens com o gene CCNA_00028 possivelmente deletado pela metodologia de Southern <i>blotting</i> .....	66
Figura 18 - Confirmação da adição da marca de resistência .....	68
Figura 19 - Representação e confirmação da deleção do gene CCNA_02419 por Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) .....	69
Figura 20 - Representação e confirmação da deleção do gene CCNA_02412 por Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) .....	70

<b>Figura 21 - Confirmação por digestão da clonagem para complementação no vetor pMR20 .....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 22 - Curva de crescimento das linhagens selvagem NA1000 e mutantes (<math>\Delta</math>00138, <math>\Delta</math>03023 e <math>\Delta</math>00028) em diferentes fontes de ferro .....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 23 - Curva de crescimento das linhagens selvagem NA1000 e linhagens complementadas (<math>\Delta</math>00138, <math>\Delta</math>03023 e <math>\Delta</math>00028) em diferentes fontes de ferro .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 24 - Curva de crescimento das linhagens selvagem NA1000 e mutantes (<math>\Delta</math>TonB1 e <math>\Delta</math>TonB2) em diferentes fontes de ferro .....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 25 - Ensaio de viabilidade das linhagens mutantes <math>\Delta</math>00138, <math>\Delta</math>00028 e <math>\Delta</math>03023 na presença de diversas fontes de ferro .....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 26 - Ensaio de viabilidade com as linhagens mutante <math>\Delta</math>00028, complementada (<math>\Delta</math>00028Comp) e selvagem NA1000 .....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 27 - Ensaio de viabilidade com as linhagens mutantes <math>\Delta</math>TonB1 e <math>\Delta</math>TonB2 .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 28 - Representação esquemática do perfil de crescimento observado em microplacas PM1 Biolog .....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 29 - Representação esquemática do perfil de crescimento observado em microplacas PM2A Biolog .....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 30 - Gráfico de comparação das linhagens NA1000 e <math>\Delta</math>TonB1 .....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 31 - Gráfico de comparação das linhagens NA1000 e <math>\Delta</math>TonB2 .....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 32 - Modelagem da estrutura da proteína HutA de <i>C. crescentus</i> .....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 33 - Representação da confirmação das mutações sitio-dirigidas em HutA .....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 34 - Confirmação da clonagem no plasmídeo pMR20 .....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Sideróforos do tipo hidroxamato que são utilizados por <i>C. crescentus</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 2 - Linhagens de <i>C. crescentus</i> utilizadas .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 3 - Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 4 - Plasmídeos utilizados .....</b>	<b>38 e 39</b>
<b>Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 6 – Porcentagem de identidade entre os quatros transportadores de <i>E. coli</i> e dois de <i>P. aeruginosa</i> com relação aos de <i>C. crescentus</i> mediante comparação das sequências de aminoácidos .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: *ATP-binding cassette*

Ap: ampicilina

ATP: adenosina trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPS: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO<sub>600</sub>: densidade óptica a 600 nanômetros

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

Km: canamicina

kb: quilobase(s)

LB: Luria – Bertani

M: Molar

mRNA: RNA mensageiro

<sup>R</sup>: resistente

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

<sup>S</sup>: sensível

PCR: reação em cadeia da polimerase

Tc: Tetraciclina

TBDT: transportadores dependentes de TonB

UFC: unidade formadora de colônias

ΩSpec: cassete de resistência e espectinomicina e estreptomicina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 Homeostase de ferro em bactérias .....	20
1.2 Captação e armazenamento de ferro .....	21
1.3 Transportadores dependentes de TonB (TBDT) .....	24
1.4 Sistema TonB-ExbB- ExbD .....	27
1.5 Regulação gênica dependente de ferro .....	29
1.6 <i>Caulobacter crescentus</i> .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 Análise <i>in silício</i> dos domínios presentes nos receptores dependentes de TonB e das proteínas TonBs de <i>C. crescentus</i> .....	36
3.2 Análise estrutural dos receptores dependentes de TonB e das proteínas TonBs de <i>C. crescentus</i> .....	36
3.3 Linhagens bacterianas e condições de crescimento .....	36
3.4 Plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados .....	38
3.5 Extração de DNA cromossômico de <i>C. crescentus</i> .....	41
3.6 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese .....	41
3.7 PCR de Colônia .....	42
3.8 Construção das linhagens mutantes .....	42
3.9 <i>Southern blotting</i> .....	44
3.10 Transformação de células competentes por eletroporação .....	45
3.11 Extração de DNA plasmidial .....	45
3.12 Conjugação .....	45
3.13 Construção das linhagens complementadas .....	45
3.14 Ensaios de crescimento .....	46
3.15 Mutações sítio-dirigidas da proteína HutA .....	46
3.16 Crescimento em placas Biolog .....	47
3.17 Ensaio de viabilidade .....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
4.1 Análise <i>in silício</i> dos domínios presentes nos transportadores dependentes de TonB de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	48

4.1.2	Análise <i>in silício</i> dos domínios presentes nas proteínas de TonB de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	51
4.2	Modelagem das proteínas do sistema TonB-ExbB-ExbD de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	53
4.2.1	Modelagem das proteínas de TonB de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	56
4.3	Obtenção das linhagens mutantes dos genes que participam do sistema TonB-ExbB-ExbD de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	60
4.3.1	Confirmação das linhagens mutantes .....	62
4.3.2	Complementação das linhagens com os genes que codificam os transportadores dependentes de TonB deletados .....	70
4.4	Análises fenotípicas das linhagens mutantes .....	72
4.4.1	Curvas de crescimento das linhagens construídas para os receptores dependentes de TonB (TBDTs) .....	72
4.4.2	Crescimento das linhagens complementadas dos TBDT de <i>C. crescentus</i> .....	75
4.4.3	Curvas de crescimento das linhagens construídas para as proteínas TonB .....	76
4.4.4	Ensaio de viabilidade .....	79
4.4.5	Análise das fontes de carbono utilizadas pelas linhagens mutantes para a proteína TonB .....	87
4.4.6	Mutações sítio-dirigidas em aminoácidos da proteína HutA .....	93
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>98</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>106</b>

## 1. INTRODUÇÃO

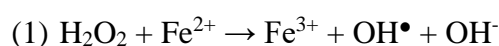
### 1.1 Homeostase de ferro em bactérias

Muitos nutrientes e minerais são necessários para a sobrevivência e manutenção das funções celulares, sejam elas em condições normais ou de estresse, como fósforo, enxofre, zinco e ferro. Esses nutrientes são importantes pois desempenham funções celulares tais como, por exemplo, o fósforo, que pode ser encontrado no íon fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e é essencial para a síntese dos ácidos nucleicos e de fosfolipídios que compõem a membrana celular; já o enxofre pode ser obtido através de fontes naturais que incluem o íon sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), e é utilizado para sintetizar aminoácidos e vitaminas, como a tiamina e biotina.

Por sua vez o ferro é o um metal abundante, sendo o quarto mais presente na superfície terrestre, disponibilizado em dois estados de oxidação diferentes. A forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) é solúvel, sendo encontrada somente em ambientes em anóxia ou em baixo pH, e é necessária em reações biológicas devido ao poder de oxido-redução. Já a forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é insolúvel e encontrada na presença de altas concentrações de oxigênio (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003)

Por ser um micronutriente essencial o ferro normalmente é utilizado como grupo prostético ou cofator de proteínas envolvidas em funções como fixação de nitrogênio, síntese de aminoácidos, ciclo do ácido cítrico e outros processos importantes como a biossíntese de DNA, respiração, transporte de oxigênio e produção de  $\text{H}_2$  (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; CHU et al., 2010). A incorporação do ferro em proteínas pode ser realizada de forma simples ou na forma de grupos heme e complexos ferro-enxofre (BEINERT; HOLM; MÜNCK;, 2007).

Embora o ferro possua um caráter vital para o crescimento e sobrevivência celular, o mesmo pode ocasionar prejuízo quando está presente em excesso. Isto está associado ao estresse oxidativo, gerado através da reação de Fenton (1), onde a forma reduzida do ( $\text{Fe}^{2+}$ ) reage com o peróxido de hidrogênio intracelular originando assim radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) que é capaz de danificar as proteínas, ácidos graxos e macromoléculas como o DNA ( REMES et al., 2014; TOUATI, 2000).





Devido a este viés o ferro é encontrado na célula ligado a proteínas ou outros ligantes para garantir a solubilidade do metal e simultaneamente evitando que ocorra a formação de radicais tóxicos. Porém, foi demonstrado em *Caulobacter crescentus* que a escassez de ferro dentro da célula também tem a capacidade de gerar estresse oxidativo e danos ao DNA, iniciando assim a ativação de outras vias de resposta ao estresse (LEADEN et al., 2018). Para garantir a segurança contra esses tipos de danos, é necessário manter assim um nível de ferro livre intracelular controlado (PI; HELMANN, 2017).

Apesar do ferro estar em grande quantidade na natureza, o ferro encontrado pelas bactérias em seu ambiente de crescimento não está prontamente disponível para ser utilizado. Em condições aeróbicas e pH neutro, o ferro oxidado está praticamente insolúvel sendo que a quantidade solúvel presente no ambiente não possui uma concentração necessária para sustentar a vida bacteriana (JOHNSTONE; NOLAN, 2015). Desta forma, os microrganismos necessitam criar estratégias para conseguir mobilizar o metal, utilizando sistemas de captação de ferro específicos que garantem a presença do metal e a adaptação em condições normais ou adversas.

## 1.2 Captação e armazenamento de ferro

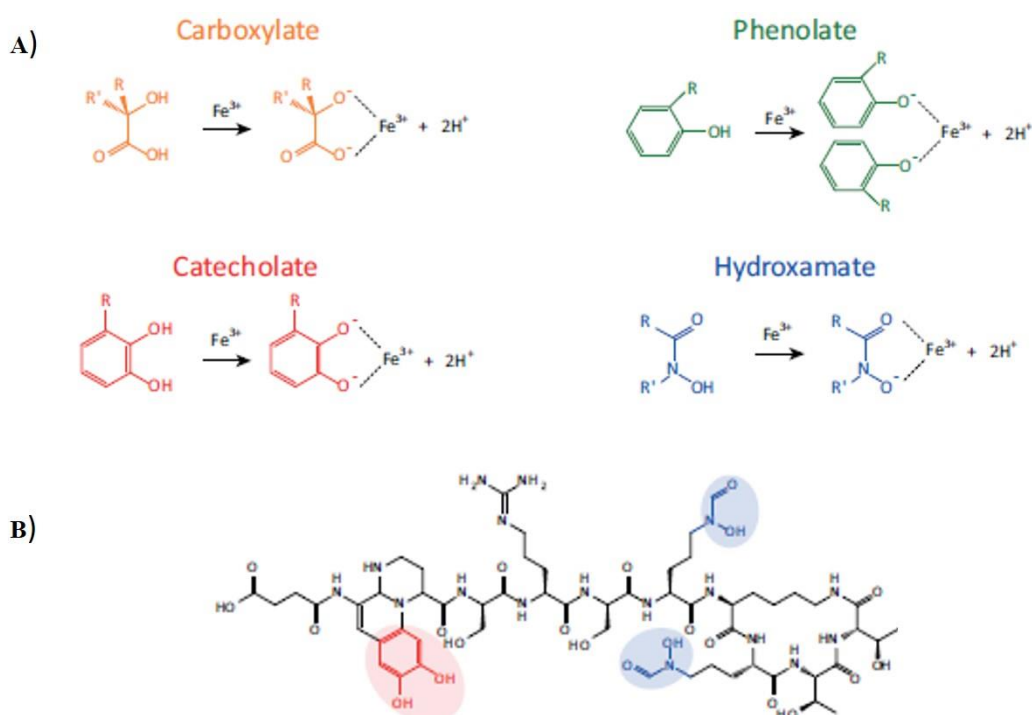
No decorrer do tempo, as bactérias foram desenvolvendo formas eficientes e estratégias para conseguir permanecer em ambientes instáveis e com pouca disponibilidade de nutrientes e metais, e assim conseguir realizar a captação de ambos. O ferro é encontrado no meio extracelular com pouca disponibilidade (que chega a ser cerca de  $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  M), porém para as bactérias conseguirem realizar seus processos metabólicos, fisiológicos e obter um crescimento ideal é requerido uma concentração de  $10^8$  M (KHAN; SINGH; SRIVASTAVA, 2017; SAHA et al., 2013). No caso de bactérias patogênicas a absorção de ferro pode ocorrer através de várias fontes de ferro encontradas no próprio hospedeiro como transferrina, lactoferrina, ferritina e hemeoproteínas (WINKELMANN, 2002).

Para sobreviver em ambientes de carência de ferro, ou seja, quando a concentração de ferro intracelular está abaixo de  $10^{-6}$  M, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas secretam pequenas biomoléculas que são chamadas de sideróforos, palavra originada do grego *sideros* (significa ferro) e *phores* (portador) (NAGOBA; VEDPATHAK, 2011). Os sideróforos são pequenas biomoléculas (200 – 2000 Da) que apresentem alta afinidade com o ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), sendo projetados para formar complexos estáveis com o íon de ferro e estão relacionados à sobrevivência de bactérias no solo e em ambientes aquáticos. Eles são essenciais para a virulência de muitos patógenos de animais (SAHA et al., 2013), sendo sintetizados e secretados

não somente por bactérias, mas também por fungos e plantas (AHMED; HOLMSTRÖM, 2014; SCHALK; HANNAUER; BRAUD, 2011).

É sabido que os sideróforos diferem um do outro devido a sua estrutura e propriedades, e foram descritos aproximadamente 500 sideróforos, sendo que até o momento 270 já foram bem caracterizados (SAHA et al., 2016). Baseado na sua natureza química, onde o principal é a ligações do oxigênio com o ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ), os sideróforos foram caracterizados e classificados em grupos sendo eles: Hidroxamatos, Catecolatos (ou Fenolatos) e Carboxilatos. Além desses grupos, um novo grupo foi descrito seguindo o mesmo princípio que os outros e recebendo o nome de 'Tipo Misto', que são sideróforos que realizam interações entre os três grupos, como por exemplo: Hidroxamatos com Catecolatos ou Catecolatos e Carboxilatos (Figura 1) (MIETHKE; MARAHIEL, 2007; WILSON et al., 2016).

Os hidroxamatos representam o maior grupo encontrado na natureza e também o maior grupo produzido e excretados pelos fungos. A ligação dos hidroxamatos com o ferro ocorre porque duas moléculas de oxigênio, presentes no hidroxamato, ligam-se ao íon férrico sendo capazes de formar um complexo octaédrico com  $\text{Fe}^{3+}$ . O grupo dos catecolatos é encontrado somente em bactérias e, semelhante aos hidroxamatos, também fornece dois átomos de oxigênio para a quelação do ferro. Bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae* são capazes de produzir enterobactina, um tipo de sideróforo pertencente ao grupo dos catecolatos onde se observa uma forte ligação com o ferro. Devido a essa forte afinidade, é possível obter a captação do ferro mesmo quando a sua concentração for extremamente baixa. Já os carboxilatos são produzidos por poucas bactérias, sendo produzido principalmente por *Rhizobium* e *Staphylococcus* e alguns fungos. Os carboxilatos, ao contrário dos outros dois grupos, possuem um grupo carboxila e hidroxila para a captação de ferro. Por fim, os sideróforos pertencentes ao grupo misto irão conter as características principais dos grupos que estão presentes (KHAN; SINGH; SRIVASTAVA, 2017; SAHA et al., 2016).



**Figura 1 – Exemplo representativo dos diferentes grupos de sideróforos.** (A) Demonstração das quatro regiões que atribuem a capacidade de ligação do ferro aos sideróforos: Carboxilato (laranja), Fenolatos (verde), Catecolato (vermelho) e Hidroxamato (azul). (B) Demonstração dos sideróforos de tipo misto que possuem mais de uma região de ligação ao ferro. Retirado de WILSON et al., 2016 .

A regulação da biossíntese dos sideróforos é realizada em resposta a uma deficiência de ferro intracelular. Porém, já foi observado que outros metais também podem induzir a produção de sideróforos mesmo o ferro estando em concentrações altas no ambiente, indicando que o possível transporte desses outros metais também é mediado pelos sideróforos, como é o caso do molibdênio que regula a produção do sideróforo azotochelina secretado por *Azotobacter vinelandii*, sendo eficaz na captação desse metal (SAHA et al., 2013).

A biossíntese dos sideróforos pode ser realizada de duas maneiras diferentes, sendo elas: (a) dependentes das sintetases peptídicas não ribossômicas (NRPS). Na qual as sintetases peptídicas são complexos multienzimáticos grandes que também são responsáveis pela síntese de outros vários produtos peptídicos importantes, porém sem um molde de RNA e (b) independentes de NRPS, que é caso de sideróforos que não são polipeptídios e que são montados em blocos variados derivados de aminoácidos, sendo ligados por ligações amina ou éster (CHALLIS, 2005; CROSA; WALSH, 2002). Algumas bactérias e fungos não possuem em seu genoma a presença de genes que façam partes de toda a via de produção e liberação de

sideróforos, conseqüentemente esses microrganismos acabam utilizando os sideróforos que já estão presentes no ambiente e que foram secretados por outros.

Após sintetizados, os sideróforos são liberados no meio extracelular e se ligam aos íons de ferro originando assim um complexo sideróforo- $\text{Fe}^{3+}$ . Em bactérias Gram-negativas, o transporte de sideróforos para o interior da célula não é possível por difusão, devido ao tamanho do complexo formado que impossibilita sua passagem pelas porinas presentes na membrana externa. Assim, foi necessário o desenvolvimento de um mecanismo de transporte eficiente por proteínas específicas localizadas na membrana externa para que o complexo consiga chegar ao periplasma e logo após ao citoplasma da célula. Esse transporte é caracterizado por ser um transporte dependente de energia, a qual é obtida pelas proteínas presentes na membrana citoplasmática, compondo assim o sistema TonB-ExbB-ExbD (FERGUSON; DEISENHOFER, 2004; JOHNSTONE; NOLAN, 2015; WINKELMANN, 2002).

Além de realizar o transporte de metais importantes, garantindo a sobrevivência de microrganismos, os sideróforos vêm apresentando uma gama diferente de aplicações em outros meios, como na agricultura promovendo o crescimento de plantas. Outra aplicação é na medicina, sendo utilizado no caso de bactérias resistentes aos antibióticos e também no tratamento de várias doenças humanas. O uso de sideróforos contra a resistência bacteriana é descrita como “cavalo de Tróia”, pois utiliza como base o transporte de ferro para transportar drogas, ligando o antimicrobiano no complexo, desta forma esse novo complexo (sideróforo, ferro e antibiótico) consegue interagir com os receptores de membrana externa, em seguida chegando ao interior da célula (KHAN; SINGH; SRIVASTAVA, 2018; SAHA et al., 2016).

### **1.3 Transportadores dependentes de TonB (TDTB)**

Com a formação do complexo estável entre o sideróforo e ferro que ocorre no meio extracelular, é necessário que ocorra a passagem do complexo para o meio intracelular, porém o mesmo é incapaz de passar pelas porinas devido ao tamanho destas moléculas. Nesta etapa são necessárias proteínas receptoras dos sideróforos carregados que estejam localizadas na membrana externa das bactérias Gram-negativas, que são intituladas de “transportadores dependentes de TonB (TBDT)” (NOINAJ et al., 2010a; WIENER, 2005).

Em *E. coli*, foram descritas as estruturas de quatro transportadores dependentes de TonB: FhuA, responsável por transportar sideróforos do tipo hidroxamato como ferricromo (FERGUSON et al., 1998a; KILLMANN; BENZ; BRAUN, 1993), FepA, receptor de sideróforos do tipo catecolatos que transportam enterobactina férrica (BARNARD; WATSON;

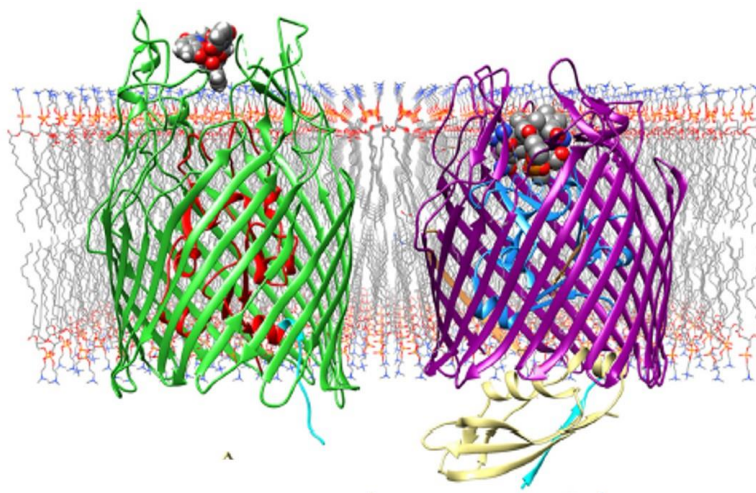
MCINTOSH, 2001), FecA, que transporta citrato férrico (OGIERMAN; BRAUN, 2003), e o transporte de vitamina B12 que também é realizado do pela proteína BtuB (CHIMENTO et al., 2003). Os receptores de membrana externa são expostos na membrana somente quando a bactéria se encontra em condição de limitação de ferro, e esse tipo de regulação é necessário porque as proteínas de membrana externa podem ser alvo de bacteriófagos, colicinas e antibióticos como ponto de entrada na célula.

As proteínas transportadoras dependentes de TonB em *E. coli* foram cristalizadas e sua estrutura foi determinada por difração de raios-X, sendo que a arquitetura comum entre elas é o formato de um barril  $\beta$  composto por 22 fitas betas antiparalelas que atravessam a membrana externa (Figura 2), a qual irá permitir a passagem do sideróforo para o espaço periplasmático (KREWULAK; VOGEL, 2011). Na região N-terminal das proteínas de membrana externa, também conhecida como *plug*, encontra-se uma região conhecida como TonB-Box composta por 8 aminoácidos conservados, sendo observado em *E. coli* uma região composta com seguintes aminoácidos (DXXXVVTA). O TonB-Box está localizado na parte final do *plug* e se estende até o periplasma onde irá interagir com a região C-Terminal da proteína TonB, podendo ocorrer um rearranjo conformacional do domínio *plug* após essa interação mecânica. A sequência TonB-Box funciona como uma assinatura para essa família de transportadores dependentes de TonB (NOINAJ et al., 2010a).

A região *plug* no interior do barril  $\beta$  na maioria das vezes é composta por quatro folhas  $\beta$  que estão entrelaçadas com *loops* e hélices. Em todos os TBDTs o *plug* obstrui o canal do barril  $\beta$  impedindo assim que ocorra uma passagem direta do sideróforo-ferro através do barril. Este domínio é mantido no interior do barril  $\beta$  por aproximadamente 50-70 pontes de hidrogênio e duas pontes salinas, que envolvem quatro aminoácidos altamente conservados que são: dois resíduos de Arginina (R) do *plug* e dois de Ácido glutâmico (E) estes estão conservados no barril  $\beta$  (CHIMENTO; KADNER; WIENER, 2005a; WIENER, 2005).

Os sideróforos possuem uma alta seletividade que vem sendo demonstrada desde 1990 através de vários experimentos de transporte em bactérias, fungos e plantas (SCHALK; MISLIN; BRILLET, 2012). Com estes estudos foi observado que a região do topo dos transportadores dependentes de TonB, onde estão localizados os *loops*, possui uma conformação diferente para cada transportador (Figura 2), e isto se dá devido a presença de diferentes aminoácidos nesta região, onde cada qual será específico para o reconhecimento do sideróforo a ser transportado por aquele transportador. Ou seja, os aminoácidos nos *loops* diferem entre transportadores e podem ser a chave para o reconhecimento da ligação do sideróforo. Este fenômeno é demonstrado pela proteína FecA de *E. coli* que é responsável pelo

transporte de citrato férrico, onde a bolsa de ligação do sideróforo é revestida por aminoácidos que são carregados positivamente (FERGUSON, 2002; YUE; GRIZOT; BUCHANAN, 2003). Já no caso do transportador FhuA, também de *E. coli*, ocorre uma predominância de resíduos aromáticos (CHIMENTO; KADNER; WIENER, 2005a; FERGUSON et al., 1998b).



**Figura 2 – Representação dos transportadores dependentes de TonB (TBDT).** Os transportadores dependentes de TonB, estão localizados na membrana externada das células Gram-Negativas, situados entre a bicamada lipídica. São formados por um barril composto por 22 fitas  $\beta$  antiparalelas (verde e roxo) ao topo do barril  $\beta$  encontra-se os *loops* da proteína onde cada transportador terá uma conformação diferente entre si, e no lúmen do barril  $\beta$  encontra-se um domínio denominado de *plug* (vermelho e azul) e que possui na extremidade N-terminal 8 aminoácidos que irão interagir com a proteína TonB, essa região é chamada de TonB-box (azul claro). Retirado de Klebba, 2016.

Após o reconhecimento e a ligação do sideróforo nos transportadores de membrana específicos, um efeito cascata começa a ocorrer: a partir desta ligação, o domínio TonB-box presente no *plug* é exposto ao periplasma da célula onde irá interagir com a proteína TonB presente na membrana interna da bactéria. Devido a essa interação o sideróforo consegue passar pelo lúmen do barril  $\beta$  e chegar ao periplasma. Por ocorrer um efeito cascata e por envolver outras proteínas de membrana, o transporte mediado por sideróforos foi chamado de sistema TonB-ExbB-ExbD.

## 1.4 Sistema TonB-ExbB-ExbD

Para a célula conseguir transportar o sideróforo para o meio intracelular é necessário que ocorra todo um processo dependente de energia envolvendo diferentes proteínas. A energia utilizada pelos micro-organismos é a energia próton-motriz já presente na membrana citoplasmática (ZHAI; HEIJNE; SAIER, 2003). No caso de transporte de ferro, a energia é transmitida para três proteínas presentes na membrana citoplasmática, denominadas TonB-ExbB-ExbD, que irão conseguir energizar o transporte do sideróforo. Sabe-se que em *E. coli* as proteínas ExbB e ExbD possuem outras quatro proteínas parálogas, TolQ, TolR, MotA e MotB. As proteínas TolQ e TolR são encontradas no momento da divisão celular e são necessárias para a integridade e divisão da membrana externa, já as proteínas MotA e MotB estão envolvidas com a rotação do motor flagelar. Todas essas proteínas utilizam a força próton motriz (PMF) como a fonte de energia para suas funções (BRADBEER, 1993; KLEBBA, 2016; OLLIS et al., 2009).

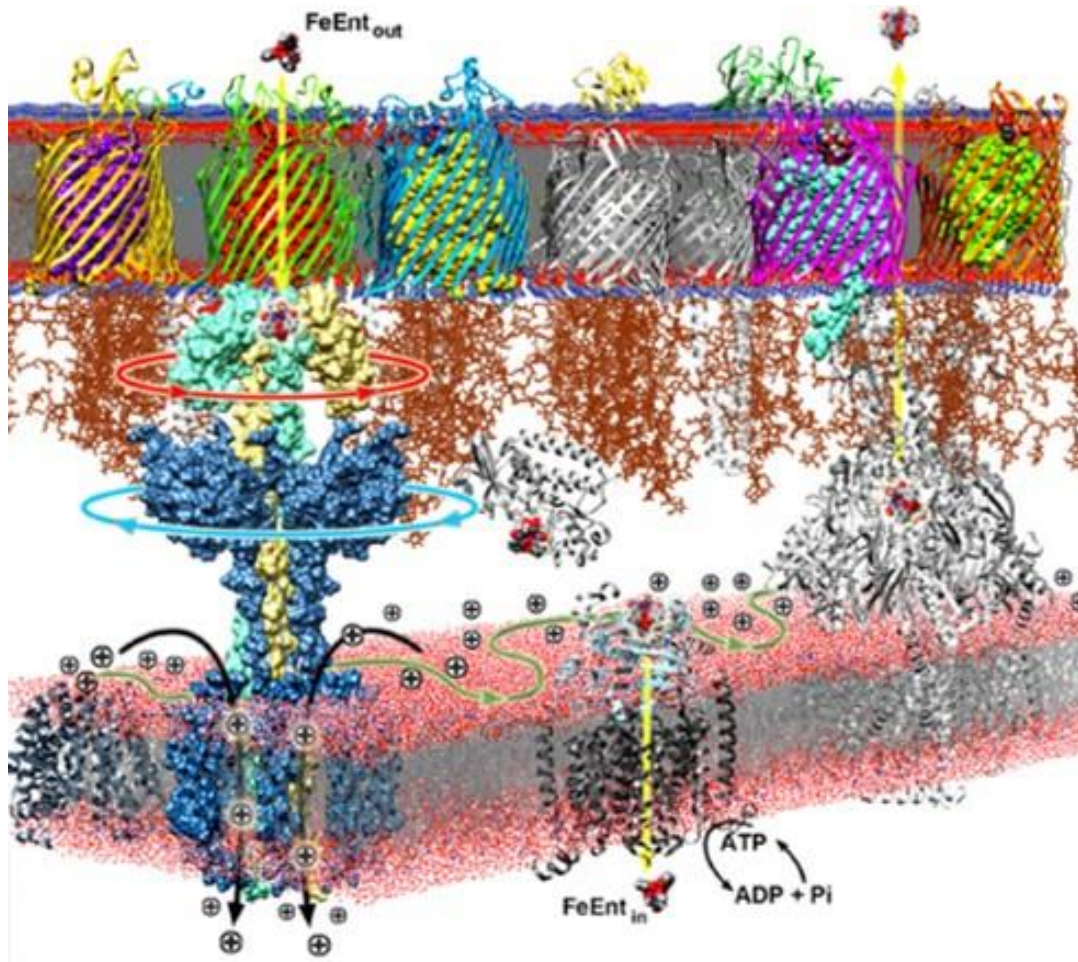
As proteínas pertencentes ao sistema TonB-ExbB-ExbD, foram mais descritas na bactéria *E. coli* onde ExbB apresenta uma função estrutural, conseguindo garantir assim estabilidade às proteínas ExbD e TonB (JANA; MANNING; POSTLE, 2011). Em contraposição, ExbD possui sua região N-terminal no citoplasma e seu carboxi-terminal está no periplasma. ExbD é a proteína responsável por transmitir a energia próton-motriz para região carboxi-terminal de TonB, deixando assim o sistema ‘energizado’ (GRESOCK; KASTEAD; POSTLE, 2015a; SVERZHINSKY et al., 2015).

A terceira proteína que compõe o sistema é TonB (26,1 kDa), a qual possui apenas um domínio acoplado à membrana citoplasmática, que é o N-terminal. O segundo domínio funcional de TonB se estende por todo o periplasma, sendo um espaçador com uma região rica em repetições de Prolina e Lisina que irão garantir flexibilidade a TonB no periplasma (Figura 3). O terceiro domínio de TonB se encontra na região C-terminal e é fundamental para interagir com as TonB-boxes nos domínios N-terminais dos receptores de membrana externa (KREWULAK; VOGEL, 2011; SVERZHINSKY et al., 2015).

Estudos mais recentes demonstraram que para ocorrer a transdução da energia próton-motriz, é necessário que as proteínas TonB e ExbD formem um heterodímero, deste modo, TonB ficará energizado e sua região C-terminal irá interagir com a região TonB-Box dos TDTB, e o *plug* sofrerá uma mudança conformacional se desdobrando e permitindo assim a passagem do sideróforo para o periplasma (CELIA et al., 2016; GRESOCK; KASTEAD; POSTLE, 2015a). Após a translocação do sideróforo ao espaço periplasmático, o mesmo é



ligado por uma proteína periplasmática ligante de ferro, que irá transportar o sideróforo até um transportador ABC (ATP-Binding Cassette) localizado na membrana citoplasmática (FERGUSON; DEISENHOFER, 2002a; LOCHER, 2016).



**Figura 3 – Esquema do modelo do sistema TonB-ExbB-ExbD.** Representação de todas as etapas do transporte de ferro em bactérias Gram-Negativas mediado por sideróforos. Na membrana externa é possível ver os  $\beta$ -barris, que é por onde os sideróforos passam, logo em seguida, no periplasma, é possível ver a extensão das proteínas presentes na membrana interna da bactéria: ExbB (azul), ExbD (verde) e TonB (amarelo). Também no periplasma, observa-se a presença da proteína periplasmática (cinza) a qual irá transportar o complexo sideróforo-ferro para o sistema ABC (preto) também localizado na membrana interna, outro sistema ABC presente na membrana interna é do tipo exportador (cinza) que é responsável por colocar o sideróforo novamente ao meio externo. Na membrana interna da bactéria, temos a representação dos íons de hidrogênio que serão utilizados pela proteína ExbD para gerar a energia para o sistema todo, esse processo é chamado de força próton motriz PMF. Imagem retirada de Klebba, 2016.

Após a translocação do sideróforo para o periplasma da célula, o mesmo é ligado a uma proteína periplasmática. Em *E. coli* todas as proteínas periplasmáticas relacionadas ao transporte de ferro estão caracterizadas, sendo elas: FhuD, responsável pelo transporte de ferricromo; FepB, transportando enterobactina férrica; FecB, citrato férrico; e BtuE, que



transporta vitamina B12 (FERGUSON; DEISENHOFER, 2002a). Todas as proteínas periplasmáticas se ligam ao sideróforo através de ligações hidrofílicas e hidrofóbicas, e quando ocorre a ligação as proteínas sofrem uma mudança conformacional e transportam o complexo até um transportador ABC (ATP-Binding Cassette) localizado na membrana interna da célula (KREWULAK; VOGEL, 2008).

O sistema ABC é comum na maioria dos organismos vivos, e no caso de procariontes sempre está organizado em operons e é dividido em duas classes, os importadores e exportadores. No transporte de ferro, são utilizados transportadores ABCs da classe importadores. Os importadores possuem dois domínios flexíveis que estão expostos ao periplasma, um outro domínio que está totalmente embebido na membrana interna e por fim o domínio ATPase que está exposto para o citoplasma da célula. Este último domínio irá realizar a hidrólise do ATP, gerando assim a energia necessária para o sistema para que o sideróforo e ferro possam atravessar chegando assim ao citoplasma da célula. Logo após a chegada ao citoplasma, enzimas específicas irão desfazer o complexo e o ferro  $Fe^{3+}$  será convertido em ferro  $Fe^{2+}$  que posteriormente será utilizado nos processos fisiológicos bacterianos. Já os sideróforos após se desligarem do ferro poderão ser liberados para serem reutilizados ou então degradados (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUÍÑONES, 2003; CONTRERAS et al., 2014; LOCHER, 2016).

A utilização do sistema ABC também ocorre quando há um aumento na concentração do ferro no interior da célula. Sistemas ABC do tipo exportadores estão presentes na membrana interna e possuem os mesmos domínios dos importadores, mas realizam a ‘expulsão’ de íons de ferro para o meio externo, através da hidrólise de ATP para evitar que a alta concentração de ferro cause efeitos prejudiciais à célula. Eles também são os responsáveis por colocar os sideróforos novamente no meio externo para uma nova captação de ferro (GREENE et al., 2018; HANNAUER et al., 2010).

### **1.5 Regulação gênica dependente de ferro**

O metabolismo de ferro é regulado de acordo com a sua disponibilidade no ambiente. Em bactérias, como *E. coli* e também em *C. crescentus* essa regulação é realizada por Fur (**F**erric-**u**ptake **r**egulator) (DA SILVA NETO et al., 2009; DE CASTRO FERREIRA et al., 2016; SILVA NETO; LOURENÇO; MARQUES, 2013). Essa proteína controla a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ferro e enzimas dependentes de ferro (HANTKE, 2001).

Inicialmente, a atuação de Fur se faz pela repressão da transcrição de genes envolvidos na captação de ferro, sendo essencial a presença de  $\text{Fe}^{2+}$  como um sinalizador e também um co-repressor (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  ligado à proteína Fur, ambos irão se ligar entre os sítios -35 e -10 do promotor de genes que estarão envolvidos com processos na célula que envolvam ferro, em uma sequência palindrômica chamada de “Fur box”. (DA SILVA NETO et al., 2009; GOTTESMAN; MASSE, 2002). Devido à ligação da proteína, a transcrição de genes envolvidos com o transporte de ferro é reprimida. Já na ausência de  $\text{Fe}^{2+}$ , ocorre exatamente o inverso, devido à falta de  $\text{Fe}^{2+}$  na célula, a proteína Fur não consegue se ligar na região Fur box, permitindo assim que ocorra expressão dos genes relacionados com a captação e transporte de ferro (PARK; YOU; IMLAY, 2005).

Recentemente, vem sendo evidenciado que Fur pode funcionar como um ativador transcricional direto, o que ocorre em *C. crescentus*, *Anabaena sp* e *Neisseria meningitidis* (DELANY; RAPPUOLI; SCARLATO, 2004; GONZÁLEZ et al., 2016; SILVA NETO; LOURENÇO; MARQUES, 2013). Com relação a regulação do ferro, temos a participação do pequeno RNA RyhB, o qual necessita da atuação da proteína Hfq para o estabilizar e assim conseguir realizar a sua função. O pequeno RNA RyhB irá favorecer a degradação de mRNAs que irão codificar proteínas que utilizam ferro, devido esta função de degradação também foi visto que RyhB atua junto com a RNaseE para facilitar a degradação dos mRNAs alvos, em *E. coli* foi observado que RyhB pode ser reprimido pelo regulador Fur (MASSÉ et al., 2007; MASSE; VANDERPOOL; GOTTESMAN, 2005).

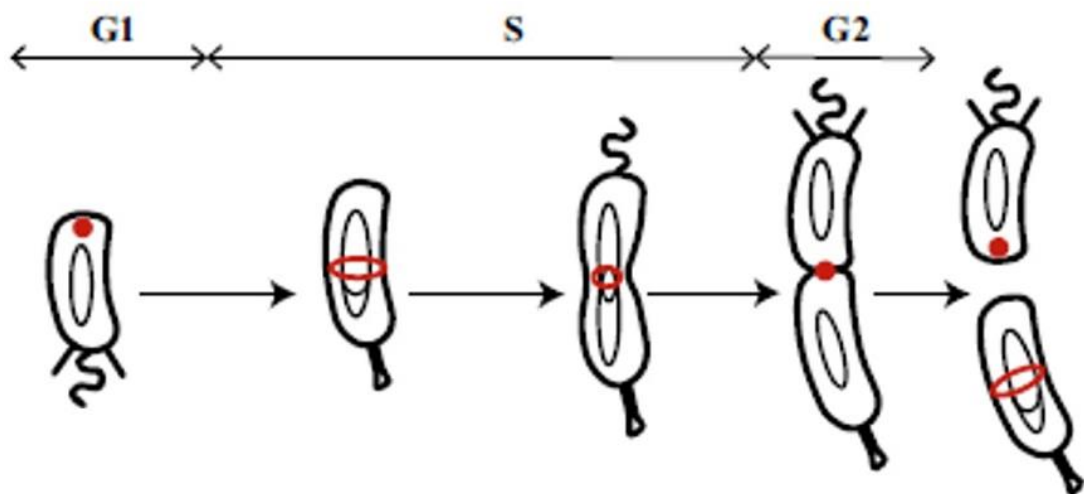
## 1.6 *Caulobacter crescentus*

*C. crescentus* é uma bactéria Gram-negativa não patogênica, pertencente à família das  $\alpha$ -proteobactérias. Por possuir a característica de ser oligotrófica, pode colonizar ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes, apresentando um ciclo de vida dimórfico, onde a partir da divisão celular assimétrica resulta na formação de duas células-filhas distintas entre si, uma célula-talo e uma célula móvel. Por apresentar essas características *C. crescentus* vem sendo um modelo bacteriano de estudo devido ao seu ciclo celular, ambiente e regulação (CURTIS; BRUN, 2010).

A célula-talo possui em sua extremidade a presença de polissacarídeo adesivo, permitindo assim a fixação da célula em diversas superfícies, enquanto a célula flagelada possui um flagelo ao invés do talo e pili. As diferenças encontradas nas células não são somente

morfológicas, as células-talo são capazes de iniciar a replicação do cromossomo e consequentemente a divisão celular, o que não ocorre na célula móvel (CURTIS; BRUN, 2010; ENGLAND et al., 2010).

O ciclo celular de *C. crescentus* é demonstrado na Figura 4, sendo apresentado em três fases: G1, S e G2 (MARKS et al., 2010). A fase G1 é reconhecida pelo fato de as células móveis serem incapazes de replicar o seu DNA, nesta fase o flagelo é desfeito e o talo é sintetizado no polo oposto, ocorrendo também a retração dos pili. Posteriormente a célula-talo entra na fase S da divisão replicando o seu DNA e convertendo em uma célula pré-divisional. Já na fase G2 as duas células filhas já se encontram praticamente formadas, ocorre a síntese do flagelo na célula filha que será móvel, enquanto a célula filha séssil continua com o talo e ocorrendo a divisão completa em seguida. Assim sucede a divisão celular, onde as novas células-filhas se separam, dando origem a duas células morfológica e bioquimicamente diferentes; a célula-móvel corresponde à fase G1 e a célula-talo retorna para fase S (CHIMENTO; KADNER; WIENER, 2005b; GOLEY; INIESTA; SHAPIRO, 2007).



**Figura 4 – Representação do ciclo celular de *C. crescentus*.** Aparecem indicados os estágios morfológicos e os estágios divisão celular (G1, S e G2). A fase G1 ocorre na célula flagelada, a qual antecede a replicação do DNA (fase S). No decorrer da fase S, a célula móvel perde o flagelo e no mesmo local há a formação de um talo; a célula alongada encontrada nessa fase é chamada de pré-divisional, e após esse evento inicia-se a fase G2 onde ocorre a citocinese. A célula séssil que apresenta o talo é capaz de reiniciar o ciclo imediatamente replicando o seu DNA, enquanto a célula móvel novamente tem que perder os eu flagelo dando origem ao talo e assim replicar o seu DNA. Retirado de (COLLIER, 2018).

Todo o ciclo celular de *C. crescentus* é regulado por reguladores globais: CtrA, GcrA, DnaA e CcrM, onde a estabilidade dessas proteínas são controladas durante o ciclo. A proteína CtrA é um fator de transcrição além de ser o regulador central, ele basicamente atua impedindo que a DnaA realize a sua função impedindo a replicação da célula (BEROUAL; BRILLI; BIONDI, 2018).

Da família das  $\alpha$ -proteobactérias *C. crescentus* foi a primeira a ter o seu genoma totalmente sequenciado e a partir disso foi possível realizar inúmeras abordagens genômicas, como análise do perfil global de expressão utilizando técnicas de microarranjos de DNA e RNAseq ou abordagens proteômicas (KIRKPATRICK; VIOLLIER, 2012; MARKS et al., 2010). Desse modo, é sabido que *C. crescentus* NA1000 possui um genoma único e circular contendo 4 Mb tendo 67% de GC, codificando aproximadamente 3.767 genes relacionados a adaptação ao ambiente e resposta a estresses (MARKS et al., 2010).

Em *C. crescentus* foram identificados 62 genes que codificam proteínas de membrana externa que são transportadores dependentes de TonB (TBDT) (LOCHER et al., 1998; MARKS et al., 2010; NIERMAN et al., 2001). Estes genes são responsáveis pelo transporte de nutrientes essenciais a célula, como por exemplo açúcares, vitamina B12, ferro e outros metais (NEUGEBAUER et al., 2005). Entretanto, dentre esses 62 genes, em condições limitantes de ferro foram identificados quatro transportadores dependentes de TonB (TBDT) sendo eles: CCNA\_00138, CCNA\_00028, CCNA\_03023, CCNA\_02277 estritamente regulados por Fur, ou seja, na presença de ferro na célula esses genes são reprimidos (SILVA NETO; LOURENÇO; MARQUES, 2013).

Em um trabalho recente executado por nosso grupo de pesquisa, foi realizada uma varredura de sideróforos férricos que *C. crescentus* poderia utilizar, e se descobriu que *C. crescentus* utiliza predominantemente sideróforos do tipo hidroxamato (BALHESTEROS et al., 2017), que são listados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Sideróforos do tipo hidroxamato que são utilizados por *C. crescentus*. Retirado de (BALHESTEROS et al., 2017).**

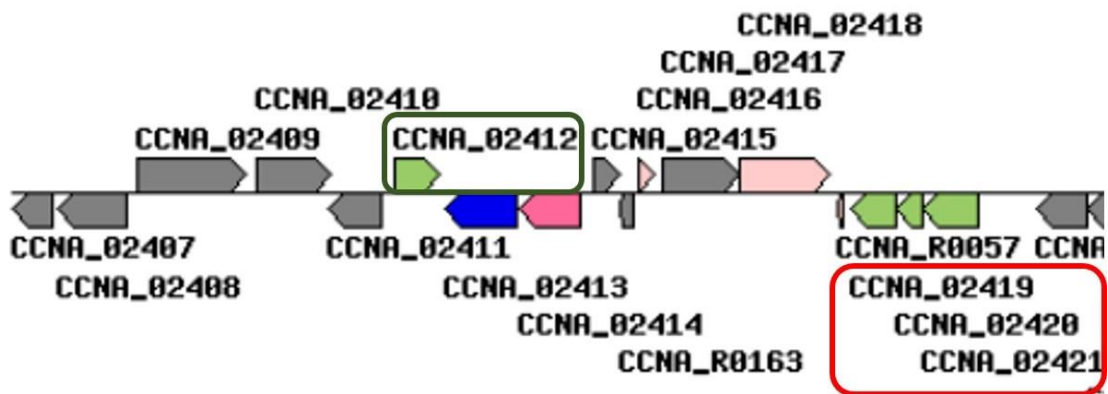
<b>SIDERÓFOROS</b>
Aspercromo B1
Aspercromo B2
Aspercromo C
Aspercromo D1
Ferricromo A
Ferricromo C
Ferricrisina
Ferricrocina
Ferrirrodina
Ferrirrubina
Malonicromo
Ferricromo tetraglicina

Através desta varredura, observou que *C. crescentus* não utiliza sideróforos de outras categorias, não apresentando crescimento em sideróforos catecóis e nem de função mista. Porém com o início deste trabalho, constatamos que o transportador (TBDT) codificado pelo gene CCNA\_02277 é capaz de transportar o sideróforo hemina/hemoglobina, algo não esperado, dado que *C. crescentus* não é uma bactéria patogênica. Como a utilização desse tipo de sideróforo é observado em patógenos, a utilização de hemina ou hemoglobina por *C. crescentus* provavelmente pode estar relacionada à presença destes componentes oriundos da decomposição de matéria orgânica, nos ambientes aquáticos na qual a mesma vive. O transportador de heme foi identificado como *hutA* (BALHESTEROS et al., 2017; CONTRERAS et al., 2014; KREWULAK; VOGEL, 2008).

Da mesma forma, foi visto que enterobactina, um sideróforo do tipo catecol que é utilizado por muitas bactérias Gram-negativas (CAO et al., 2003), não foi capaz de fornecer ferro para *C. crescentus* (BALHESTEROS, et al., 2017)., o que é de certa forma é notável pois bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Erwinia* e *Klebsiella* que também estão presentes no

mesmo ambiente que *C. crescentus* sintetizam enterobactina, deixando esse sideróforo exposto neste tipo de ambiente (HIDER; KONG, 2010).

Outro fato interessante é que foram descritos dois genes codificando possíveis proteínas TonB em *C. crescentus* (Lohmiller et al., 2008). Um destes genes codifica um TonB clássico (*tonB1*), fazendo parte de um operon com as outras proteínas do sistema ExbB e ExbD, e o outro codifica outra proteína (*tonB2*), e não está localizado em um operon como *tonB1* (Figura 5). Em *Rhizobium leguminosarum* foi descrito que esta proteína TonB2 é necessária para a aquisição de heme e outros sideróforos (Wexler et al., 2001).



**Figura 5 – Localização dos genes *tonB* de *C. crescentus*.** Mapa do cromossomo de *C. crescentus* NA1000 mostrando na caixa vermelha o operon contendo *tonB1* e a caixa verde o gene *tonB2*. Imagem retirada do KEGG ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)).

Como exposto, apesar do ferro ser um metal essencial para a sobrevivência bacteriana, vários fatores acabam interferindo na absorção deste metal, e todo um sistema específico é necessário para esse transporte, sendo que necessita de uma regulação eficaz para que a célula não tenha prejuízos. Em algumas espécies de bactérias Gram-negativas todos os genes responsáveis pelo transporte do ferro  $Fe^{3+}$  já foram caracterizados, do momento que é captado no meio extracelular até onde ocorre a sua conversão para  $Fe^{2+}$ , o que gerou informações para melhor compreensão da sobrevivência e fisiologia da bactéria. No entanto, este não é o caso de *C. crescentus*, do qual ainda pouco se sabe, especialmente se as características apresentadas por esta bactéria como seu ciclo celular e seu habitat, poderiam afetar de forma positiva ou negativa a captação e absorção de ferro. Estas singularidades e indagações sobre o assunto ainda pouco descrito levaram ao desenvolvimento deste trabalho.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo caracterizar o transporte de ferro mediado por quatro receptores dependentes de TonB e outras proteínas envolvidas neste processo em *C. crescentus*. Para isso, as estratégias utilizadas foram:

- a) efetuar a deleção dos quatro transportadores dependentes de TonB (TBDT) que são regulados por Fur em *C. crescentus*, além dos genes codificando outros possíveis transportadores nesses loci.
- b) determinar o perfil de utilização de compostos de ferro de cada linhagem mutante em relação à linhagem parental.
- c) verificar se ocorre especificidade em relação aos dois possíveis TonBs na função de transporte de compostos férricos, através da deleção de cada um dos genes *tonB1* e *tonB2* e análise da utilização de compostos de ferro.
- d) efetuar a mutagênese sítio-dirigida dos aminoácidos de HutA que interagem com o sideróforo para realizar ensaios de transporte de heme *in vivo*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – Análise *in silício* dos domínios presentes nos receptores dependentes de TonB e as proteínas TonB de *C. crescentus*

As sequências dos transportadores dependentes de TonB (CCNA\_00138, CCNA\_00028, CCNA\_03023, CCNA\_02277), das proteínas TonB de *C. crescentus* (CCNA\_02419, CCNA\_02412,) e dos transportadores de *E. coli* (FecA, FhuA, FepA e BtuB) foram adquiridas em formato FASTA da plataforma KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), sendo posteriormente realizado o alinhamento entre elas utilizando o programa MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) (KATO et al., 2002) e GeneDoc (NICHOLAS et al., 1997). Após o alinhamento, foram identificados os aminoácidos conservados entre os transportadores, além da região respectiva ao *plug* e a região  $\beta$ -barril de cada transportador, por meio das anotações já fornecidas pelo UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Para obter a porcentagem de identidade dessas proteínas, foi utilizado o BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

#### 3.2 – Análise estrutural dos receptores dependentes de TonB e as proteínas TonB de *C. crescentus*

Utilizamos as sequências obtidas em formato FASTA dos transportadores dependentes de TonB e das proteínas TonB em *C. crescentus*, sendo realizada uma modelagem estrutural utilizando o programa Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) (GUEx; PEITSCH; SCHWEDE, 2003). Também realizamos uma predição da topologia dessas proteínas utilizando o programa PRED-TMBB2 (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TMBB2>) (TSIRIGOS; ELOFSSON; BAGOS, 2016). Após a obtenção da modelagem da estrutura de todos os transportadores os mesmos foram analisados com a utilização do programa Pymol (Molecular Graphics System, versão 2.0 Schrödinger, LLC).

#### 3.3 - Linhagens bacterianas e condições de crescimento

As linhagens de *C. crescentus* foram cultivadas sob agitação a 30°C em meio PYE (peptona 2g/L; extrato de levedura 1 g/l; MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/l; CaCl<sub>2</sub> 1M 0,5 mM) ou em meio mínimo M2 (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,74 g/l; NH<sub>4</sub>Cl 1,06 g/l; FeSO<sub>4</sub> 1 mM; glicose 20%; MgSO<sub>4</sub> 1



mM; CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM; pH 6,9) (ELY, 1991). O meio M2 pode conter diferentes fontes de ferro (sulfato ferroso 100 µM, citrato férrico 100 µM, cloreto férrico 100 µM ou hemina 100 µM). No caso de o crescimento ser realizado sem a presença do ferro, o Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> não era adicionado ao meio M2. Quando requerido, os meios foram complementados com antibióticos: ácido nalidíxico (20 µg/ml), canamicina (5 µg/ml) ou tetraciclina (1 µg/ml). As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho estão descritas nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** – Linhagens de *C. crescentus* utilizadas

LINHAGEM	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
NA1000	Linhagem sincronizável, considerada selvagem	Evinger; Agabian, 1977
MM96	Linhagem mutante para transportador dependente de TonB <i>CCNA_00028</i>	Este trabalho
MM89	Linhagem mutante para transportador dependente de TonB <i>CCNA_00138</i>	Este trabalho
MM90	Linhagem mutante para transportador dependente de TonB <i>CCNA_02277</i>	Balhesteros, 2017
MM91	Linhagem mutante para transportador dependente de TonB <i>CCNA_03023</i>	Este trabalho
MM90 (pMR20- <i>hutA</i> )	Linhagem $\Delta$ CCNA_02277 com pMR20 – <i>hutA</i>	Este trabalho
MM91 (pMR20- 03023)	Linhagem $\Delta$ CCNA_03023 com a presença do plasmídeo pMR20- 03023	Este trabalho
MM96 (pMR20-00028)	Linhagem $\Delta$ CCNA_00028 com a presença do plasmídeo pMR20- 00028	Este trabalho
NA1000 (pMR20)	Linhagem selvagem com a presença do plasmídeo pMR20 vazio	Este trabalho
MM90 (pMR20)	Linhagem selvagem com a presença do plasmídeo pMR20 vazio	Este trabalho
MM91 (pMR20)	Linhagem selvagem com a presença do plasmídeo pMR20 vazio	Este trabalho
$\Delta$ CCNA_02419	Linhagem mutante para proteína TonB1 <i>CCNA_02419</i>	Este trabalho
$\Delta$ CCNA_02412	Linhagem mutante para proteína TonB2 <i>CCNA_02412</i>	Este trabalho
MM90 (pMR20- <i>hutA</i> )	Linhagem com pMR20 - <i>hutA</i>	Este trabalho
MM91 (pMR20)	Linhagem mutante com a presença do plasmídeo pMR20 vazio	Este trabalho

**Tabela 3** – Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas

ESPÉCIE	LINHAGEM	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>	DH10 $\beta$	<i>F-mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> $\Delta$ <i>lazX74recA end A1</i>	Hanahan, 1983
	S17-1	294::RP4-2(Tc:: Mu)(Km::Tn7)	Simon; Prierer Puhler, 1983

Durante os procedimentos de clonagem, foram utilizadas células de *E. coli* DH10 $\beta$  (HANAHAN, 1983), e os plasmídeos utilizados estão descritos na tabela 3. Para a introdução dos plasmídeos em *C. crescentus* por conjugação, utilizou-se a linhagem de *E. coli* S17-1 (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983). As linhagens de *E. coli* foram cultivadas sob agitação a 37°C em meio Luria-Bertani-LB (triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7,5), e suplementadas com ampicilina (100  $\mu$ g/ml), canamicina (50  $\mu$ g/ml) ou tetraciclina (12,5  $\mu$ g/ml) quando necessário.

### 3.4 - Plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados

As tabelas 4 e 5 listam os plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

**Tabela 4** – Plasmídeos utilizados

PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS <sup>A</sup>	REFERÊNCIA
pGEM T-Easy	Vetor de clonagem, Ap <sup>r</sup>	Promega
pNPTS138	Replicon ColE1, <i>oriT</i> , <i>npt</i> (Km <sup>r</sup> ), <i>sacB</i> .	M.R.K. Alley
pMR20	Vetor de clonagem, replicon IncP1, Tc <sup>r</sup> , mobilizável	Roberts et al., 1996
pMR20 <i>hutA</i>	Vetor pMR20 carregando uma cópia do gene selvagem <i>hutA</i>	Este trabalho
pMR20-00028	Vetor pMR20 carregando uma cópia do gene CCNA_00028	Este trabalho
pNPT $\Delta$ CCNA_2277	Regiões flanqueadoras do gene CCNA_02277 no pNPTS138	Este trabalho
pNPT $\Delta$ CCNA_3023	Regiões flanqueadoras do gene CCNA_03023 no pNPTS138	Este trabalho
pNPT $\Delta$ CCNA_0028	Regiões flanqueadoras do gene CCNA_00028 no pNPTS138	Este trabalho
pNPT $\Delta$ CCNA_0138	Regiões flanqueadoras do gene CCNA_00138 no pNPTS138	Este trabalho
pNPT $\Delta$ CCNA_02419Spec	Regiões flanqueadoras do gene CCNA_02419 com cassete Spec no pNPTS138	Este trabalho

**Tabela 4** – Plasmídeos utilizados (*continuação*)

PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS <sup>A</sup>	REFERÊNCIA
pNPTΔCCNA_02412	Regiões flanqueadoras do gene CCNA_02412	Este trabalho
pHP45Ω	Derivado do pBR322, Ap <sup>r</sup> , cassette ΩSpec (Sm <sup>r</sup> / Sp <sup>r</sup> )	PRENTKI e KRISCH, 1984
pMR20HutA-S263C	Vetor pMR20 carregando uma cópia do gene selvagem <i>hutA</i> com troca do aminoácido S263 para C	Este trabalho
pMR20HutA-S510C	Vetor pMR20 carregando uma cópia do gene selvagem <i>hutA</i> com troca do aminoácido S510 para C	Este trabalho
pMR20HutA-S567C	Vetor pMR20 carregando uma cópia do gene selvagem <i>hutA</i> com troca do aminoácido S567 para C	Este trabalho
pMR20HutA-S709C	Vetor pMR20 carregando uma cópia do gene selvagem <i>hutA</i> com troca do aminoácido S709 para C	Este trabalho
pMR20HutA-A352C	Vetor pMR20 carregando uma cópia do gene selvagem <i>hutA</i> com troca do aminoácido A352 para C	Este trabalho
pMR20HutA-A656C	Vetor pMR20 carregando uma cópia do gene selvagem <i>hutA</i> com troca do aminoácido A656 para C	Este trabalho

<sup>a</sup> Ap<sup>r</sup>, marca de resistência a ampicilina; Km<sup>r</sup>, marca de resistência a Canamicina; Tc<sup>r</sup> marca de resistência a tetraciclina; Sm<sup>r</sup> marca de resistência a espectomicina.

**Tabela 5** – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

NOME	SEQUÊNCIA (5'-3') <sup>A</sup>	CARACTERÍSTICAS
00138 - 1 <sup>a</sup>	AAAAGCTTGC GAAGTTCAGCAGAATCTG	Fragmento HindIII/EcoRI 627pb na região 5' do gene CCNA_00138.
00138 - 2 <sup>a</sup>	AAGAATTCGACTCTGAACAGATCGACCC	
00138 - 3 <sup>a</sup>	AAGAATTCAGCGCTTCTAGAGCATTTC	Fragmento EcoRI/Sph 688pb na região 3' do gene CCNA_00138.
00138 - 4 <sup>a</sup>	AAGCATGCCAACGCCATGTGCGCTATC	
00028 - 1 <sup>a</sup>	AAAAGCTTCCATGCTCGGGCTTGATGAAC	Fragmento HindIII/BamHI 695pb na região 5' do gene CCNA_00028.
00028 - 2 <sup>a</sup>	AAGGATCCGTTACGCATAGTGGTCCTATCC	
00028 - 3 <sup>a</sup>	AAGGATCCCAATGTGAAGTACTGATCCTCC	Fragmento BamHI/EcoRI 653pb na região 3' do gene CCNA_00028.
00028 - 4 <sup>a</sup>	AAGAATTCGCTGACGTGATGCAGGCTGG	
03023 - 1 <sup>a</sup>	AAAAGCTTGGCCAAGAACGGTCTGAAGG	Fragmento HindIII/BamHI 867pb região 5' do gene CCNA_03023.
03023 - 2 <sup>a</sup>	CGAGACGAGACGACATCGGAG	
02419 - 1 <sup>a</sup>	AAGGATCCCAGACCCGCATCTCGGCCTAC	Fragmento BamHI/EcoRI 542pb na

02419 - 2 <sup>a</sup>	AAGA <u>ATTC</u> ATCACCCCCTACTGGCTATC	região 5' do gene CCNA_02419.
02419 - 3 <sup>a</sup>	AAGA <u>ATTC</u> GCCTGGATCACAGCGAAAG	Fragmento EcoRI/SphI 716pb na região 3' do gene CCNA_02419.
02419 - 4 <sup>a</sup>	AAGCATGC <u>GT</u> CACGAACGCGGTGAAGCAC	
02412 - 1 <sup>a</sup>	AAA <u>AGCTT</u> GGTAGGAGGCGTGATCCGAC	Fragmento HindIII/BamHI 518pb na região 5' do gene CCNA_02412
02412 - 2 <sup>a</sup>	AAGGATCCGGCGTGCGATTGTAAATTGAC	
02412 - 3 <sup>a</sup>	AAGGATCCCGTGTCAGTAGCTCTTGGGC	Fragmento BamHI/EcoRI 530pb na região 3' do gene CCNA_02412.
02412-4 <sup>a</sup>	AAGA <u>ATTC</u> ATGCTGTTTATCGAGGACC	
COMP2277-F <sup>a</sup>	ATATCATAAGA <u>AGCTT</u> CATTGGACAAACCCCAAGCGC	Fragmento HindIII/BamHI 2427pb para complementação do gene CCNA_02277.
COMP2277-R <sup>a</sup>	ATATCATAAGGGATCCGCTTGTCCGCAAGGATGTCG	
COMP0028-F <sup>a</sup>	ATATCATAAGCCATGGGAAAGTCCACGCTTCCCGAGG	Fragmento NcoI/PstI 2400pb para complementação do gene CCNA_00028.
COMP0028-R <sup>a</sup>	ATATCATAAGCTGCAGCTGGGTGTAAGCACCTAAG	
COMP03023-F <sup>a</sup>	AAGCTTGGGAAAGGCGAGAGCCTTCC	Fragmento para complementação do gene CCNA_03023.
COMP03023-R <sup>a</sup>	GAATTCGCTCGACCACTTGTGAACCC	
Primer1 - HutAF <sup>b</sup>	GCCAAGCTGATCTACTGCCCAATGACAACAAC	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer1 - HutAR <sup>b</sup>	GTTGTTGTCATTGGGGCAGTAGATCAGCTTGGC	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer2 -HutAF <sup>b</sup>	GCTTCTCCAATCCGGTCT <b>G</b> CAACTACCAATC GATCTCG	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer2 -HutAR <sup>b</sup>	CGAGATCGATTGGTAGTTGCAGACCGGATT GGAGAAGC	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer3 - HutAF <sup>b</sup>	CACCGCCGCCTGCCCCGGCCGT	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer3 - HutAR <sup>b</sup>	ACGGCCGGGCA GCGCGTG	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer4 - HutAF <sup>b</sup>	GTCCGCGGCCTGTGCAACACCTCGACGG	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer4 - HutAR <sup>b</sup>	CCGTCGAGGTGTTGCACAGGCCGCGGAC	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer5 - HutAF <sup>b</sup>	CGCAACACCGCCTCTGACCGCACGC	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer5 - HutAR <sup>b</sup>	GCGTGCGGTCAGAGGCGGTGTTGCG	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer6 - HutAF <sup>b</sup>	ATCGGCCAGCCGCTGCGGCGTCACCTGCG	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.
Primer6 - HutAR <sup>b</sup>	CGCAGGTGACCCG <b>C</b> AGCGGCTGGCCGAT	Primer para a troca de um aminoácido por uma cisteína.

<sup>a</sup> As letras sublinhadas indicam sítios de enzimas de restrição usados para clonagem.

<sup>b</sup> Nucleotídeos em negrito indicam a troca pela mutagênese sitio-dirigida.

### 3.5 – Extração de DNA cromossômico de *C. crescentus*

A metodologia de extração do DNA **cromossômico** de *C. crescentus* foi baseada no protocolo descrito por (CHEN; KUO, 1993). Culturas de *Caulobacter* foram incubadas em meio PYE a 30°C por 16 horas com agitação constante de 200 rpm. Foram transferidos 1,5 mL da cultura para um tubo de 2 mL, que foi centrifugado por 3 minutos a 12.000 rpm. As células foram ressuspensas em 200 µl de tampão de lise (Tris-acetato 40 mM pH 7,8; acetato de sódio 20 mM; EDTA 1 mM; SDS 1%) e pipetadas vigorosamente. Em seguida, 66 µl de uma solução de NaCl 5 M foram adicionados, a mistura foi vigorosamente agitada até ficar viscosa e então foi centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado um volume igual de uma mistura de fenol e clorofórmio (1:1). Os tubos contendo a mistura foram invertidos gentilmente, até que a mistura ficasse leitosa e sem apresentar separação de fases, quando então foi centrifugada por 3 minutos a 12.000 rpm. A fase do sobrenadante foi transferida para outro tubo, ao qual foi adicionado o dobro do volume de etanol e centrifugado para outro tubo, ao qual foi adicionado o dobro do volume foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O DNA **cromossômico** foi lavado com etanol 70% por duas vezes, seco e ressuspensado em 50 µl de TE (10 mM Tris, com HC e pH 8,0, 1 mM de EDTA).

### 3.6 – Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese

Conforme descrita por Mullis (1986), as reações de PCR foram realizadas utilizando-se os seguintes componentes: 1 µg DNA genômico, 1 µl de cada oligonucleotídeo utilizado (10 pmol) (Tabela 5), 1 µl de dNTPs (0,2 mM) (Life Technologies), 0,5 µl da enzima DNA Polymerase (Sinapse), 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 µl de DMSO, 2,5 µl de tampão 10X (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>-MgCl<sub>2</sub>) e água Mili-Q® estéril para completar o volume de uma reação total de 25 µl.

A condição padrão para a realização da reação de PCR foi 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, e 72°C também por 30 segundos. Após 30 ciclos a reação permaneceu a 72°C por 7 minutos e foi mantida a 4°C ao final. Algumas das reações sofreram alterações nas variações de tempo e temperatura de acordo com o par de oligonucleotídeos utilizados.

Alíquotas da PCR foram, então, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE 1X (Tris base, Ácido bórico, EDTA) e utilizando-se 1kb Plus DNA

Ladder (Life Technologies) como marcador de peso molecular. A condição padrão da eletroforese foi de 100 Volts por 1 hora e 30 minutos, podendo sofrer alterações de acordo com a finalidade. Após a eletroforese, o gel foi submetido a uma solução contendo brometo de etídeo, para a identificação das bandas de DNA sob luz UV. Quando necessária, a purificação de fragmentos do DNA de interesse diretamente do gel de agarose foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up conforme instruções do fabricante (Macherey-Nagel).

### 3.7 – PCR de Colônia

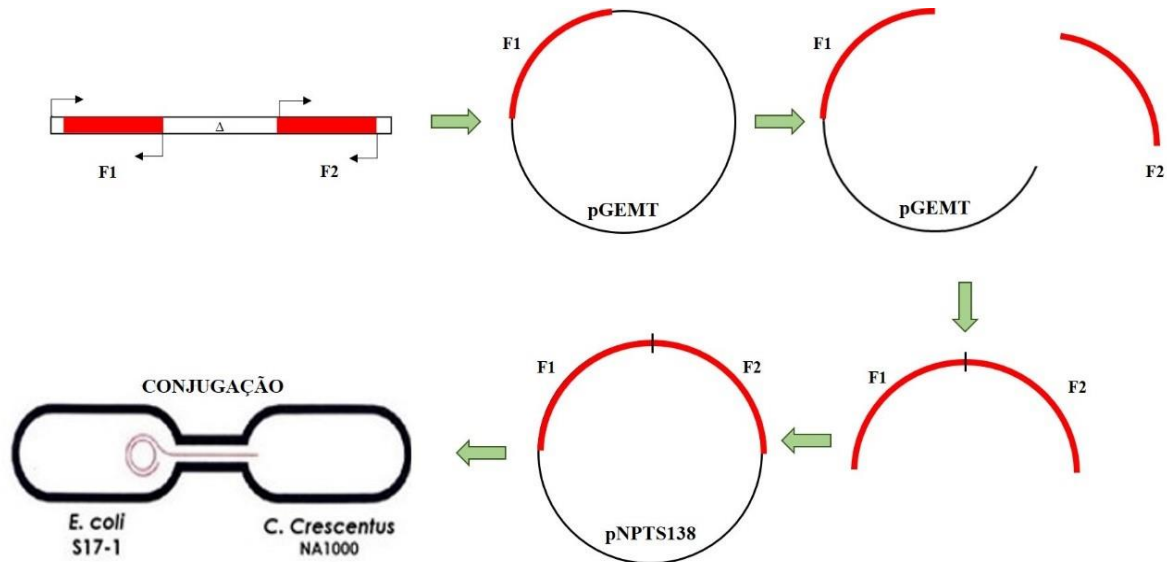
Após o crescimento de colônias em placas com meio sólido, uma colônia foi transferida para um tubo de 1,5 ml contendo 50 µl de buffer TE. Após colocar a colônia no buffer TE, coloca-se o tubo para ferver por 5 minutos, e a seguir o mesmo é passado imediatamente para o gelo e espera-se mais 5 minutos. Após os 5 minutos no gelo, é centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. Ao finalizar a centrifugação, temos a obtenção do DNA **cromossômico** da colônia.

### 3.8 – Construção das linhagens mutantes

As regiões flangeadoras das ORFs CCNA\_00138, CCNA\_00028, CCNA\_02277, CCNA\_03023, CCNA\_02419 e CCNA\_02412 foram amplificadas do genoma e clonadas no vetor pGEM T-Easy (Promega). Os fragmentos (1 e 2) flangeadores foram amplificados com pares de oligonucleotídeos contendo a presença de sítios para enzimas de restrição como descrito na tabela 5. Depois da obtenção de clones positivos, os mesmos foram sequenciados para a confirmação. Após a clonagem e confirmação de ambos os fragmentos no vetor pGEM T-Easy, as duas construções foram então transferidas por eletroporação (ver item 3.10) para uma linhagem de *E. coli* DH10β.

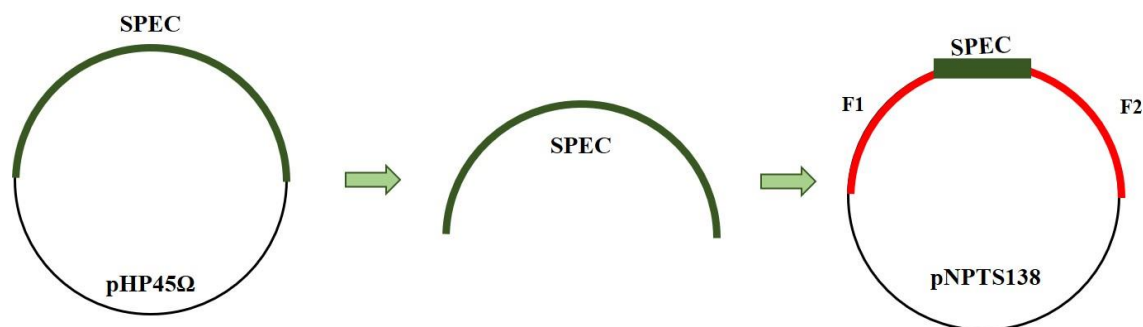
Em seguida, os fragmentos no vetor pGEM T-Easy, foram digeridos com enzimas de restrição, purificados com o kit NucleoSpin Gel PCR Clean-up, e posteriormente clonados sequencialmente no vetor suicida pNPTS138. A ligação do fragmento 2 no vetor contendo o fragmento 1 foi realizada utilizando-se a T4 DNA Ligase (Invitrogen) (Figura 6). A construção positiva com os dois fragmentos no pNPTS138 foi inserida por eletroporação em *E. coli* S17-1, que é capaz de transferir este plasmídeo para a linhagem NA1000 de *C. crescentus*, por conjugação (ver item 3.10).

Após a conjugação, as culturas foram semeadas em placas com meio PYE sólido contendo ácido nalidíxico (20 µg/ml) e Canamicina (5 µg/ml), e incubadas a 30°C por 48 horas. Uma colônia foi inoculada em meio PYE líquido a 30°C por 48 horas, sem adição de antibióticos. As culturas foram semeadas em placas PYE contendo 3% sacarose.



**Figura 6 – Esquema da construção dos mutantes.** Representação de todos os passos realizados para obtenção das linhagens mutantes dos quatro transportadores e das proteínas TonBs de *C. crescentus*. Inicialmente foi realizada a amplificação das regiões *upstream* e *downstream*, o fragmento *upstream* foi chamado de 1 e o *downstream* de fragmento 2. Em seguida foi clonado no plasmídeo pGEMT – Easy o fragmento 1 dos genes citados, seguida de uma digestão com as enzimas específicas para cada gene da região final do fragmento 1 e do plasmídeo e a seguir foi inserido o fragmento 2 na mesma construção. Com o plasmídeo contendo os dois fragmentos, por meio de eletroporação o plasmídeo foi inserido na bactéria *E. coli* S17-1 e posteriormente realizada uma conjugação para que este plasmídeo fosse transferido para a linhagem selvagem NA1000 de *C. crescentus*.

Para facilitar a seleção do mutante do gene CCNA\_02419 após os dois eventos da recombinação homóloga, foi adicionado um cassete que confere resistência a espectinomicina entre as regiões flanqueadoras clonadas no plasmídeo pNPTS138. O cassete de resistência foi obtido do plasmídeo pHP45Ω por digestão. O cassete foi inserido entre as regiões flanqueadoras, e, para isto, ambos os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI (Biolabs) e posteriormente a ligação foi realizada utilizando-se a T4 DNA Ligase (Invitrogen).



**Figura 7 – Obtenção do cassete de espectinomicina.** Esquema representando (da esquerda para a direita) os passos para o isolamento do cassete com marca de resistência para espectinomicina. O cassete foi isolado através de digestão, após ser isolado o mesmo foi adicionado por meio de clonagem no meio do gene CCNA\_02419 que se encontra no plasmídeo pNPTS138.

### 3.9 – Southern blotting

Para a confirmação de alguns mutantes dos TBDTs realizamos a técnica de *Southern blotting*, que é uma das técnicas de hibridização mais utilizada para a detecção de sequências específicas de DNA. Deste modo, a sonda utilizada foi o produto de PCR dos primers (00028-1/00028-2; 00138-1/00138-2; 03023-3/03023-4) já usados na construção dos mutantes (Tabela 5). As sondas foram marcadas com nucleotídeos biotinizados com o kit Chemiluminescent Nucleic Acid Detection. O DNA foi digerido com as seguintes enzimas de restrição: para o gene CCNA\_000138 utilizamos duas enzimas sendo elas *ApaI* e *HindIII*, para o gene CCNA\_00028 escolhemos a enzima *PstI* e para o gene CCNA\_03023 a enzima *BamHI*, após a digestão os fragmentos foram observados em um gel de agarose 1,5 a 80V por 1 hora e 30 minutos.

Após a eletroforese o DNA foi transferido para uma membrana de náilon *over night* e ligado covalentemente a membrana pela luz UV. A hibridação entre a sonda e o DNA desnaturado na membrana, foi realizada sob as condições desejadas e o resultado da hibridação foi comparado com a região do gel original que contém as sequências de DNA de interesse. Quando utilizada uma sonda marcada com biotina, a mesma foi detectada pela a ligação da streptavidina conjugada com fosfatase alcalina, usando o substrato BCIP-T/NBT



### **3.10 – Transformação de células competentes por eletroporação**

As transformações ocorreram por eletroporação (a 1,8 KV, 200 $\Omega$  e 25 $\mu$ F) de 40  $\mu$ l de células previamente competentes (HANAHAN, 1983) contendo 1  $\mu$ l das ligações ou plasmídeos de interesse. Logo após a eletroporação, as células foram inoculadas em 1 ml de meio LB líquido e incubadas a 37°C durante 1 hora. Após o período de incubação, a cultura foi distribuída em placas de Petri com meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado, e permaneceram incubadas na estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas.

### **3.11 – Extração de DNA plasmidial**

As colônias foram transferidas para tubo de microcentrífuga contendo meio LB líquido acrescido de antibiótico adequado, e centrifugados por 3 minutos a 12.000 x g, a fim de precipitar as células e descartar o meio de cultura. As extrações de DNA plasmidial dos processos de clonagem foram realizadas pelo método de lise alcalina como descrito por (FREDERICK M. AUSUBEL, ROGER BRENT, 1995). Os precipitados foram secos em temperatura ambiente e ressuspensos em 50  $\mu$ l de TE contendo 50  $\mu$ g/ml de RNase A.

### **3.12 – Conjugação**

Células de *E. coli* S17-1, contendo a construção plasmidial de interesse, foram colocadas em contato direto com as linhagens de *C. crescentus* utilizando-se uma alça de platina, em meio PYE sólido. A conjugação ocorreu em placas PYE por aproximadamente 12 horas sob incubação a 30°C. Após a conjugação as células foram semeadas em placas com PYE sólido contendo 5  $\mu$ g/ml de Canamicina e 20  $\mu$ g/ml de ácido nalidíxico (quando utilizado o vetor pNPTS138) ou contendo 1  $\mu$ g/ml de tetraciclina e 20  $\mu$ g/ml de ácido nalidíxico (quando utilizado o vetor pMR20), ou então contendo 20  $\mu$ g/ml de espectinomicina (quando utilizado o vetor com o cassete de resistência a espectinomicina) sendo incubadas a 30°C durante 2 dias.

### **3.13 – Construção das linhagens complementadas**

A complementação foi feita a partir da amplificação dos genes de interesse com seus respectivos pares de oligonucleotídeos (Tabela 4) compreendendo também a região promotora de cada gene, e os produtos das amplificações foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega). Após confirmação desta etapa, os genes foram digeridos com as enzimas de restrição específicas e clonados no vetor pMR20, um vetor que apresenta baixo número de

cópias, e confere resistência ao antibiótico tetraciclina (ROBERTS et al, 1996). Com a confirmação das clonagens no vetor pMR20, o mesmo foi inserido por eletroporação em *E. coli* DH10 $\beta$  e posteriormente inserido na linhagem NA1000 por conjugação utilizando-se a linhagem *E. coli* S17-1.

### 3.14 – Ensaios de crescimento

A linhagem selvagem (NA1000) e mutantes foram inoculadas em meio M2 líquido e incubadas *overnight* a 30°C. Estas foram diluídas em meio mínimo M2 sem adição da fonte de ferro no meio para uma densidade óptica a 600nm (DO<sub>600nm</sub>) igual a 0,1 em 10 ml de M2. Foi utilizado M2 contendo diferentes fontes de ferro, substituindo FeSO<sub>4</sub> por 100  $\mu$ M de citrato férrico, cloreto férrico 100  $\mu$ M ou hemina 100  $\mu$ M. A curva foi construída a partir da medição realizada pelo aparelho SpectraMax Paradigm (Molecular Devices).

### 3.15 – Mutações sítio-dirigidas da proteína *hutA*

Para alterar os aminoácidos presentes no topo de HutA, foi realizada a metodologia de mutagênese sítio-dirigida, que foi realizada com o QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Nesta estratégia os oligonucleotídeos são sintetizados de modo a trocar as bases necessárias para alterar o códon original para o códon do resíduo desejado. Os oligonucleotídeos tem aproximadamente 30 bases, sendo complementares um ao outro e com a troca de interesse situada no meio dos mesmos, e como molde foi utilizado o gene *hutA* clonado no vetor pMR20. Para a reação de PCR foi utilizado 10 ng do molde usando 125 ng dos oligonucleotídeos; 1  $\mu$ l dNTP; 5  $\mu$ l 10x Buffer (a empresa não fornece a composição do buffer) e 1  $\mu$ l da enzima *PfuUltra* HF de alta fidelidade em volume final de 50  $\mu$ l. As condições da PCR foram de 95°C por 1 minuto, seguidos de 18 ciclos de 95°C por 50 segundos, 60°C por 50 segundos e 68°C por 13 minutos. Após os 18 ciclos a reação permaneceu a 68 ° C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C. Após a reação, foi adicionado em cada tubo 1  $\mu$ l da enzima *Dpn* (que terá como função digerir o DNA metilado) e incubado por 1 hora a 37°C. Neste passo ocorre a destruição das fitas molde, de modo que apenas o DNA amplificado e carregando a mutação pontual permanece íntegro. Após a reação com a enzima *Dpn I* o DNA foi utilizado para a transformação em células competentes. Posteriormente o plasmídeo foi extraído das colônias obtidas na transformação e para a confirmação da troca do nucleotídeo foi realizado uma reação de sequenciamento de DNA.

### 3.16 – Crescimento em placas Biolog

A linhagem selvagem NA1000 e as linhagens  $\Delta 02419$  e  $\Delta 02412$  foram inoculadas em meio M2 líquido e incubadas *overnight* a 30°C. Estas foram diluídas em meio mínimo M2 sem glicose para uma densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) igual a 0,15 em 20 ml de M2. Foi utilizada a placa PM1 Carbon Sources (BioLog) onde foram aplicados 150µl de cultura em meio M2 sem glicose em cada poço. O crescimento foi observado e a curva construída a partir da medição do crescimento realizada pelo aparelho SpectraMax Paradigm (Molecular Devices).

### 3.17 – Ensaio de viabilidade

As linhagens NA1000 e as linhagens  $\Delta 00138$ ,  $\Delta 00028$ ,  $\Delta 03023$ ,  $\Delta 02419$ ,  $\Delta 02412$  e  $\Delta 00028Comp$  foram incubadas em meio M2 em temperatura ótima de 30°C sob agitação por uma noite. A seguir, as culturas foram diluídas para um volume de 10 ml em meio M2 sem ferro para uma DO de 0,1 e após diluição seriada retirou-se alíquotas para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Estas foram determinadas em meio M2 sólido com diferentes fontes de ferro ( $FeSO_4$  10 µM, Citrato férrico 10 µM,  $FeCl_3$  10 µM ou Hemina 10 µM), utilizando diluições seriadas das culturas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ). As placas com as diluições foram colocadas na estufa a 30° e o crescimento foi observado depois de 2 e 3 dias.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos mecanismos para a captação de ferro já foram descritos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e demonstraram que uma grande quantidade das bactérias o obtêm de forma complexada, podendo ser através de sideróforos, proteínas ou grupos heme. A obtenção do ferro pode ocorrer de maneiras diversas, dependendo do microorganismo, podendo até mesmo refletir em seu ciclo de vida (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Sendo assim, temos como objetivo caracterizar qual fonte de ferro é transportada por quatro receptores dependentes de TonB (TBDT) de *C. crescentus* que são induzidos em carência de ferro e regulados por FUR (DA SILVA NETO et al., 2009).

### 4.1 Análise *in silício* dos domínios funcionais presentes nos transportadores dependentes de TonB de *Caulobacter crescentus*

As sequências de aminoácidos dos quatro transportadores dependentes de TonB (TBDT) de *C. crescentus* (CCNA\_00138; CCNA\_00028; CCNA\_03023 e HutA), foram comparadas com os respectivos transportadores de *E. coli*: FecA (PDB: 1KMO); FhuA (PDB: 1QFG); FepA (PDB: 1FEP) e BtuB (PDB: 1NQE), bactéria que, além de ser um modelo para diversos mecanismos bacterianos em bactérias Gram-negativas, tem praticamente todo o transporte de ferro já bem conhecido (KREWULAK; VOGEL, 2008).

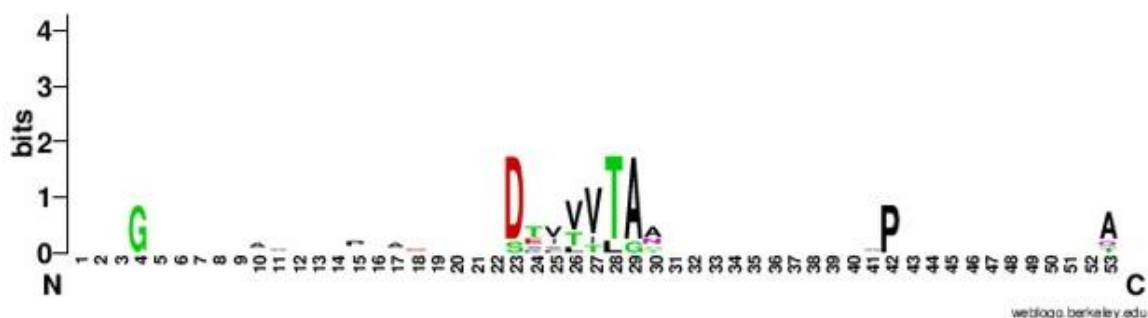
Em *C. crescentus*, ainda são escassos na literatura trabalhos sobre as estruturas dos TBDT, tanto com relação a composição do barril- $\beta$  das proteínas, como também das outras regiões que irão interagir com as demais proteínas do sistema. Para fins de comparação, inicialmente optamos por alinhar cada TBDT de *C. crescentus* com os TBDTs já descritos em *E. coli*, pois assim é possível verificar se os transportadores de *C. crescentus* possuem regiões com alguma similaridade entre as proteínas de membrana contendo barril- $\beta$ . Em todos os alinhamentos marcamos as regiões encontradas através de anotações fornecidas pelos bancos de dados como Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), e além disso sinalizamos os domínios encontrados com o alinhamento. Todos os alinhamentos gerados estão localizados na seção dos Anexos A-D.

Através dos alinhamentos, foi possível identificar uma região conservada localizada próxima ao N-Terminal dos transportadores que pressupomos ser o domínio TonB Box, o que concorda com a literatura, que reporta que este domínio seja caracterizado por conter 8 aminoácidos parcialmente conservados entre os transportadores. Sua função obrigatória é de

interagir com a porção C-Terminal da proteína TonB, e somente através dessa interação temos o sistema TonB-ExbB-ExbD completamente funcional (CHIMENTO; KADNER; WIENER, 2005a).

Os domínios TonB Box em *E. coli* nos transportadores descritos são: (FepA - DTIVVTAA); (FhuA - DTITVTAA); (FecA - DALTVV) e (BtuB - DTLVVTA) (LOCHER et al., 1998; OGIERMAN; BRAUN, 2003). Apesar dos domínios serem compostos por 8 aminoácidos, nem todos irão interagir com o C-Terminal de TonB, sendo apenas 5 aminoácidos responsáveis por esta interação (GRESOCK; POSTLE, 2017). Mediante estas informações, e com os dados gerados pelos alinhamentos foi possível observar que nos transportadores de *C. crescentus* também encontramos 8 aminoácidos similares a estes localizados na mesma região.

Com o transportador CCNA\_00028 de *C. crescentus* (anexo A) temos o aminoácido Valina (V) conservado; já com CCNA\_00138 (anexo B) contém quatro aminoácidos conservados: Aspartato (D), Treonina (T), Leucina (L) e Valina (V); em HutA (anexo C) encontramos quase todos os aminoácidos conservados exceto por um, que no lugar da Treonina há uma Lisina (K) e no transportador CCNA\_03023 (anexo D) também encontramos a mesma situação anterior onde somente um aminoácido não é conservado no TonB Box. Em todos os alinhamentos é possível notar que os aminoácidos mais conservados são Aspartato (D), Leucina (L) e Valina (V). Nota-se também que a posição desses aminoácidos no domínio TonB Box é de certa forma mantida, tendo inicialmente sempre um Aspartato. Ao meio do domínio temos a região mais variável dos aminoácidos, com a presença predominantemente da Leucina, e quando este aminoácido é substituído por outro na sequência, é sempre por algum que tenha a mesma classificação e propriedades semelhantes. A Leucina é classificada como um aminoácido apolar por apresentar uma distribuição homogênea de elétrons em sua cadeia lateral e através dos alinhamentos constatamos que em alguns casos a mesma é substituída por Valina ou Isoleucina, também aminoácidos apolares (Figura 8). Este conceito é aplicado no caso de todas as substituições, pois a sequência de aminoácidos é quem determinará posteriormente qual será a estrutura dessa proteína e o dobramento necessita ocorrer de forma semelhante, caso contrário a proteína ficará inativa. Na porção final do domínio TonB Box de todos os transportadores de *E. coli* e de *C. crescentus* encontra-se a predominância dos aminoácidos Treonina e Alanina.



**Figura 8 – Representação dos aminoácidos conservados no domínio TonB Box.** WebLogo gerado a partir dos alinhamentos dos 4 transportadores de *E. coli* e dos 4 de *C. crescentus* demonstrando no centro da figura os aminoácidos conservados no TonB Box de todos esses transportadores.

Outra região analisada a partir do alinhamento foi o domínio do *plug* que é onde se localiza o domínio TonB Box. Em todos os alinhamentos (Anexo A-D) na região do *plug* foi observada a conservação de alguns aminoácidos. É sabido que o *plug* pode possuir uma interação com o barril- $\beta$  e até mesmo com os sideróforos, porém a sua função principal é o desdobramento para a região periplasmática. Para que o *plug* realize sua função principal, o sideróforo precisa interagir com a proteína transportadora, e como resultado dessa interação o *plug* se desdobra fazendo que a região N-Terminal fique exposta no periplasma e assim interaja com o C-Terminal da proteína TonB. Devido ao desdobramento do *plug* o interior do barril- $\beta$  fica livre permitindo assim a passagem do sideróforo (CASCALES et al., 2007; FERGUSON; DEISENHOFER, 2002a, 2004).

O último domínio identificado pelos alinhamentos foram as 22 fitas  $\beta$  antiparalelas que irão compor o barril. Entre todas as fitas é possível notar aminoácidos que se conservam em todos os transportadores, porém esta é a região em que menos se detecta conservação entre as sequências, possuindo pouca conservação no C-terminal do barril- $\beta$  de todos os transportadores (CHANG et al., 2001; FERGUSON; DEISENHOFER, 2002b; GRESOCK; POSTLE, 2017).

Em adição às informações geradas pelos alinhamentos, decidimos averiguar a identidade de sequência dos transportadores TBDTs de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. crescentus*. Para isso utilizamos o BLAST Protein, onde comparando novamente as regiões de maior similaridade das sequências é informada a porcentagem de identidade de cada bloco, que é demonstrado na Tabela 6.

**TABELA 6 – Porcentagem de identidade entre os quatros transportadores de *E. coli* e dois de *P. aeruginosa* com relação aos de *C. crescentus* mediante comparação das sequências de aminoácidos. As sequências das proteínas utilizadas estão demonstradas pelo código do PDB. Resultados gerados pelo BLAST Protein.**

%	CCNA_00028	CCNA_00138	CCNA_03023	<i>hutA</i>
<b>FecA (PDB: 1KMO)</b>	32/117* 27%	169/693* 24%	74/296* 25%	48/216* 22%
<b>FepA (PDB: 1FEP)</b>	53/209* 25%	49/171* 29%	27/147* 25%	82/344* 24%
<b>FhuA (PDB: 1QFG)</b>	175/792* 22%	35/152* 23%	165/675* 24%	52/196* 27%
<b>BtuB (PDB: 1NQE)</b>	57/200* 29%	64/231* 28%	51/205* 25%	52/170* 31%
<b>PiuA (PDB: 5FP1)</b>	274/721* 38%	56/206* 27%	161/684* 24%	51/199* 26%
<b>PirA (PDB: 5FP2)</b>	50/165* 30%	74/300* 25%	28/84* 34%	48/149* 32%

\* melhor resultado gerado pelo BLAST protein, sendo o percentual de identidade obtido através dessa localidade de comparação

Após o resultado gerado pelo BLAST Protein, podemos dizer que apesar dos transportadores possuírem uma estrutura quaternária clássica estabelecida principalmente pelo barril- $\beta$ , o mesmo não é observado quando se comparam as suas sequências de aminoácidos, onde o maior valor de identidade obtido foi de 30%. Entretanto, apesar dos valores de identidade entre eles não ser tão alto, este valor é aceito no caso de proteínas de membrana externa, porque apesar da variedade de aminoácidos os mesmos conseguem manter o dobramento correto da proteína.

#### **4.1.2 Análise *in silício* dos domínios presentes nas proteínas de TonB de *Caulobacter crescentus***

Semelhantemente à análise feita com os TBDTs de *C. crescentus*, realizamos uma análise de sequência com as proteínas TonB que estão presentes na membrana interna das células Gram-negativas e que irão interagir com os transportadores. Assim como nos

transportadores, pouco se sabe sobre as outras três proteínas que compõe o sistema em *C. crescentus*: TonB, ExbB e ExbD.

*C. crescentus* apresenta em seu genoma dois genes que codificam duas proteínas TonB: o gene CCNA\_02419 que codifica o *tonB1*, e CCNA\_02412 o *tonB2* (LOHMILLER et al., 2008). O gene CCNA\_02419 está anotado como fazendo parte de um operon junto com ExbB e ExbD e foi caracterizado como sendo um gene *high fitness*. Já o gene CCNA\_02412 não apresenta estas características (CHRISTEN et al., 2011).

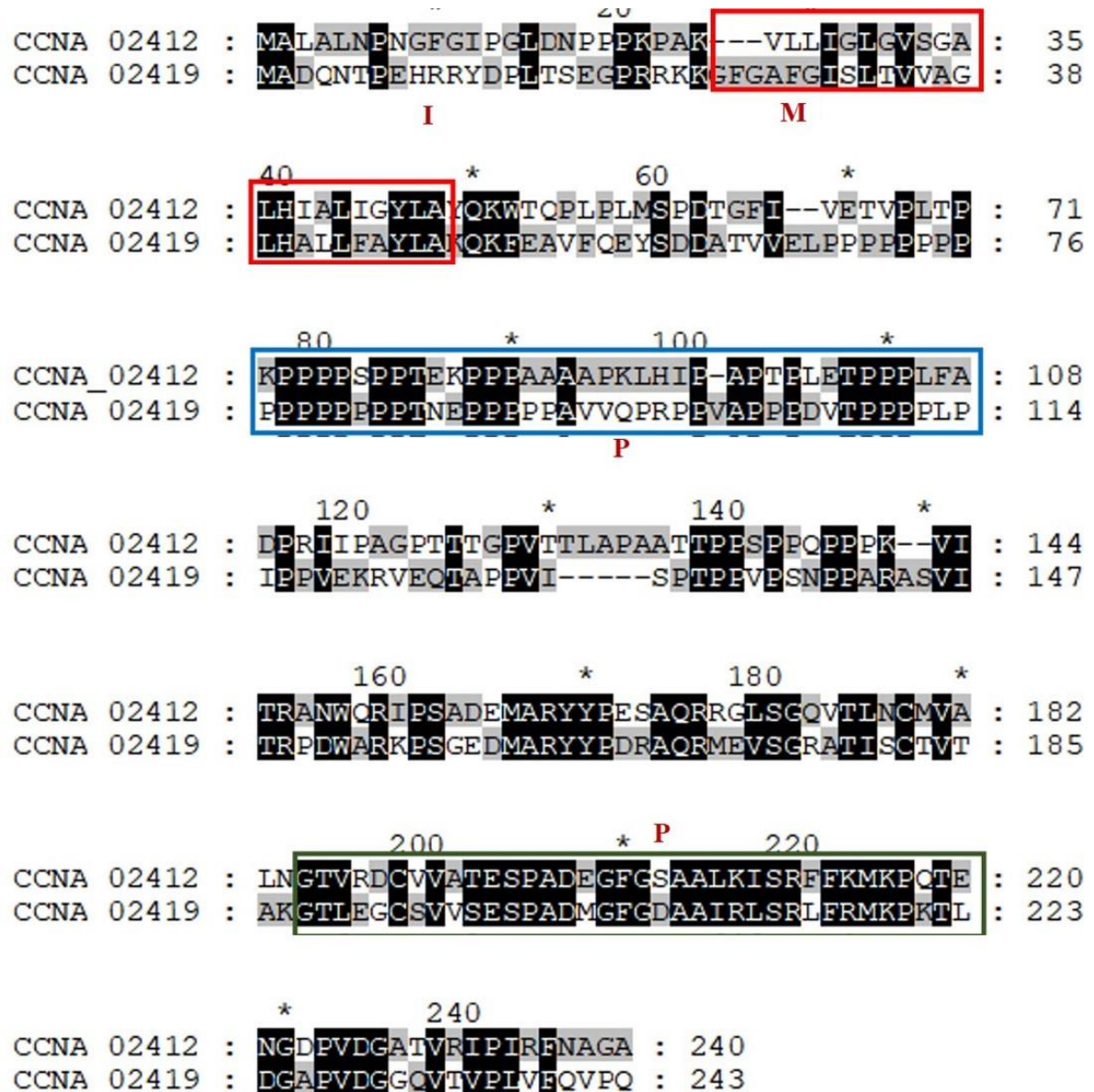
Desta maneira, primeiramente alinhamos apenas as duas proteínas TonBs de *C. crescentus* com a finalidade de se esclarecer mais sobre essas proteínas. O alinhamento foi feito pelo programa MAFFT (KATO et al., 2002) e para facilitar a observação dos resultados utilizamos o programa GeneDoc para gerar a imagem final (NICHOLAS et al., 1997). O resultado pode ser visto na Figura 9.

Através do alinhamento podemos identificar algumas regiões extremamente conservadas em ambos os TonBs de *C. crescentus*, o que já pressupõe que sua estrutura quaternária seja muito semelhante. Através de informações contidas no banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), obtivemos as seguintes sequências: FGAFGISLTVVAGLHALLFAYLA (CCNA\_02419) e VLLIGLVSGALHIALIGYLAY (CCNA\_02412) que possivelmente são as regiões de ancoramento na membrana interna.

Como demonstrado no início do alinhamento, a identificação (I) indica que a região está presente no citoplasma da célula, (M) que a região está inserida dentro da membrana interna e (P) que a região da proteína TonB se estende pelo periplasma. Mediante estas informações e outras descritas na literatura, as sequências da caixa vermelha e que estão aproximadamente entre os resíduos 23 – 48 compartilham a mesma localização encontrada na proteína TonB de *E. coli* (CARTER et al., 2006; CHU et al., 2014; KREWULAK; VOGEL, 2008). Isso nos permite prever que esta região (M) seria o N-Terminal do TonB e este domínio está localizado na membrana interna (KOEDDING et al., 2004).

A região com a marca (P) da caixa azul é a região de TonB que se estende por todo o citoplasma e que irá interagir com o C-terminal da proteína ExbD, a responsável por fornecer energia ao sistema. A partir desta interação é formado um heterodímero, deixando assim TonB ‘energizado’ garantindo a energia para o transporte do sideróforo pelo receptor de membrana externa (SVERZHINSKY et al., 2015). Por último, a caixa verde indica a localização do C-terminal da proteína TonB o qual também se encontra no periplasma da célula, que irá interagir com a região N-terminal do *plug* presente no receptor de membrana externa, conhecido como TonB box.





**Figura 9** – Alinhamento das sequências de aminoácidos dos produtos dos genes CCNA\_02419 (*tonB1*) e CCNA\_02412 (*tonB2*) de *C. crescentus*. As caixas vermelhas indicam a região N-Terminal, a caixa azul a região periplasmática e a caixa verde a região C-Terminal. As letras em vermelham indicam a localização na célula: (I) parte interna ou citoplasma; (M) a membrana citoplasmática e (P) região periplasmática. Alinhamento realizado com os programas MAFFT e Gene Doc.

## 4.2 Modelagem das proteínas do sistema TonB-ExbB-ExbD de *Caulobacter crescentus*

Inicialmente avaliamos a predição da disposição dessas proteínas na membrana, para isso fizemos uso do programa PRED-TMBB2 (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TMBB2>)

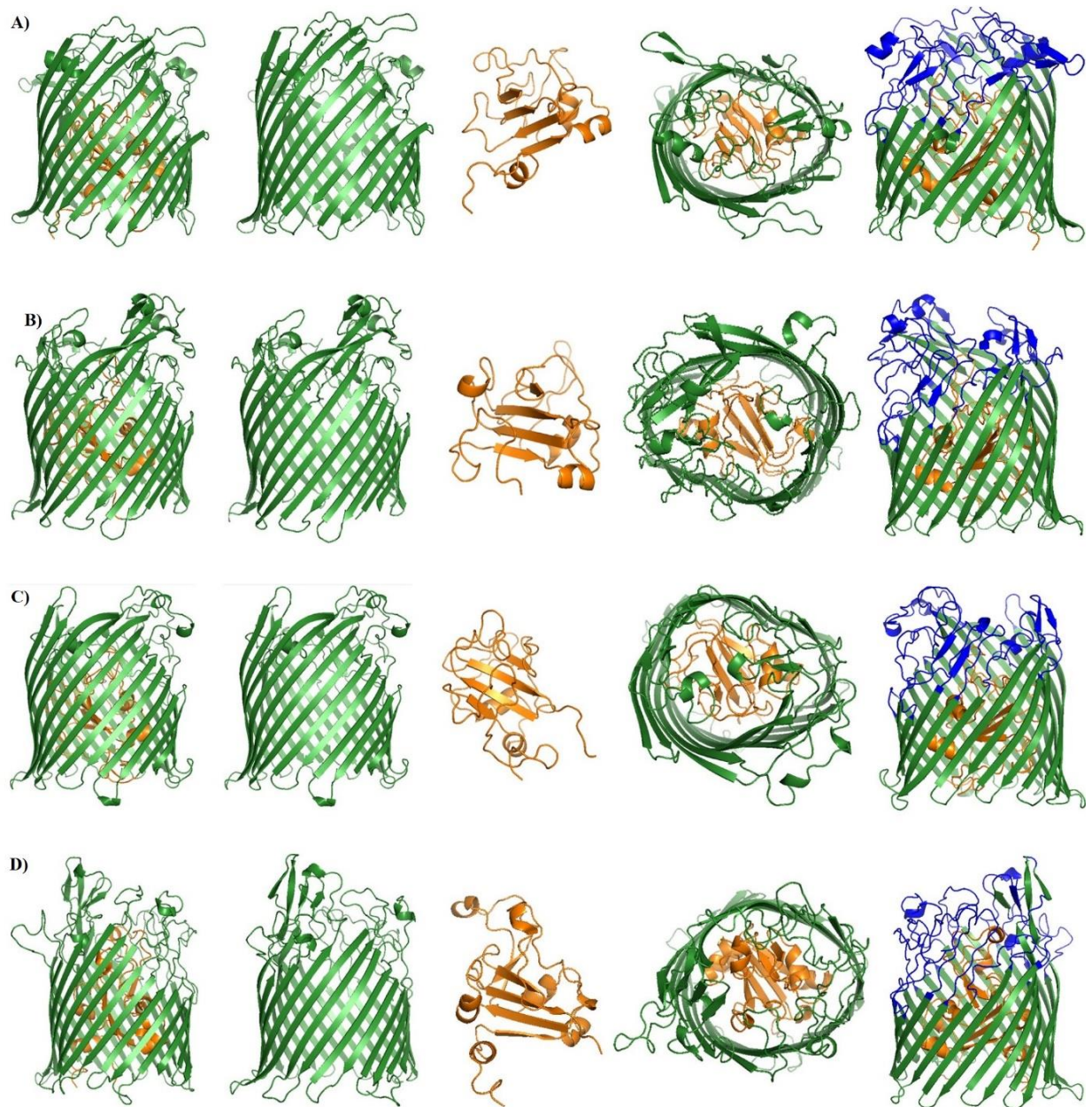
que é capaz de fornecer informações sobre a topologia de todas as partes da proteína, como por exemplo se uma fita beta se encontra na membrana, fora ou interna a ela. Estas informações são concedidas em texto ou graficamente (BAGOS et al., 2004; TSIRIGOS; ELOFSSON; BAGOS, 2016). A escolha por conferir inicialmente a topologia das proteínas é para termos a certeza que as mesmas apresentam a mesma predição para as de *E. coli* (FepA; FhuA; FecA e BtuB) que já são caracterizadas (FERGUSON; DEISENHOFER, 2002b; NOINAJ et al., 2010a).

Mesmo com os dados obtidos pela predição sobre as topologias (Anexos E ao H), efetuamos a modelagem das proteínas de *C. crescentus* a partir da utilização do programa Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>), que gera o modelo comparando as sequências com um banco de dados de estruturas de proteínas já resolvidas. Basicamente todo o processo é composto por quatro etapas sendo elas: a identificação do modelo estrutural, alinhamento da sequência alvo e estrutura do modelo, a construção do modelo e pôr fim a avaliação da qualidade do modelo gerado (GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2003).

Os primeiros modelos que geramos foram os dos transportadores TDBTs de *C. crescentus*, os quais esperávamos que as características encontradas fossem semelhantes com as de transportadores já caracterizados de bactérias como *E. coli* (FERGUSON, 2002; LOCHER et al., 1998) e outras bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Pectobacterium spp* e *Burkholderia thailandensis* (BOUVIER; CÉZARD, 2017; GRINTER et al., 2016; HASSAN et al., 2016; HICKMAN et al., 2017; MOYNIÉ et al., 2017).

Os quatro modelos criados para os transportadores de ferro de *C. crescentus* apresentaram porcentagens de identidade diferentes entre si, sendo CCNA\_00028 teve 39,91%; e HutA 18,21% com o transportador PiuA de *Acinetobacter baumannii* e CCNA\_03023 obteve 18,59% com o transportadores FpvAI de *Pseudomonas aeruginosa* (Anexo I ao L) (MOYNIÉ et al., 2017; WHITE et al., 2007). Já o transportador CCNA\_00138 foi o único que apresentou uma identidade de 23% com o transportador FecA de *E. coli*. Da mesma forma, como foi observado com os alinhamentos, a porcentagem de identidade das proteínas não apresentou um valor tão alto, isso pode ser devido aos *loops*, que é uma região não estruturada e que representa uma região muito variada.

As informações geradas inicialmente através da predição foram aplicadas nos modelos de nossos transportadores, onde ressaltamos as suas regiões com a ajuda do programa Pymol (Figura 10).



**Figura 10 – Modelagem dos transportadores dependentes de TonB (TBDT) de *Caulobacter crescentus*.** (A) CCNA\_00138; (B) CCNA\_00028; (C) CCNA\_03023 e (D) *hutA*. As colunas (da esquerda para direita): TBDT inteiro e domínio *plug* pintado de laranja e o barril- $\beta$  de verde; barril- $\beta$  isolado; domínio *plug* isolado; TBDT inteiro com vista do superior e TBDT inteiro com os *loops* pintados de azul. As marcações dos domínios foram realizadas utilizando o programa Pymol Molecular Graphics System, versão 2.0 Schrödinger, LLC.

Com a modelagem podemos afirmar que os TBDTs de *C. crescentus* também apresentam as mesmas características que os outros transportadores dependentes de TonB (CHIMENTO; KADNER; WIENER, 2005a; SCHALK; MISLIN; BRILLET, 2012;

THERIAULT; NKONGOLO, 2017). Contudo, o fato mais interessante é que cada transportador é específico para a substância que ele transporta, ou seja, em uma bactéria como *C. crescentus*, que possui 62 transportadores dependentes de TonB (NIERMAN et al., 2001), todos realizarão um transporte específico. No caso do transporte de ferro, cada um dos quatro transportadores pode transportar um tipo de sideróforo. Isto pode estar relacionado com o fato de que a maioria dos transportadores difere somente na região superior, onde são encontrados os *loops* que são responsáveis por fazer o primeiro contato com os sideróforos.

A interação dos sideróforos com os *loops* é independente de energia e na maioria das vezes esses *loops* apresentam cadeias laterais curtas que lhes conferem uma certa mobilidade (BARNARD; WATSON; MCINTOSH, 2001; GRINTER et al., 2016; SMALLWOOD et al., 2014). Desta forma, devido ao contato com o sideróforo ser específico, cada transportador terá a presença de aminoácidos diferentes na composição desses *loops* (SCHALK; MISLIN; BRILLET, 2012). Isso também faz com que exista uma estrutura diferente no topo da proteína o que pode ser visto na última coluna da figura 10, na qual os *loops* estão representados pela cor azul.

Outro fenômeno observado nos *loops*, relacionado aos diferentes aminoácidos que os compõem, é que cada transportador tem uma carga diferente que está relacionada com os aminoácidos presentes. Na proteína FecA de *E. coli*, responsável pelo transporte de citrato férrico, a ‘bolsa’ de ligação do sideróforo é revestida por aminoácidos que são carregados positivamente (FERGUSON, 2002; YUE; GRIZOT; BUCHANAN, 2003), e em FhuA de *E. coli* ocorre uma predominância por resíduos aromáticos (COBESSI; CELIA; PATTUS, 2005; FERGUSON et al., 1998a). Não foi possível determinar uma carga predominante nos *loops* dos TBDTs de *C. crescentus*, e ainda está sendo averiguado qual o sideróforo a ser utilizado por cada um para permitir esta correlação.

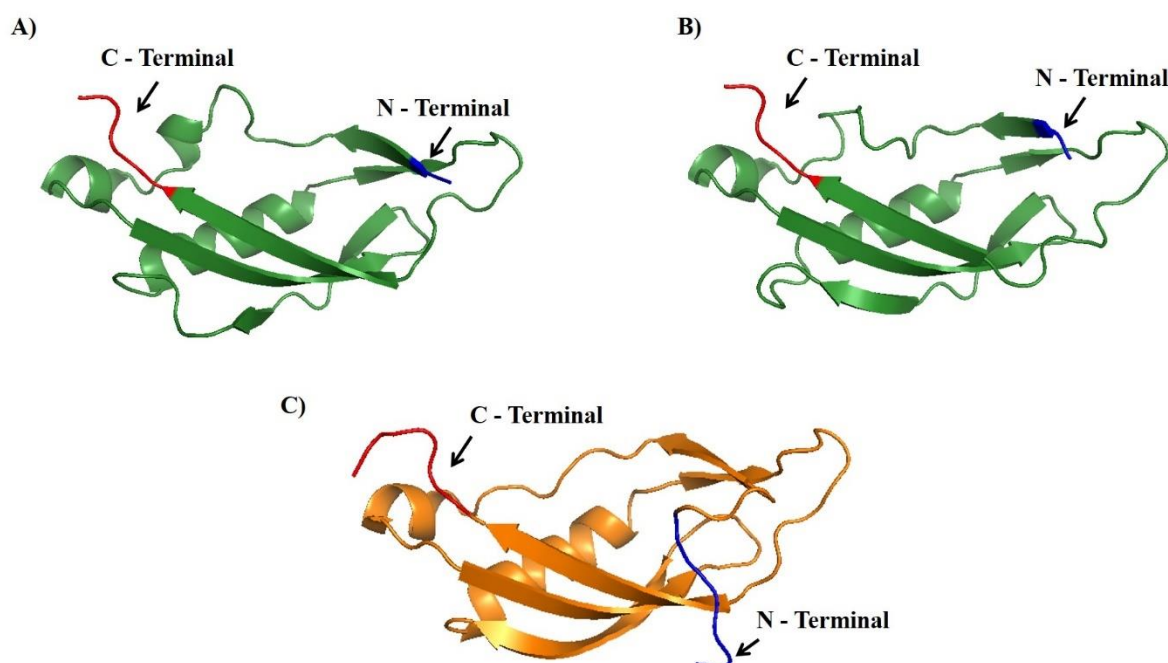
#### **4.2.1 Modelagem das proteínas de TonB de *Caulobacter crescentus***

A mesma abordagem utilizada para a obtenção dos modelos dos TBDTs foi empregada para as proteínas TonB, que foram determinados a partir do Swiss Model após alinhamento das sequências de aminoácidos com proteínas dos bancos de dados.

As duas proteínas TonB de *C. crescentus* deram uma melhor porcentagem de identidade com a proteína TonB de *P. aeruginosa*, onde a proteína TonB1 apresentou 22,73% de identidade e a TonB2, 20,69% de identidade. Dado que *P. aeruginosa* é uma bactéria patogênica da família das  $\gamma$ -proteobactérias, é interessante observar que possivelmente as proteínas TonBs



nas Proteobactérias não possuem grandes diferenças em sua estrutura. Os modelos obtidos das proteínas TonBs de *C. crescentus* estão na Figura 11.



**Figura 11 – Modelos das proteínas TonB de *C. crescentus* e *P. aeruginosa*.** Modelos da estrutura, realizado pelo programa Swiss-Model. (A) CCNA\_02419 (TonB1); (B) CCNA\_02412 (TonB2); (C) TonB de *P. aeruginosa* que foi utilizado como *template* pelo Swiss-Model com melhor homologia (PDB: 1XX3). Algumas regiões das TonBs estão apontadas com seta sendo elas: N-Terminal (azul); C-Terminal (vermelho). As estruturas foram observadas utilizando o programa PyMOL.

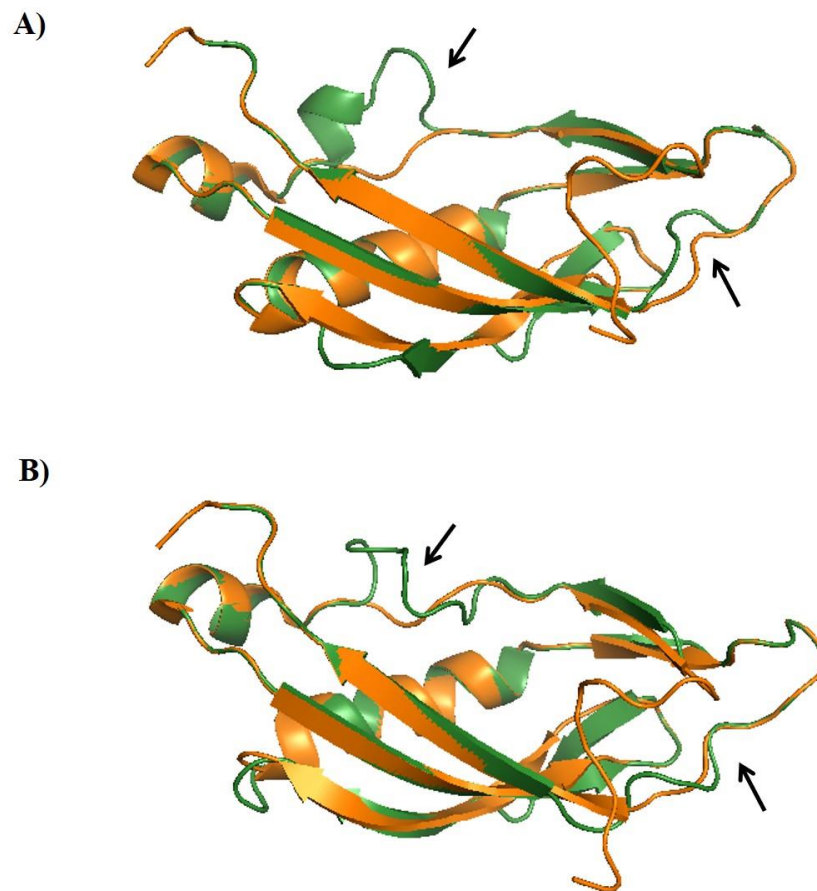
A proteína TonB de *E. coli* é composta por apenas 239 aminoácidos (POSTLE, 1993), e em *C. crescentus*, TonB1 possui 243 aminoácidos, enquanto TonB2 possui 240 aminoácidos. A proteína TonB pode ser considerada a ‘chave’ para todo o sistema TonB-ExbB-ExbD, devido à sua função essencial que é relacionada com a energização do sistema para que ocorra o transporte do substrato. Localizada na membrana interna das Gram-negativas, ela é composta por três domínios sendo eles: (1) N-terminal que basicamente possui três funções: (a) ancoragem de TonB na membrana citoplasmática realizada pela  $\alpha$  hélice situada próxima ao N-terminal; (b) uma sequência rica em Prolina e Lisina, para facilitar o movimento de TonB no periplasma e (c) realiza uma interação com ExbB/ExbD, porém ainda não se sabe se essa interação seria para estabilização ou transdução de energia; (2) Domínio rico em Prolina (P),

que é uma extensão da proteína por todo espaço periplasmático que garante a flexibilidade desta extensão; (3) C-terminal posicionado logo após ao domínio do periplasma, que é o que interage com o N-terminal dos TBDTs mais especificamente o TonB box (CHANG et al., 2001; CHU; PEACOCK; VOGEL, 2007; OEEMIG; OLLILA; IWAĪ, 2018; POSTLE; KADNER, 2003; SVERZHINSKY et al., 2015).

Além das funções realizadas por cada domínio, a proteína TonB participa da transdução da energia para o sistema, por isso a mesma interage com outras duas proteínas também posicionadas na membrana citoplasmática, as proteínas ExbB e ExbD. Através da interação com ExbD, responsável por utilizar a força próton motriz (PMF) da membrana citoplásmica para ficar ‘energizada’ (LARSEN; THOMAS; POSTLE, 1999; LILL et al., 2016; OLLIS; POSTLE, 2012), é formado um heterodímero com TonB que irá transferir a energia para ExbD (GRESOCK; KASTEAD; POSTLE, 2015b). Com TonB energizado, o domínio periplasmático se enrijece, e o C-terminal irá interagir com o TonB box presente no *plug* e a partir disso uma mudança conformacional ocorre no sistema, o que garante que o *plug* do barril  $\beta$  do transportador TBDT desdobre e se direcione ao periplasma deixando o interior do barril  $\beta$  livre para a passagem do sideróforo (CELIA et al., 2016; HICKMAN et al., 2017; THERIAULT; NKONGOLO, 2017).

Um dos fenômenos mais relacionado com o sistema TonB-ExbB-ExbD é a mudança conformacional que ocorre após o sistema ficar energizado por TonB. Hipóteses têm sido levantadas para tentar descrever e caracterizar como a mudança conformacional ocorre em si. Diversos modelos já foram propostos, porém ainda não se tem certeza de qual seria o correto (KLEBBA, 2016; KREWULAK; VOGEL, 2011; NOINAJ et al., 2010b). Ainda não se sabe em qual proteína ocorre a mudança, a maior suspeita é que seja em TonB, pois a mesma está em contato com as duas membranas ao mesmo tempo durante a transdução de energia (POSTLE; KADNER, 2003).

Deste modo, comparamos os modelos anteriormente determinados para as proteínas TonBs de *C. crescentus*, com a de *P. aeruginosa*, a fim de se observar semelhanças estruturais (Figura 12).



**Figura 12 – Comparação entre as proteínas TonB de *C. crescentus* e *P. aeruginosa*.** (A) TonB1 (verde) e proteína TonB *P. aeruginosa* (laranja); (B) TonB2 (verde) e proteína TonB *P. aeruginosa* (laranja). As setas apresentadas nas imagens A e B apontam as únicas diferenças obtidas através da comparação. Molde *P. aeruginosa* (PDB: 1XX3). As estruturas foram observadas utilizando o programa PyMOL.

Com o resultado da comparação da Figura 12, foi possível constatar que existem grandes semelhanças estruturais entre os TonBs de *C. crescentus* e *P. aeruginosa*. No entanto, observamos uma  $\alpha$  hélice na proteína TonB1 de *C. crescentus* (verde) que não está presente em *P. aeruginosa* (laranja), além de um pequeno dobramento desigual nos *loops*, assim como verificamos quando comparada com a TonB2 de *C. crescentus*.

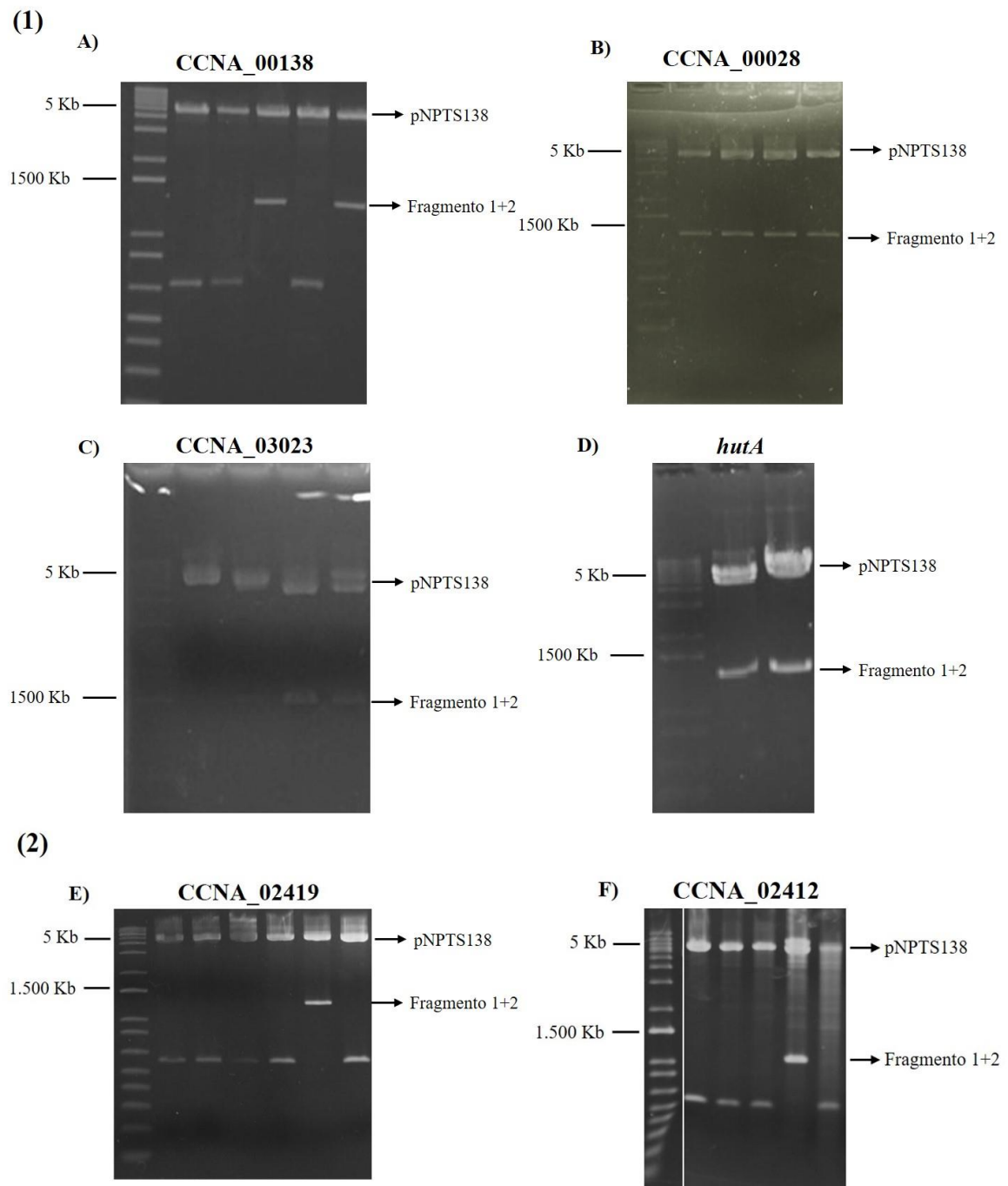
Os dados apresentados a partir da obtenção do modelo predito permitiram que tivéssemos um maior entendimento e conhecimento sobre os TonBs de *C. crescentus*, mas ainda é necessário um estudo mais aprofundado sobre os domínios presentes nessas proteínas, uma melhor caracterização de sua estrutura e uma melhor compreensão sobre as funções dos aminoácidos que a compõem.

### **4.3 - Obtenção das linhagens mutantes dos genes que participam do sistema TonB-ExbB-ExbD de *Caulobacter crescentus***

Diante da caracterização estrutural das proteínas que compõe o sistema TonB-ExbB-ExbD, realizamos a construção de linhagens com esses genes deletados, a fim de avaliar o seu papel fisiológico, e observar como a célula se comportaria na ausência desses genes em comparação com a linhagem selvagem.

Para isto realizamos a obtenção das linhagens mutantes para cada um dos genes do sistema. A princípio os receptores dependentes de TonB (TBDTs): CCNA\_00138, CCNA\_00028, CCNA\_03023 e HutA, e posteriormente as proteínas TonB1 e TonB2. No caso das proteínas TonBs queríamos investigar se as proteínas teriam alguma especificidade para com os TBDTs de transporte de ferro. Inicialmente foi realizada a clonagem das regiões flanqueadoras (*upstream* e *downstream*) de cada gene no plasmídeo pGEM-T Easy. Logo após obter as clonagens dos fragmentos flanqueadores de cada gene ligados *in tandem*, os mesmos foram digeridos com as enzimas dos sítios de restrição externos contidos nos oligonucleotídeos, conforme descrito na Tabela 4. Posteriormente os fragmentos foram clonados em outro plasmídeo, o pNPTS138, que não é replicativo em *C. crescentus*, perpetuando-se apenas por integração ao cromossomo da célula e a partir disso confirmamos os clones positivos por digestão (Figura 13).



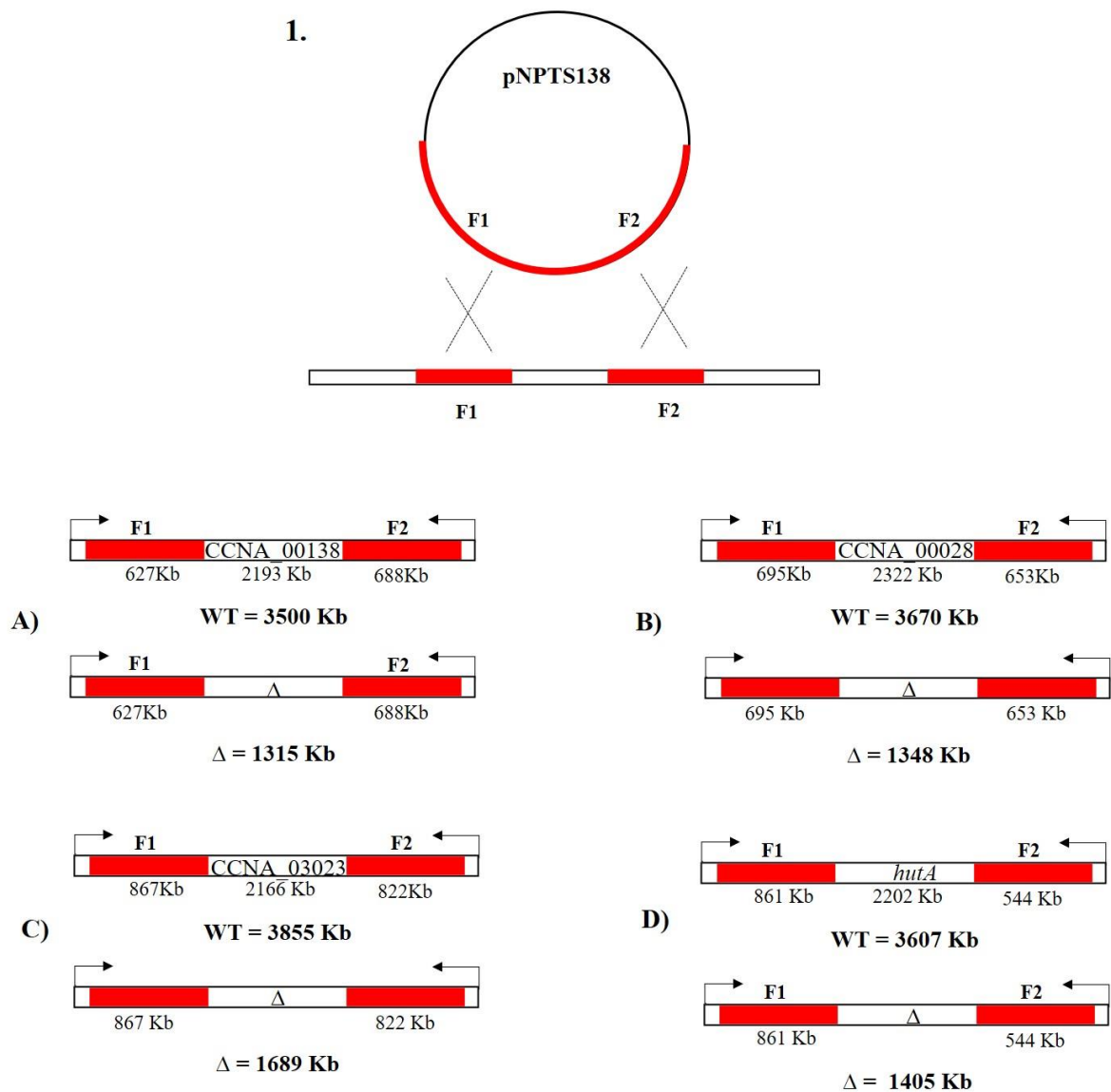


**Figura 13 – Confirmação por digestão das inserções dos fragmentos 1 e 2 no vetor pNPTS138. (1) receptores dependentes de TonB TBDTs.** Confirmação da obtenção do plasmídeo pNPTS138 contendo os dois fragmentos (A) CCNA\_000138; (B) CCNA\_00028; (C) CCNA\_03023; (D) *hutA*. **(2) proteínas TonBs.** Confirmação da obtenção do plasmídeo pNPTS138 contendo os dois fragmentos (A) CCNA\_02419; (B) CCNA\_02412. Visualização em gel de agarose 1%.

### 4.3.1 – Confirmação das linhagens mutantes

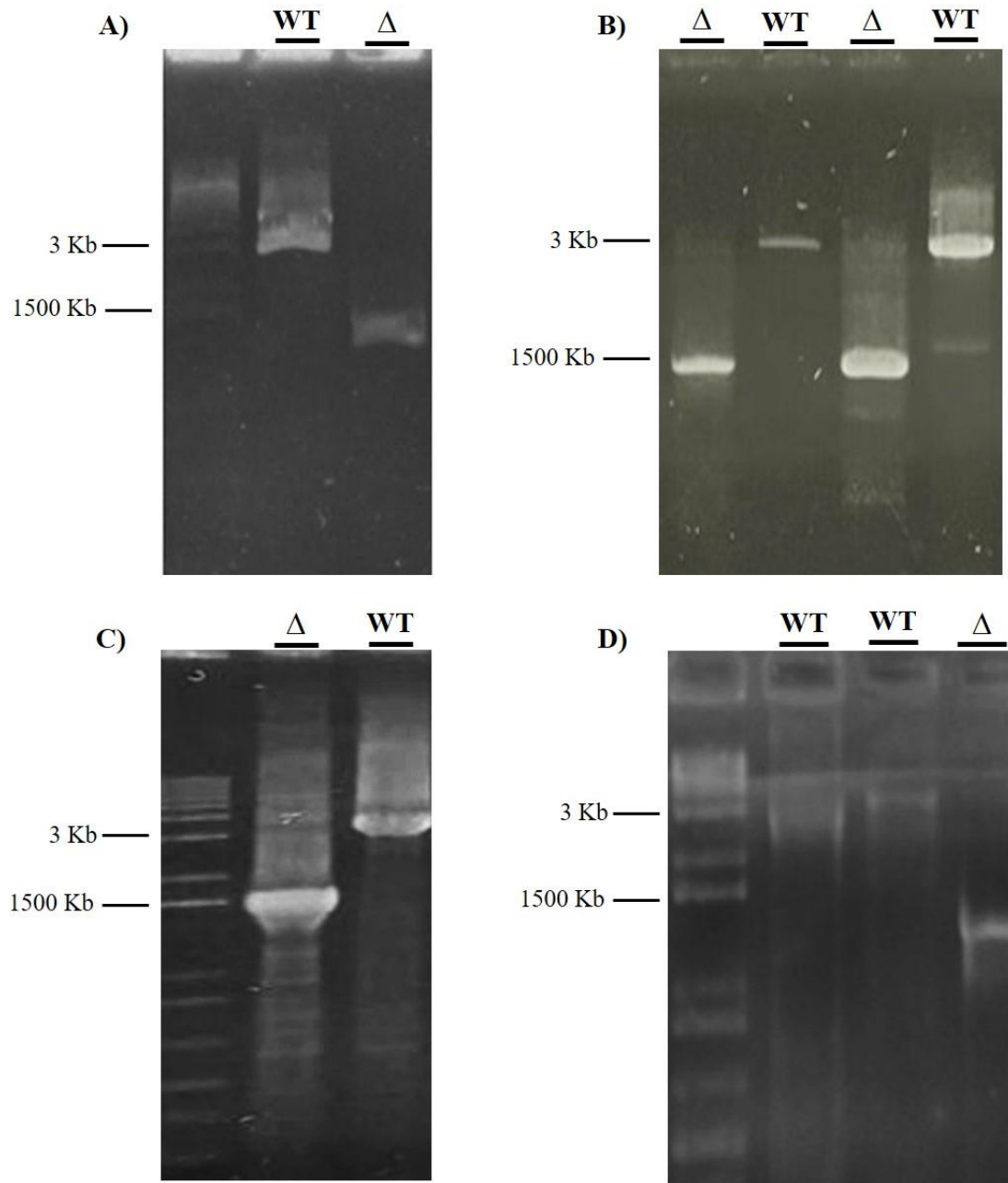
Tendo obtido as construções do vetor pNPTS138 contendo os fragmentos 1 e 2 de cada gene, estes foram inseridos por eletroporação em *E. coli* S17-1 para posteriormente serem passados por conjugação para a linhagem *C. crescentus* NA1000. Logo após realizar duas passagens em placas PYE+Nal+Kan é esperado que tenha ocorrido o primeiro evento da recombinação homóloga, e o plasmídeo tenha integrado no cromossomo. É previsto que após dois eventos de recombinação homóloga, poderá ocorrer a troca da sequência residente pela nova sequência com o gene deletado. Posteriormente a seleção irá ocorrer com crescimento em meio rico e em duplicata utilizando os antibióticos que o vetor apresenta como marca de resistência (no caso do pNPTS138 a canamicina). Posterior à escolha das colônias sensíveis a canamicina, iniciamos a busca por aquelas que perderam o gene de interesse do cromossomo. Para isto, adotamos primeiramente a estratégia de se avaliar pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e realizamos a extração de DNA cromossômico dos possíveis mutantes e da linhagem selvagem NA1000.

Na PCR de confirmação dos mutantes, esperamos como resultado a amplificação do gene na linhagem NA1000 um tamanho aproximadamente de quase 4 Kb, pois o gene está presente em seu cromossomo; nas linhagens mutantes, onde o gene foi deletado, esperamos um tamanho menor referente à perda do gene no cromossomo. Construímos um esquema demonstrando os valores referentes a cada TBDT (Figura 14).



**Figura 14 – Esquema representativo da clonagem dos fragmentos 1 e 2 no plasmídeo pNPTS138 para a construção das linhagens mutantes de cada TBDT. (1)** Representação do evento da recombinação homóloga, com o plasmídeo pNPTS138 contendo as regiões flanqueadoras (vermelho) de cada TBDT e logo após ocorrer a recombinação, demonstrando a disposição no cromossomo da bactéria; **(2)** Representação dos tamanhos das linhagens (WT) e ( $\Delta$ ), (A) CCNA\_00138; (B) CCNA\_00028; (C) CCNA\_03023 e (D) *hutA*.

Usando os primers 1 e 4 de cada gene (Tabela 5), obtivemos os seguintes resultados para o PCR de confirmação (Figura 15).

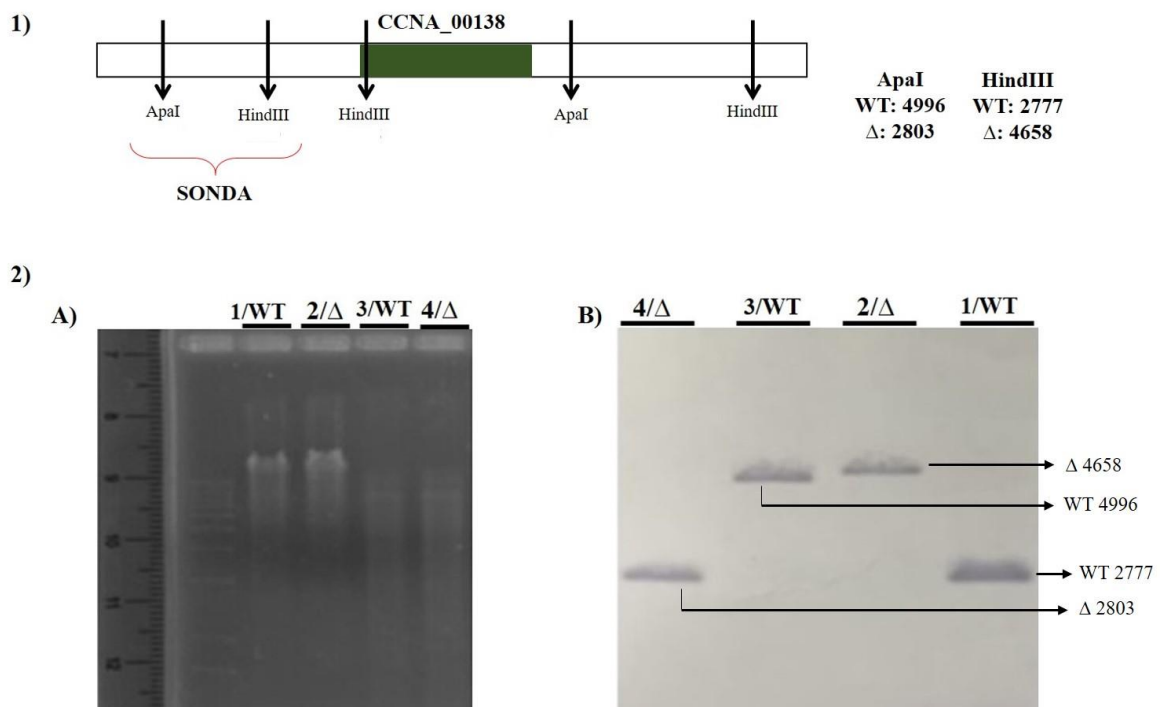


**Figura 15 – Confirmação da deleção dos TBDTs por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).** Comprovação da banda obtida após a realização do PCR utilizando os primers 1 e 4 na cepa selvagem (WT) e dos mutantes ( $\Delta$ ): (A) CCNA\_00138; (B) CCNA\_00028; (C) CCNA\_03023; (D) *hutA*. Visualização por eletroforese em gel de agarose 1%.

De acordo com os resultados das PCRs conseguimos identificar as linhagens que apresentavam os genes deletados. Além disso, a metodologia de *Southern Blotting* foi adotada

como uma segunda estratégia para confirmação das linhagens mutantes que é uma das técnicas de hibridização mais utilizada para a detecção de sequências específicas de DNA (ver item 3.9).

Para os genes CCNA\_00138 e CCNA\_00028 utilizamos os primers 1 e 2 (Tabela 5) e para o gene CCNA\_03023 os primers 3 e 4 (Tabela 5), todas as sondas foram marcadas com nucleotídeos biotinilados e reveladas por estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina, usando o substrato BCIP-T/NBT. O DNA foi digerido com uma ou mais enzimas de restrição específicas para cada gene, os fragmentos gerados pela digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% conforme visto na figura na figura 16A e 17A.

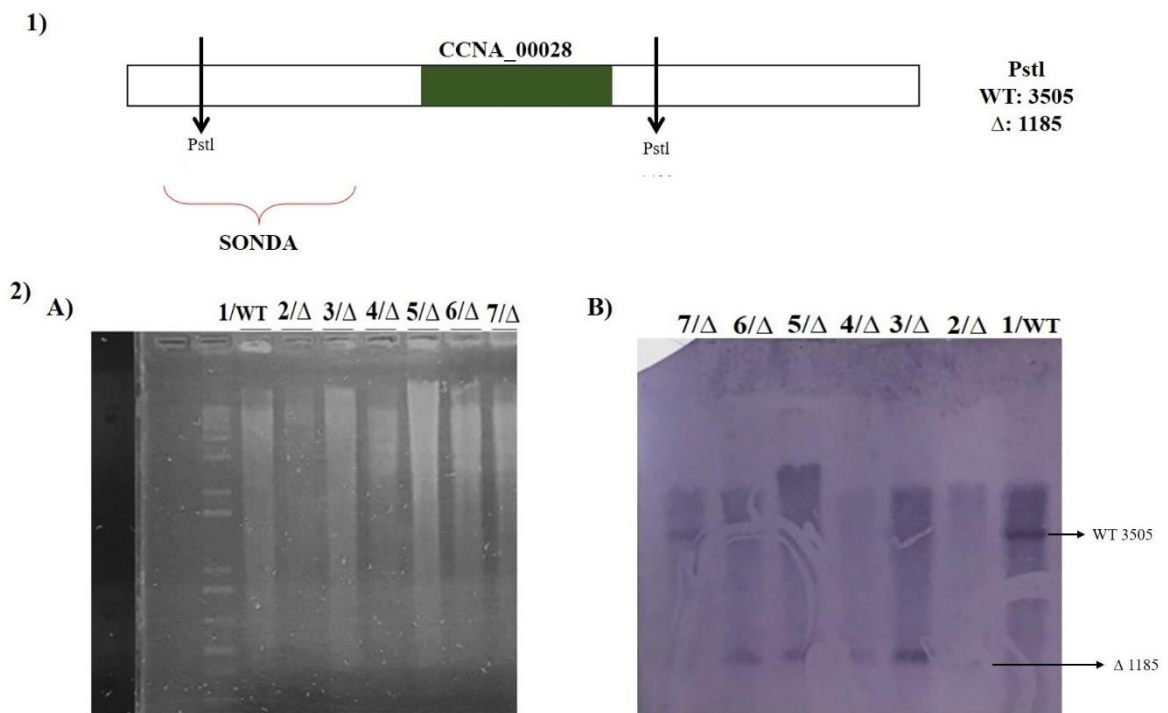


**Figura 16 – Verificação das linhagens com o gene CCNA\_00138 possivelmente deletado pela metodologia de Southern blotting (1) Esquema representativo das regiões utilizadas para a construção das sondas empregadas na técnica de Southern Blotting.** O quadro em verde corresponde a localização do gene no cromossomo, as setas indicam o sítio de clivagem das enzimas de restrição utilizadas. (2) (A) Gel de 1,5% agarose resultantes da eletroforese a 80V durante 2 horas mostrando a digestões do DNA das linhagens mutantes e da linhagem selvagem. (B) Membrana de nitrocelulose + resultante do Southern blotting do gene CCNA\_00138 mostrando as bandas após a hibridização com a sonda específica e detecção. Legenda: (1/WT) NA1000; (2/Δ) Δ00138-36; (3/WT) NA1000; (4/Δ) Δ00138-36.

O Southern blotting do gene CCNA\_00138, confirmou que as linhagens analisadas como possíveis mutantes realmente perderam o gene de interesse. A digestão da linhagem NA1000(1/WT) feita com a enzima de restrição HindIII gera uma banda por volta de 2.777 kb, entretanto, para o Δ00138 (2/Δ) é esperado o tamanho de 4.658 Kb. Já quando o DNA é digerido

com a enzima *ApaI* que possui outro sítio de clivagem esperamos o inverso, assim, a linhagem NA1000(3/WT) tem um tamanho maior por volta de 5 Kb quando comparado com a linhagem  $\Delta$ 00138(4/ $\Delta$ ) que possui o tamanho de aproximadamente 3 Kb. No caso do gene *CCNA\_00138* conseguimos utilizar duas enzimas de restrição diferentes, porque ambas tinham sítios de clivagem em regiões próximas ao gene que facilitaram o entendimento final do resultado.

Para o gene *CCNA\_00028* escolhemos digerir o DNA genômico com a enzima de restrição *PstI* que geraria fragmentos de tamanho esperado para a linhagem NA1000 de aproximadamente 3,5 Kb, e para as linhagens mutantes o tamanho de 1,2 Kb. Como observado na figura 22, em uma mesma membrana de nitrocelulose testamos sete linhagens candidatas a mutante, e podemos concluir que as linhagens de 2 a 6 perderam o gene de interesse após os eventos de recombinação homóloga, mas a linhagem 7 é um revertente para selvagem. O resultado obtido pode ser visto na figura 17.



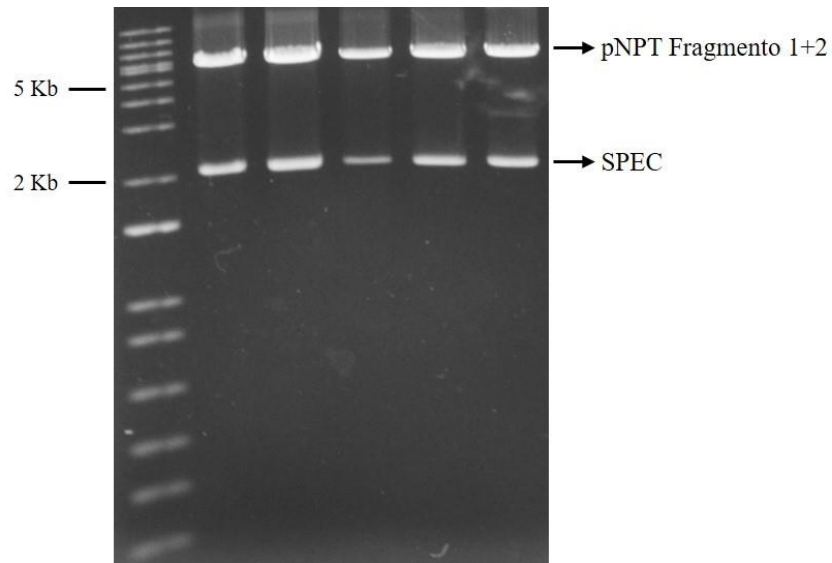
**Figura 17 – Verificação das linhagens com o gene *CCNA\_00028* possivelmente deletado pela metodologia de Southern blotting. (1) Esquema representativo das regiões utilizadas para a construção das sondas empregadas na técnica de Southern Blotting. O quadro em verde corresponde a localização do gene no cromossomo, as setas indicam o sítio de clivagem das enzimas de restrição utilizadas. (2) (A) Gel de 1,5% agarose resultante da eletroforese a 80V durante 2 horas mostrando a digestões realizadas overnight das linhagens mutantes e da linhagem selvagem. (B) Membrana de nitrocelulose + do Southern blotting do gene *CCNA\_00028* mostrando as bandas após a hibridização com a sonda específica e detecção. Legenda: (1/WT) NA1000; (2/ $\Delta$ )  $\Delta$ 0028-02; (3/ $\Delta$ )  $\Delta$ 0028-06; (4/ $\Delta$ )  $\Delta$ 0028-45; (5/ $\Delta$ )  $\Delta$ 0028-53; (6/ $\Delta$ )  $\Delta$ 0028-54; (7/ $\Delta$ )  $\Delta$ 0028-65.**

Por fim, para o gene CCNA\_03023 foi testado com o método já utilizado para os dois genes anteriores, e neste caso a enzima de restrição escolhida foi a BamHI que produziria fragmentos de tamanhos de aproximadamente 4,8 Kb na linhagem selvagem NA1000, e 2,5 Kb nas linhagens mutantes (dados não apresentados). Entretanto, a compreensão deste resultado foi prejudicada, devido a arrastes apresentados na membrana de nitrocelulose, durante a revelação pelo método. Já o gene para o transportador *hutA* foi o primeiro TBDT a ser deletado, confirmado por PCR e por análises das proteínas de membrana externa (Balhesteros et al., 2017).

Para a confirmação das linhagens mutantes para os genes que codificam as duas proteínas TonBs, optamos por partir de uma PCR de colônia. Inicialmente efetuamos a varredura para identificar linhagens que poderiam apresentar a ausência de *tonB1*, porém não obtivemos o resultado esperado. As colônias que não cresceram em PYE+Kan, indicando que teriam perdido o plasmídeo pNPTS138, foram testadas como possíveis linhagens mutantes, mas todas eram colônias que tiveram seu genótipo revertido para a linhagem selvagem.

Foram testadas aproximadamente 300 colônias, onde esperávamos o tamanho de 1,3 Kb para as linhagens mutantes, mas todas apresentaram o tamanho do fragmento da linhagem selvagem de 2 Kb. Pressupomos que a difícil deleção do gene codificando a proteína TonB1 possa estar relacionada ao fato de que o gene CCNA\_02419 foi descrito como um gene de *high fitness* (CHRISTEN et al., 2011), e assim a perda desse gene para a célula não seria vantajoso, ocasionando fenótipos graves e até ocorrer a morte da célula após a deleção do gene.

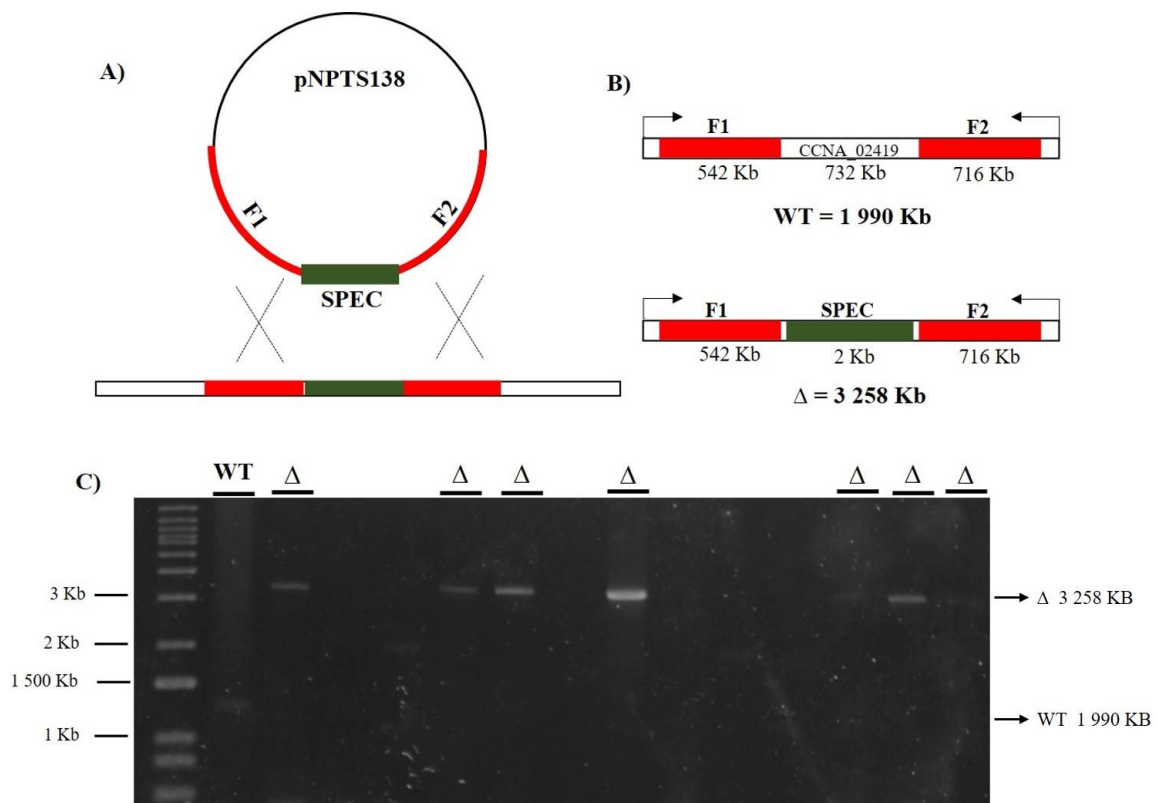
Assim, utilizamos como estratégia adicionar ao pNPTS138, que já continha os dois fragmentos *upstream* e *downstream* clonados no plasmídeo, mais uma marca de resistência. Um cassete de 2 Kb conferindo resistência ao antibiótico espectinomicina (Spec) foi inserido entre as regiões flanqueadoras do gene (Ver 3.8). Podemos adotar esta nova estratégia pois o gene CCNA\_02419 é o último gene de seu operon (Figura 5), o que não afetaria a transcrição dos demais genes do operon. A adição do cassete de resistência ao plasmídeo é demonstrada na figura 18.



**Figura 18 – Confirmação da adição da marca de resistência ao vetor recombinante.** Eletroforese da digestão do plasmídeo pNPTS138 contendo o cassete de espectinomicina entre as regiões flanqueadoras do gene CCNA\_02419. Visualização em gel de agarose 1%

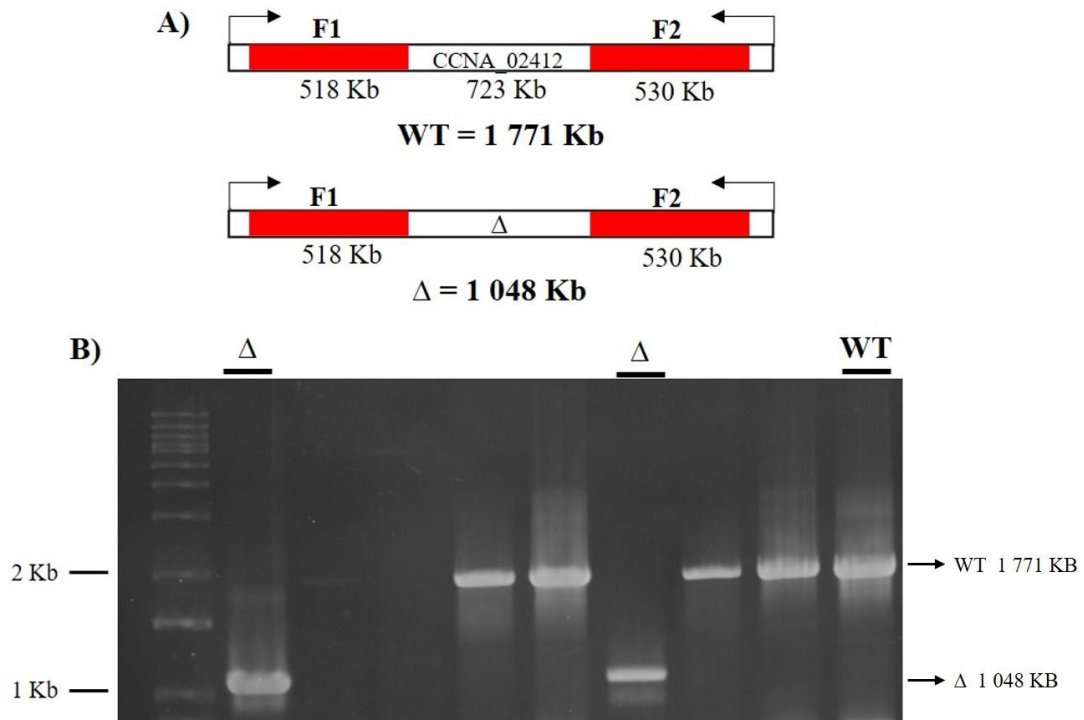
Posteriormente à adição da marca de resistência, passamos a selecionar colônias que após o crescimento foram Kan<sup>S</sup> e Spec<sup>R</sup>. Após a seleção de algumas colônias, realizamos uma reação de PCR com os primers 1 e 4 conforme já descrito anteriormente, e com isto conseguimos a linhagem mutante para *ΔtonB1* (Figura 19).





**Figura 19 – Representação e confirmação da deleção do gene CCNA\_02419 por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).** (A) Representação do evento da recombinação homóloga, com o plasmídeo pNPTS138 contendo as regiões flanqueadoras (vermelho) do gene CCNA\_02419 e o cassete de resistência a espectinomicina (verde). E logo após ocorrer a recombinação, demonstrando a disposição no cromossomo da bactéria; (B) Representação dos tamanhos das linhagens (WT) e ( $\Delta$ ); (C) Eletroforese dos produtos de PCR a partir do DNA cromossômico da cepa selvagem (WT) e dos mutantes ( $\Delta$ ). Visualização em gel de agarose 1%.

O gene codificador da proteína *tonB2* (CCNA\_02412) de *C. crescentus* não aparece na literatura descrito como sendo um gene essencial ou *high fitness* (CHRISTEN et al., 2011). Deste modo, a varredura para a linhagem mutante foi mais simples, e realizamos uma reação de cadeia da polimerase (PCR) também com os primers 1 e 4 (Figura 20).

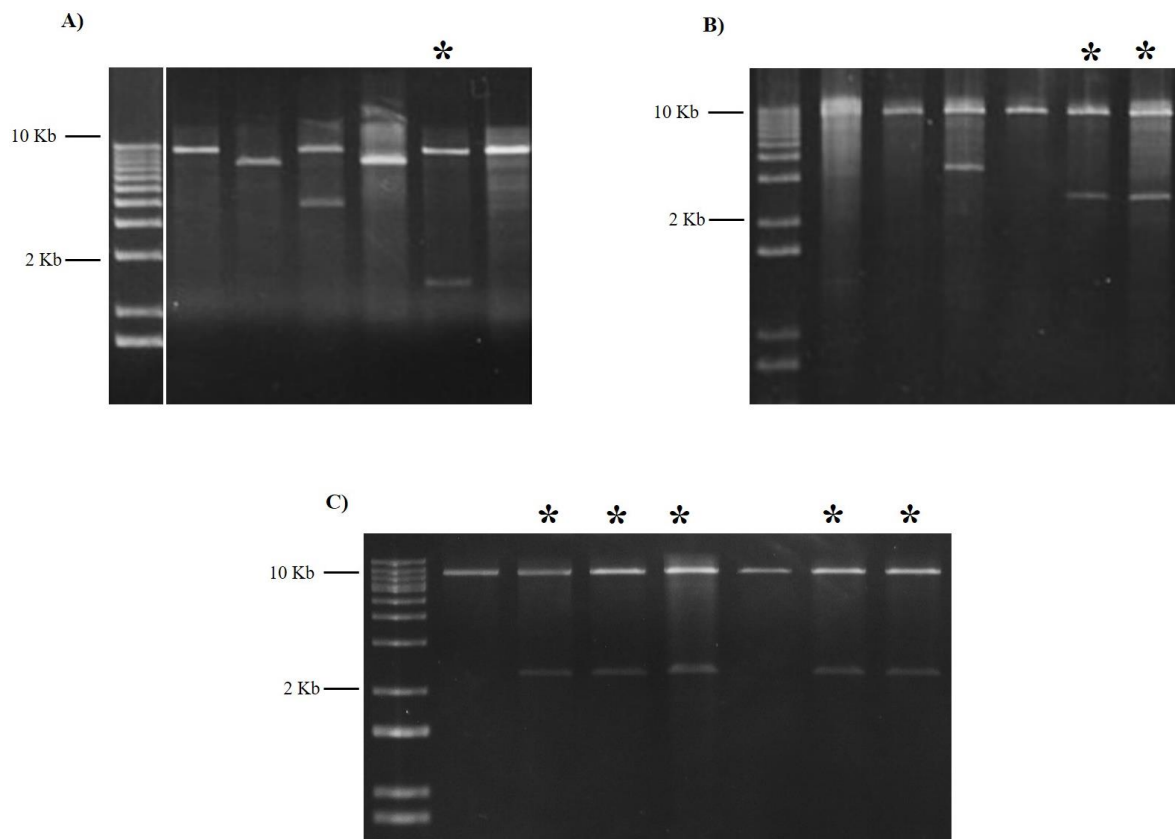


**Figura 20 – Representação e confirmação da deleção do gene CCNA\_02412 por Reação de Cadeia da Polimerase (PCR).** (A) Representação dos tamanhos das linhagens (WT) e ( $\Delta$ ); (B) Comprovação da banda obtida após a realização do PCR da cepa selvagem (WT) e dos mutantes ( $\Delta$ ). Visualização em gel de agarose 1%.

Desta forma, conseguimos obter todas as linhagens mutantes construídas para componentes do sistema TonB-ExbB-ExbD em *C. crescentus*, e estas linhagens foram analisadas quanto aos seus fenótipos de utilização de compostos de ferro.

#### **4.3.2 - Complementação das linhagens com os genes que codificam os transportadores dependentes de TonB deletados**

Logo após termos a construção das linhagens mutantes, efetuamos a sua complementação, pois para confirmação dos fenótipos observados na ausência desses genes, a avaliação das linhagens com os respectivos genes complementados por uma cópia em plasmídeo se faz necessária. Os genes CCNA\_00028, CCNA\_03023 e *hutA* foram amplificados com primers específicos (Tabela 5) que incluíam a região promotora de cada gene, e o produto da amplificação foi clonado no vetor de clonagem não integrativo pMR20 (Figura 21).



**Figura 21 – Confirmação por digestão da clonagem para complementação no vetor pMR20.** O símbolo (\*) sinaliza os positivos em todos os genes. (A) Complementação do gene *hutA*; (B) Complementação do gene *CCNA\_00028*; (C) Complementação do gene *CCNA\_03023*. Visualização em gel de agarose 1%.

Para a complementação é necessário que o gene a ser clonado esteja presente com o seu promotor, porque assim a transcrição do gene após a inserção em *Caulobacter* será realizada por seu promotor e não o do plasmídeo. Os respectivos clones positivos obtidos foram sequenciados a fim de verificar a ausência de eventuais erros em suas sequências, e os plasmídeos foram inseridos por conjugação na linhagem NA1000, para em seguida realizarmos experimentos para a confirmação da restauração do fenótipo. Com relação ao mutante  $\Delta$ CCNA\_00138 ainda não realizamos a complementação, pois o mesmo foi analisado por nossos colaboradores em testes de utilização de sideróforos, não apresentando nenhum fenótipo para os sideróforos testados, e desta maneira adiamos a análise deste mutante complementado.

#### 4.4 – Análises fenotípicas das linhagens mutantes

Com o intuito de caracterizar o transporte de ferro e obter o conhecimento de qual fonte de ferro é utilizada por *C. crescentus* em seu ambiente, submetemos as linhagens mutantes em variados testes com a presença de diferentes íons de ferro, para avaliação dos fenótipos. Os resultados sobre a linhagem deletada *hutA* foram descritos em publicação científica (Balhesteros et al., 2017), e não serão abordados neste documento.

##### 4.4.1 – Crescimento das linhagens mutantes para os TBDTs em diferentes fontes de Ferro

As linhagens mutantes dos TBDTs ( $\Delta 00138$ ;  $\Delta 00028$  e  $\Delta 03023$ ) e a linhagem selvagem NA1000 foram submetidas a uma curva de crescimento em meio mínimo M2, já que este meio permite alterar a composição da fonte de ferro utilizada. Testamos em cada linhagem diferentes fontes de ferro:  $\text{FeSO}_4$  100  $\mu\text{M}$ , Citrato férrico 100  $\mu\text{M}$  e  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ .

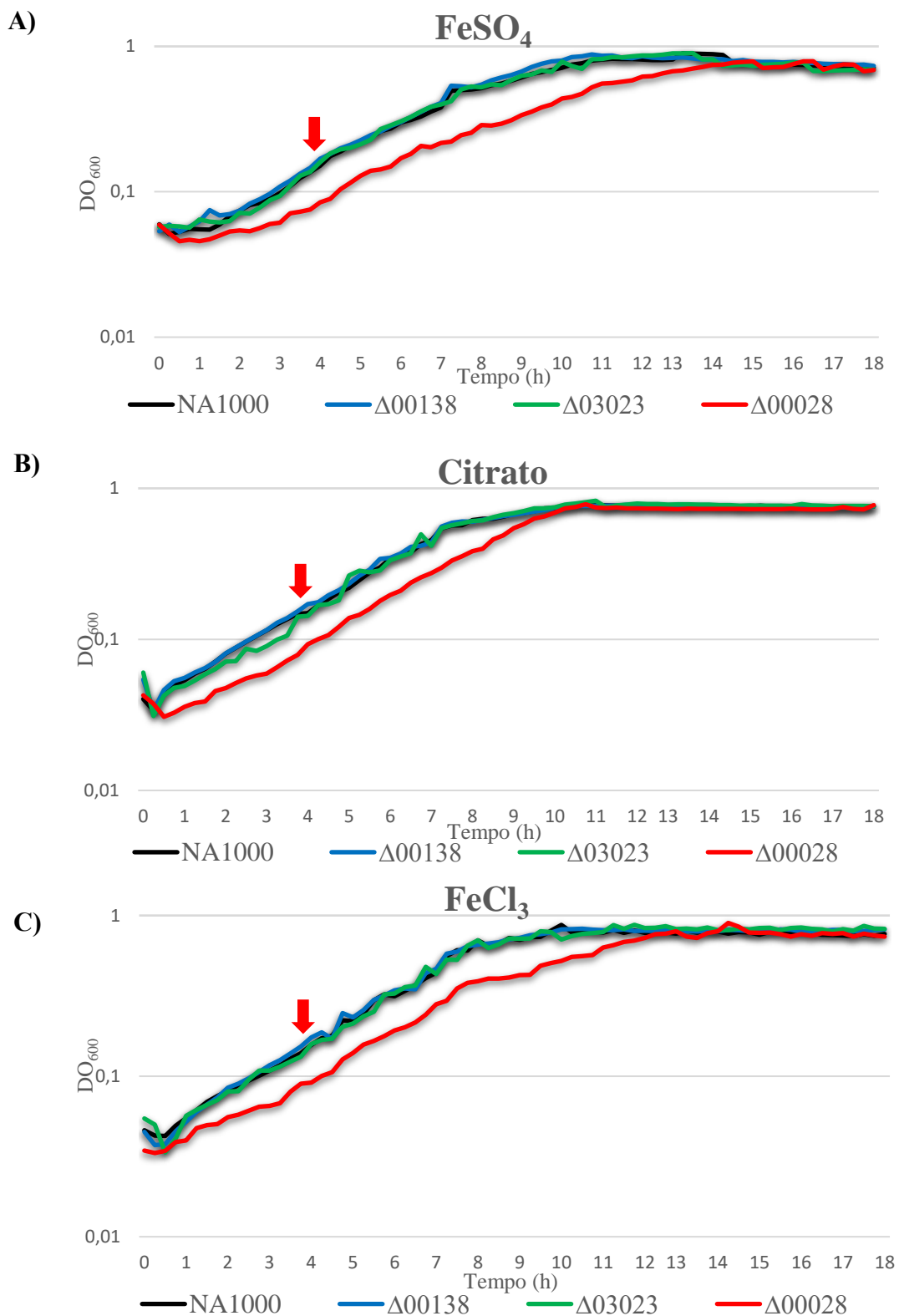
A princípio testes preliminares foram realizados, para a padronização das condições do experimento de crescimento. Como resultado deste experimento de padronização observamos que na presença de citrato e cloreto férrico, as linhagens  $\Delta 000138$  e  $\Delta 03023$  não apresentaram uma aparente diferença quando comparamos com a linhagem parental NA1000, indicando que provavelmente esses transportadores não realizam o transporte destas fontes de ferro. Porém a linhagem  $\Delta 00028$  apresentou um crescimento menor em comparação a linhagem NA1000 (dados não mostrados). Deve-se ressaltar que os transportadores dependentes de TonB realizam o transporte do ferro na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e o transporte de ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), como no caso do  $\text{FeSO}_4$ , é realizado por outros sistemas de proteínas (FeoAB) e por um sistema passivo não dependente de TonB. Como a forma ferrosa é muito instável na presença de oxigênio, não se pode excluir a possibilidade de que o  $\text{FeSO}_4$  utilizado se encontre oxidado e possua a presença de  $\text{Fe}^{3+}$ . Entretanto, o que se observa é que a linhagem mutante consegue crescer e alcançar os mesmos níveis de DO que a selvagem, apenas apresentando uma grande fase *lag* (dados não mostrados).

Por causa dos resultados intrigantes observados pela linhagem  $\Delta 00028$ , optamos por realizar alterações em nossos experimentos de crescimento. Desta forma, incubamos as linhagens em meio M2 sem  $\text{FeSO}_4$  por quatro horas a 30°C. O tempo do crescimento de quatro horas foi determinado através de trabalhos do nosso grupo de pesquisa, que demonstram que os

genes que são induzidos em carência de ferro e regulados por Fur neste meio levam em torno de quatro horas para a voltar a serem expressos (Leaden et al, 2018). Depois do crescimento sem ferro por quatro horas, foram adicionadas as mesmas fontes de ferro já determinadas anteriormente. Com a nova alteração alcançamos os seguintes resultados que pode ser observado nas Figura 22. Aplicamos a alteração de quatro horas de crescimento sem ferro, pois esperávamos que neste tempo a bactéria fosse capaz de perceber a ausência de ferro no meio, e desta maneira apresentar ou não algum fenótipo. Entretanto, nas curvas de crescimento, vimos que mesmo nas quatro horas sem ferro todas as linhagens conseguem crescer, isto ocorre porque a bactéria utiliza o ferro que ainda está presente no seu interior para se duplicar. Quando voltamos o ferro no meio (indicado pela seta vermelha nas curvas) independente da fonte, as linhagens continuaram seu crescimento sem alterações, passando por todas as etapas do crescimento microbiano, indicando que não foi possível alcançar a carência de ferro desejada.

Os dados apresentados mostram que apenas a linhagem  $\Delta 00028$  apresentou um crescimento diferente, mas o crescimento da linhagem não foi mais lento, sendo a diferença na fase *lag*. Acreditamos que isto possa estar relacionado com a demora para perceber a volta da presença do ferro, quando comparado o crescimento da linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000 e as linhagens mutantes  $\Delta 00138$  e  $\Delta 03023$ . A maior fase *lag* de crescimento da linhagem  $\Delta 00028$  ocorreu na presença não somente de  $\text{FeSO}_4$ , mas também nas demais fonte de ferro utilizadas. Entretanto, aparentemente as taxas de crescimento são similares, não demonstrando deficiência na utilização das fontes de ferro testadas.

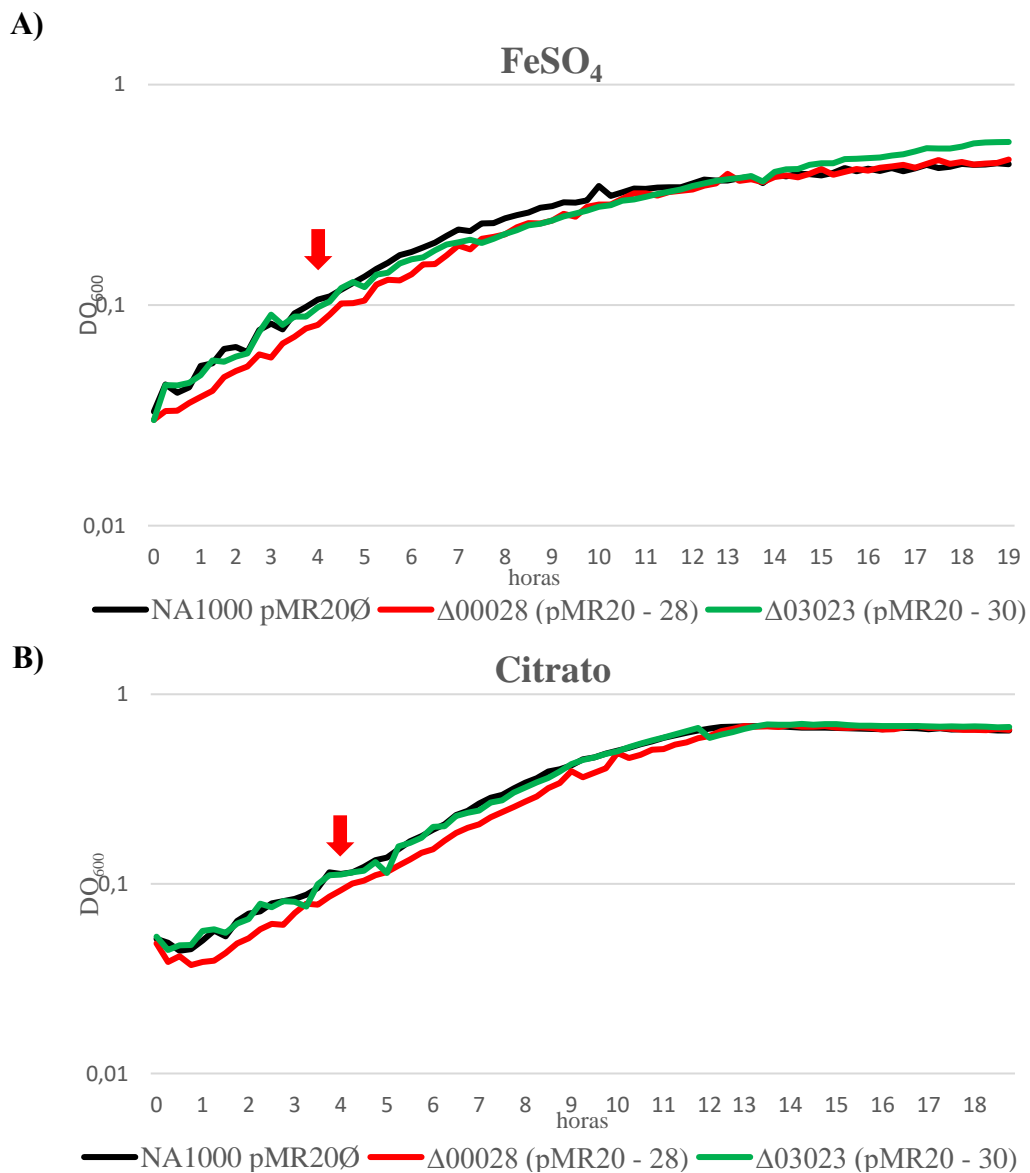
Assim, decidimos utilizar a linhagem  $\Delta 00028$  em ensaios de viabilidade em diferentes fontes de ferro. Também as linhagens serão avaliadas por nossos colaboradores Prof<sup>o</sup> Philip Klebba e Prof<sup>a</sup> Salete Newton da Universidade Kansas, USA onde irão testar a linhagem utilizando uma biblioteca de sideróforos, que ajudará a explicar este fenótipo de crescimento.

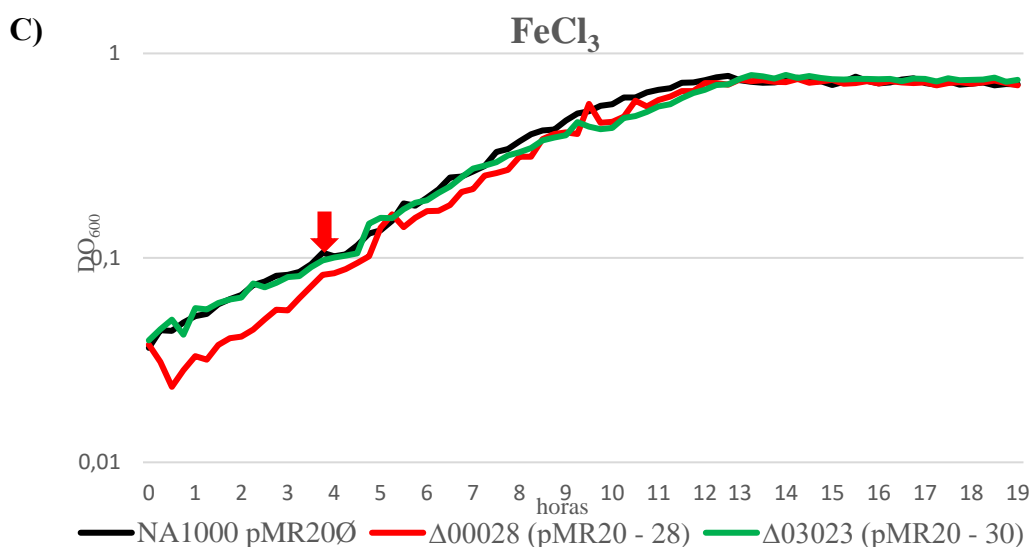


**Figura 22 – Curvas de crescimento das linhagens selvagem NA1000 e mutantes ( $\Delta 00138$ ,  $\Delta 03023$  e  $\Delta 00028$ ) em diferentes fontes de ferro.** A seta vermelha em todos os gráficos indica o momento que foi adicionado as fontes de ferro após 4 horas de carência de ferro (A) Meio M2 com FeSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M; (B) Meio M2 com citrato férrico 100  $\mu$ M; (C) Meio M2 com FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M. Todas as curvas foram feitas em duplicata. A figura mostra o experimento realizado pelo aparelho SpectraMax Paradigm.

#### 4.4.2 - Crescimento das linhagens complementadas dos TBDT de *C. crescentus*

Para analisar a restauração do fenótipo nas linhagens complementadas, as linhagens NA1000,  $\Delta 00028$ ,  $\Delta 03023$  e  $\Delta hutA$  contendo o plasmídeo pMR20 foram incubadas em meio M2 com a presença do antibiótico tetraciclina devido a marca de resistência do plasmídeo pMR20 que está presente em todas as linhagens. O crescimento foi medido conforme as curvas realizadas anteriormente, onde após a diluição para a  $DO_{600}$  0,1 em M2 sem ferro por quatro horas foram em seguida adicionadas as fontes de ferro, as mesmas utilizadas nas curvas anteriores. O resultado pode ser visto na figura 23.





**Figura 23 – Curvas de crescimento das linhagens selvagem NA1000 e linhagens complementadas dos mutantes ( $\Delta 00028$  e  $\Delta 03023$ ) em diferentes fontes de ferro.** A seta vermelha em todos os gráficos indica o momento que foi adicionado as fontes de ferro após 4 horas de carência de ferro (A) Meio M2 com  $\text{FeSO}_4$  100  $\mu\text{M}$ ; (B) Meio M2 com citrato férrico 100  $\mu\text{M}$ ; (C) Meio M2 com  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu\text{M}$ . A figura mostra o experimento realizado pelo aparelho SpectraMax Paradigm

O resultado das curvas de crescimento confirma a clonagem das linhagens mutantes para a complementação no plasmídeo pMR20. Indicando que  $\Delta 03023$  apresenta um crescimento semelhante a linhagem selvagem NA100, pois o mesmo também não apresentou um fenótipo diferente que a selvagem nas curvas anteriores. Já  $\Delta 00028$  novamente apresenta um fenótipo diferente que é o atraso na fase *lag* de crescimento

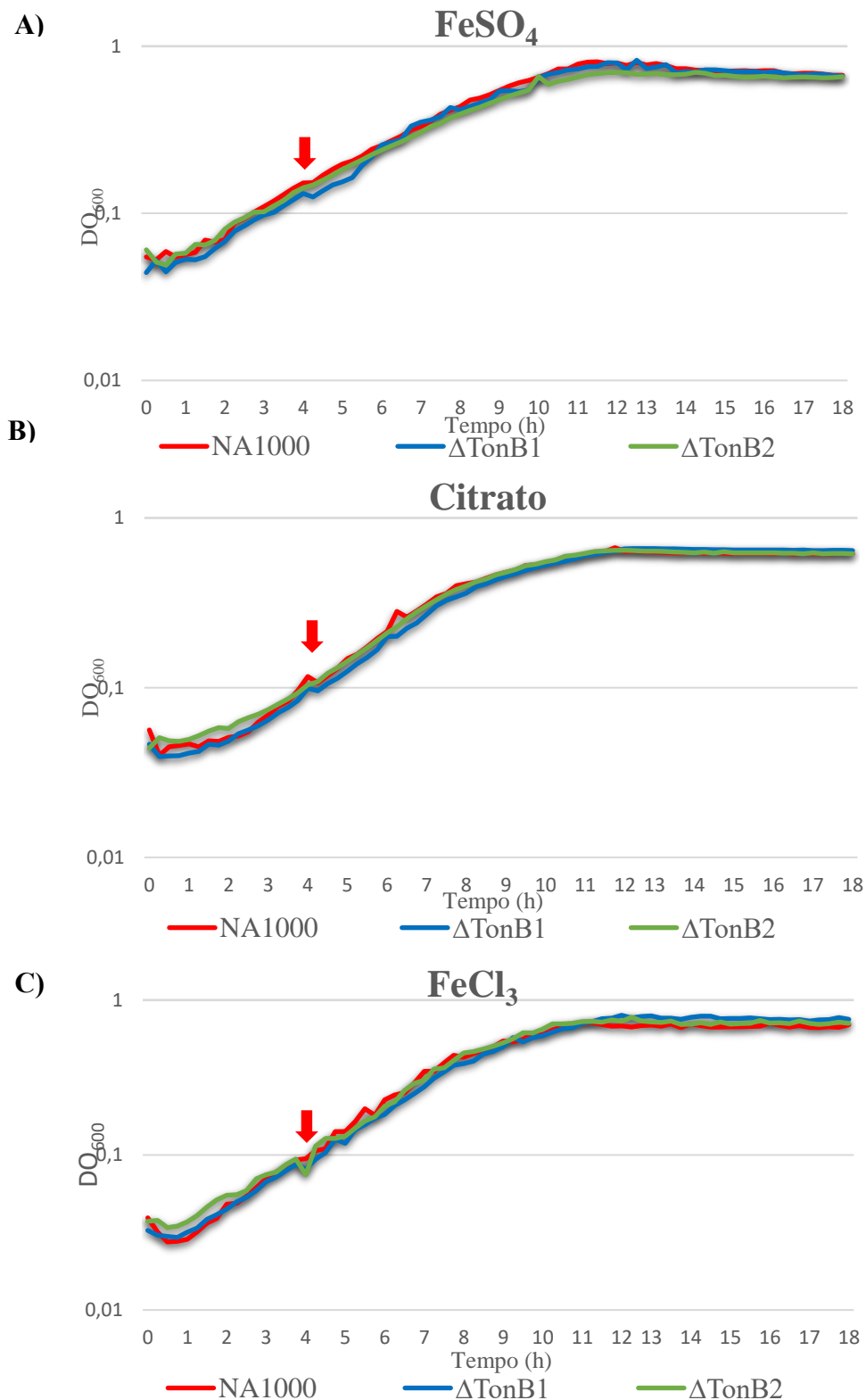
#### 4.4.3 – Crescimento das linhagens mutantes para as proteínas TonB

Sabe-se que muitas bactérias apresentam mais de uma proteína TonB, e que podem estar relacionadas ao transporte de ferro, vitaminas ou de algum outro nutriente que seja importado pelo sistema TonB-ExbB-ExbD. A maioria destas bactérias é classificada como patogênicas, e dentre elas estão: *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Riemerella anatipestife* (CORNELIS; DINGEMANS, 2013; DONG et al., 2016; KUEHL; CROSA, 2010; MIAO et al., 2015; SVERZHINSKY et al., 2015). Já foi descrito na literatura bactérias que possuem 3 proteínas TonBs, que é o caso de *Aeromonas shydrophila*, em que os genes de todas as três estão localizados no mesmo operon com as



proteínas ExbB-ExbD (DONG et al., 2016), diferente de *C. crescentus* (CHRISTEN et al., 2011).

Em todas as bactérias patogênicas citadas e que possuem mais de uma proteína TonB, verificou-se com a deleção de um ou mais genes *tonB*, que a falta dessas proteínas ocasiona um alto prejuízo à célula, relacionado na maioria das vezes com a virulência da bactéria. Outras bactérias não patogênicas como *C. crescentus*, também apresentam a presença de mais de um gene *tonB*, assim como em *Rhizobium leguminosarum*. Nesta bactéria a proteína TonB2 é necessária para a aquisição de heme e outros sideróforos (WEXLER et al., 2001). Em *C. crescentus* até o momento sabe-se que a proteína TonB2 está envolvida com o transporte de maltose (LOHMILLER et al., 2008), porém ainda nada se tem correlacionando o transporte de ferro com as proteínas TonBs. Para tal, a mesma abordagem para o experimento de crescimento dos TBDTs foi aplicada novamente, onde todas as linhagens (NA1000,  $\Delta tonB1$ ,  $\Delta tonB2$ ) foram incubadas em meio M2 líquido sem ferro, e posteriormente foram adicionadas diferentes fontes de ferro, e para que assim possamos investigar a especificidade das proteínas TonBs. O resultado do crescimento está mostrado na Figura 24.



**Figura 24 – Curva de crescimento das linhagens selvagem NA1000 e mutantes ( $\Delta$ TonB1 e  $\Delta$ TonB2) em diferentes fontes de ferro.** A seta vermelha em todos os gráficos indica o momento que foi adicionado as fontes de ferro (A) Meio M2 com FeSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M; (B) Meio M2 com citrato 100  $\mu$ M; (C) Meio M2 com FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M. Todas as curvas foram feitas em duplicata. A figura mostra o experimento realizado pelo aparelho SpectraMax Paradigm.

Observamos pelas curvas de crescimento que os mutantes  $\Delta tonB1$  e  $\Delta tonB2$  não apresentaram nenhuma diferença, com um crescimento semelhante ao da linhagem selvagem NA1000, o que nos leva a concluir que o transporte de ferro nas formas  $FeSO_4$ , Citrato férrico e  $FeCl_3$  em *C. crescentus* não é afetado quando um dos TonBs não se encontram presentes no cromossomo. Em bactérias patogênicas, onde realizaram a deleção do gene que codifica a proteína TonB, notou-se mal crescimento em meio normal e deformidades na morfologia, mas a grande maioria dos efeitos da deleção sempre está relacionado com a virulência desses patógenos, conseqüentemente essas bactérias não conseguiram mais infectar seu hospedeiro (CHIMENTO; KADNER; WIENER, 2005a; DONG et al., 2016; JEONG et al., 2012; LOCHER et al., 1998).

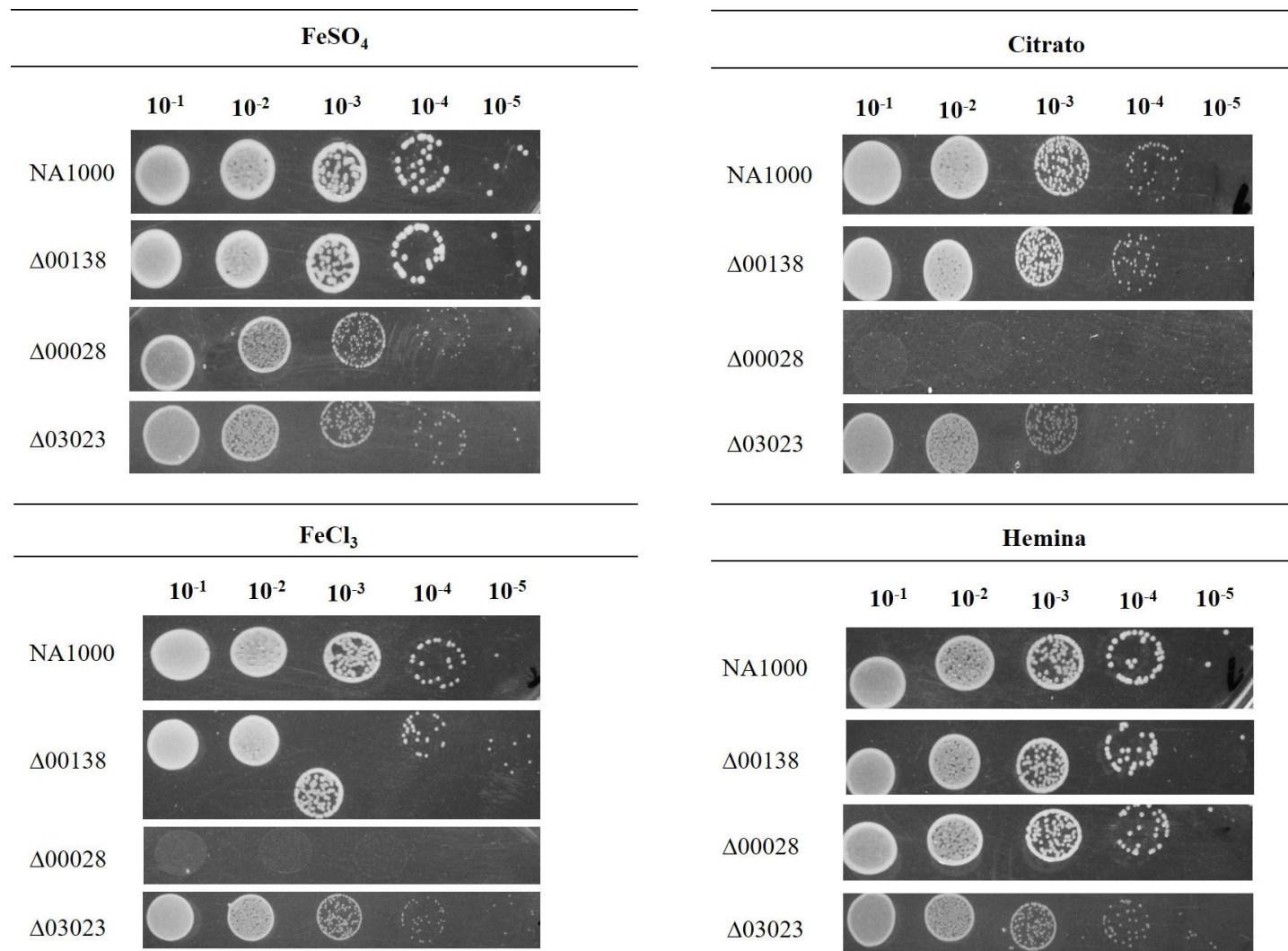
Como as deleções de cada TonB são de forma independente, acreditamos que não houve diferença de crescimento pois a outra proteína TonB consegue suprir a falta e permitir que ocorra o transporte normalmente pelo sistema. Os dados indicam, portanto, que as funções de cada proteína TonB possam ser redundantes. Em *Burkholderia cenocepacia* foi verificado que a ausência da proteína TonB pode gerar morte celular e que apenas a deleção do domínio periplasmático da proteína TonB seria necessário para a observação de um possível fenótipo, evitando assim a morte celular (PRADENAS; MYERS; TORRES, 2017).

Deste modo, acreditamos que seria necessário a construção de uma linhagem que apresente a deleção simultânea dos dois genes. Entretanto, como *C. crescentus* possui 62 transportadores dependentes de TonB, e depende fortemente deste tipo de transporte para sua sobrevivência, essa estratégia seria talvez impossível, já que não existem informações sobre quais nutrientes transportam, sendo um organismo que se encontra em um habitat oligotrófico. Uma análise mais detalhada dos fenótipos destes mutantes será mostrada no item 4.4.4.

#### **4.4.4 - Ensaio de viabilidade**

Como foi visto anteriormente, no experimento de crescimento mostrou-se que a linhagem  $\Delta 00028$  apresentou uma fase *lag* de crescimento maior quando comparada a NA1000, porém após algumas horas de crescimento o mesmo consegue alcançar a linhagem selvagem. Segundo SILVA NETO; LOURENÇO; MARQUES (2013), o gene CCNA\_00028 foi o TBBDT que apresentou o maior aumento na sua expressão em carência de ferro. Diante disso, realizamos ensaios de viabilidade das quatro linhagens  $\Delta TBBDT$  de *C. crescentus* em placas contendo meio M2 sólido com as mesmas fontes de ferro utilizadas nas curvas de crescimento.

Estabelecemos “lavar” as culturas com o meio M2 sem  $\text{FeSO}_4$  antes de realizarmos a diluição das mesmas para a DO 0,1 esta abordagem foi estabelecida para tentar evitar resquícios do meio que continha a presença de  $\text{FeSO}_4$ , e desta forma, definir que a única fonte de ferro presente no crescimento irá ser a que estará presente na placa de M2 sólido. Foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) das culturas e aplicado 10  $\mu\text{l}$  de cada diluição nas placas. Após dois dias de crescimento a  $30^\circ\text{C}$  foi observado os seguintes crescimentos em placa (Figura 25).

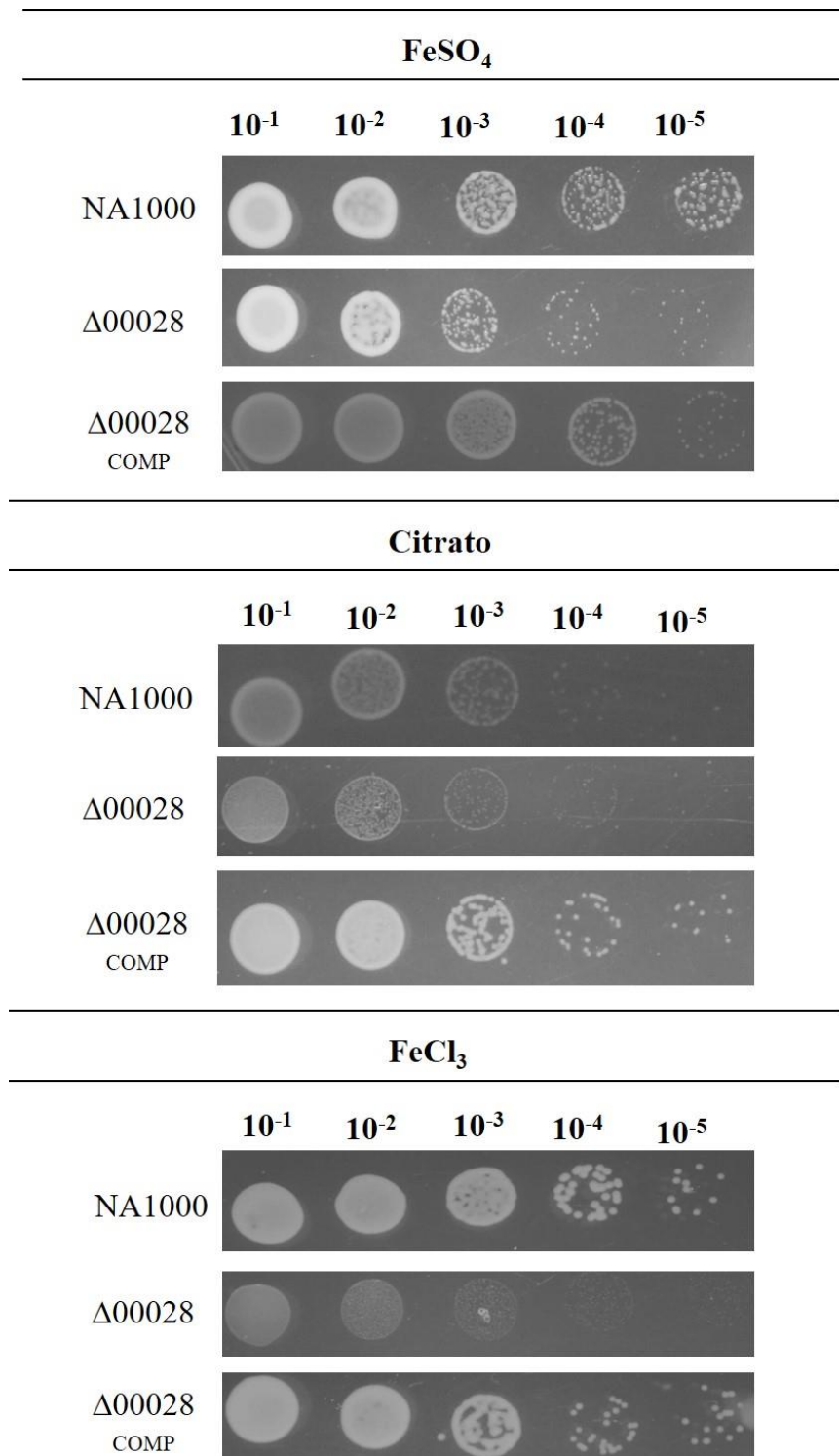


**Figura 25 – Ensaio de viabilidade das linhagens mutantes Δ00138, Δ00028 e Δ03023 na presença de diversas fontes de ferro. As placas foram mantidas a 30°C por dois dias. Os ensaios de viabilidade foram feitos em duplicata.**

Assim como observado nas curvas de crescimento, as linhagens mutantes  $\Delta 00138$  e  $\Delta 03023$  não apresentaram um fenótipo diferente da linhagem selvagem NA1000. Deste modo, o transporte das fontes de ferro testadas não foi afetado pela a deleção destes receptores dependentes de TonB.

Porém, com relação a linhagem  $\Delta 00028$  é possível observar que somente na presença de Hemina a linhagem obteve um crescimento igual a NA1000, o que tem coerência pois como sabemos o transporte de Hemina em *C. crescentus* é realizado pelo transportador HutA (CCNA\_02277) (BALHESTEROS et al., 2017), podendo a Hemina ser considera um controle positivo para o experimento.

Outro controle positivo para o experimento é o  $\text{FeSO}_4$ , afinal o sulfato ferroso contém  $\text{Fe}^{2+}$  e seu transporte não é realizado pelo sistema TonB-ExbB-ExbD, porém como é possível observar na Figura 29 até mesmo em  $\text{FeSO}_4$ , a linhagem  $\Delta 00028$  nas ultimas diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  apresenta um crescimento menor com relação a NA1000. A partir destes resultados, realizamos o ensaio de viabilidade com a linhagem  $\Delta 00028$  complementada (Figura 26).



**Figura 26 – Ensaio de viabilidade com as linhagens mutante Δ00028, complementada (Δ00028Comp) e selvagem NA1000.** As placas foram mantidas a 30°C por dois dias. Todos os ensaios de viabilidade foram realizados em duplicata.

Com o novo ensaio de viabilidade é visto que no caso de citrato e cloreto férrico, novamente o mutante  $\Delta 00028$ , apresentou um crescimento menor em quantidade de colônias com relação a NA1000 (mesmo quando as placas ficaram mais tempo incubadas não vemos o crescimento de novas colônias), e em todas as fontes de ferro testadas a linhagem complementada ( $\Delta 00028$ Comp) apresentou um fenótipo restaurado. No caso de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) é possível observar que o mutante  $\Delta 00028$ , obteve o mesmo número de colônias que a linhagem selvagem, que de certa forma é justificável pois  $\text{FeSO}_4$  é a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a forma livre de ferro, e o transporte de ferro ferroso não é realizado pela secreção de sideróforos, mas sim através de outras proteínas que compõem o sistema FeoAB (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; LAU; KREWULAK; VOGEL, 2017).

O sideróforo Citrato férrico é um ácido orgânico com afinidade por ferro suficiente para permitir a formação de um complexo com o íon de ferro, e assim haver o transporte deste metal. A complexação de citrato com o ferro gera um complexo pequeno quando o mesmo está ligado a íons de ferro quando comparados a complexos grandes, por exemplo ferro ligado a proteína transferrina, assim como sua composição química mais simples e a afinidade de ligação do ferro relativamente mais fraca em relação a outros sideróforos (CHU et al., 2010; YUE; GRIZOT; BUCHANAN, 2003). Em algumas bactérias já foi descrito o transporte de citrato por TBDTs, como FecA em *E. coli* (FERGUSON, 2002; OGIERMAN; BRAUN, 2003) e em outras bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Bordetella* e *Xanthomonas* (OGIERMAN; BRAUN, 2003).

O citrato é considerado um importante sideróforo para a aquisição de ferro bacteriano devido à sua abundância no meio ambiente (YUE; GRIZOT; BUCHANAN, 2003). Estudos com *E. coli* e *Pseudomonas* demonstram que quando o transportador de citrato férrico é deletado do genoma a célula passa por uma grande carência nutricional devido a falta do íon férrico (MARSHALL et al. 2009). A maioria das bactérias Gram-negativas que utilizam o citrato férrico como sideróforo são capazes de produzi-lo, (FERGUSON et al., 1998a; OGIERMAN; BRAUN, 2003; SAHA et al., 2013; YUE; GRIZOT; BUCHANAN, 2003) o que até o momento é desconhecido para *C. crescentus*, pois na linhagem selvagem NA1000 não foram identificados genes que codificam sideróforos, supondo-se que *C. crescentus* utilize apenas os sideróforos que serão encontrados no ambiente.

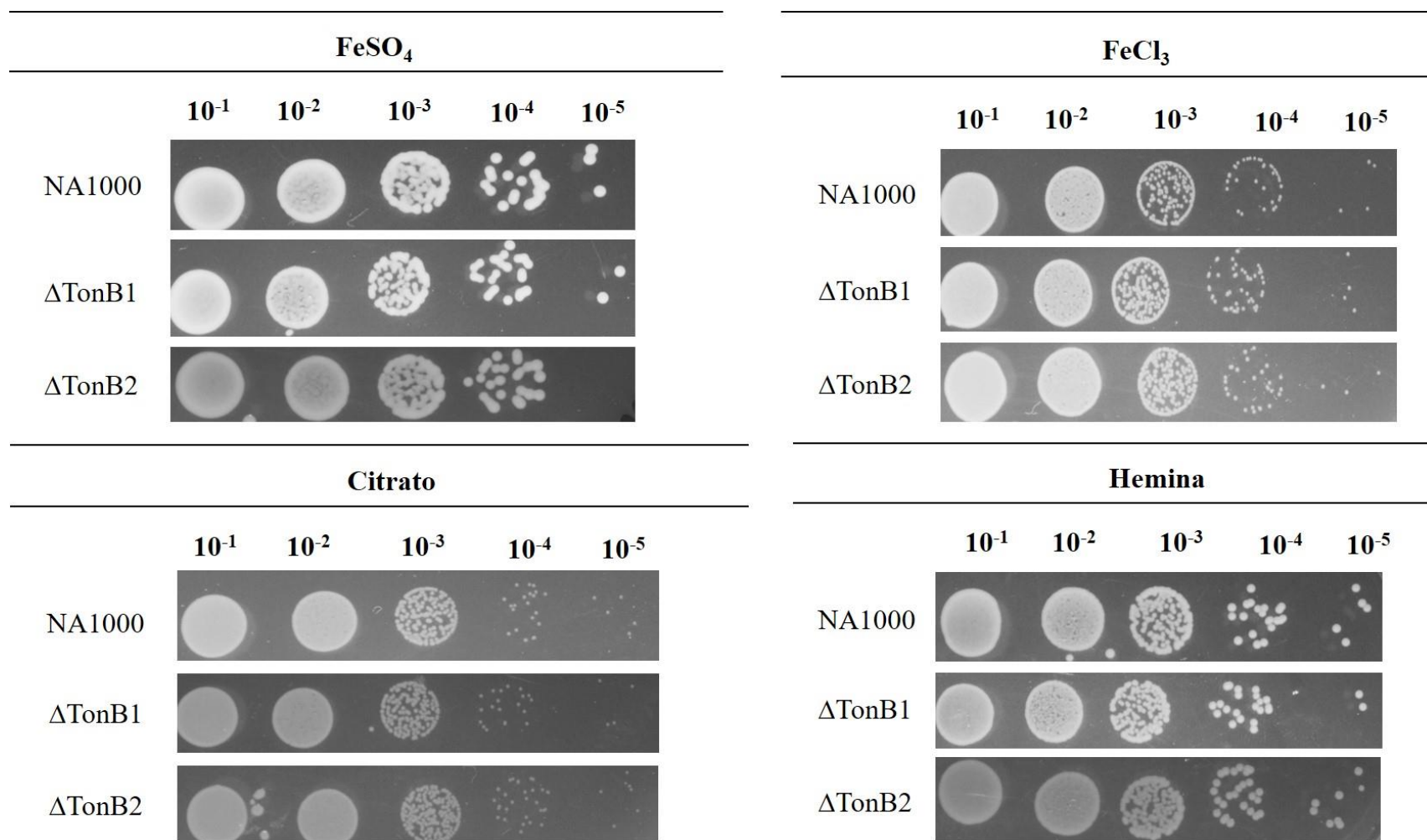
Devido ao crescimento ter sido afetado mediante duas fontes de ferro distintas, não podemos afirmar qual delas seria transportada pelo receptor CCNA\_00028. Por ser o receptor mais expresso no caso de carência de ferro, conseqüentemente pode haver mais receptores CCNA\_00028 presentes na membrana externa, e por isso seria o mais utilizado para o



transporte em grande escala. Com a deleção deste receptor, a membrana ficaria em um estado de escassez de transportadores e os outros que estariam sendo expressos normalmente não conseguiriam suprir todo o transporte de ferro. Isto poderia explicar os atrasos observados na fase *lag* durante o crescimento da linhagem  $\Delta 00028$ , já que com a falta deste receptor a célula levaria um tempo maior para conseguir perceber o aumento da presença de ferro no meio externo e com isso realizar a expressão de outros receptores para suprir este receptor. Entretanto, em geral existe uma especificidade para o transporte pelos TBDTs, e esta explicação não esclarece este aspecto.

Assim, ainda é necessária a realização de mais experimentos para a confirmação desta hipótese, bem como os ensaios de utilização e produção de sideróforos, a fim de verificar se *C. crescentus* realmente não os produz.

Do mesmo modo, realizamos ensaio de viabilidade com as linhagens deletadas para as proteínas TonBs (Figura 27). Os dados obtidos corroboram os resultados das curvas de crescimento. Novamente é visto que a deleção dos genes que codificam as proteínas TonBs não apresentaram nenhuma diferença no fenótipo. Em todas as diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) as linhagens mutantes apresentam um crescimento bem semelhante a NA1000.



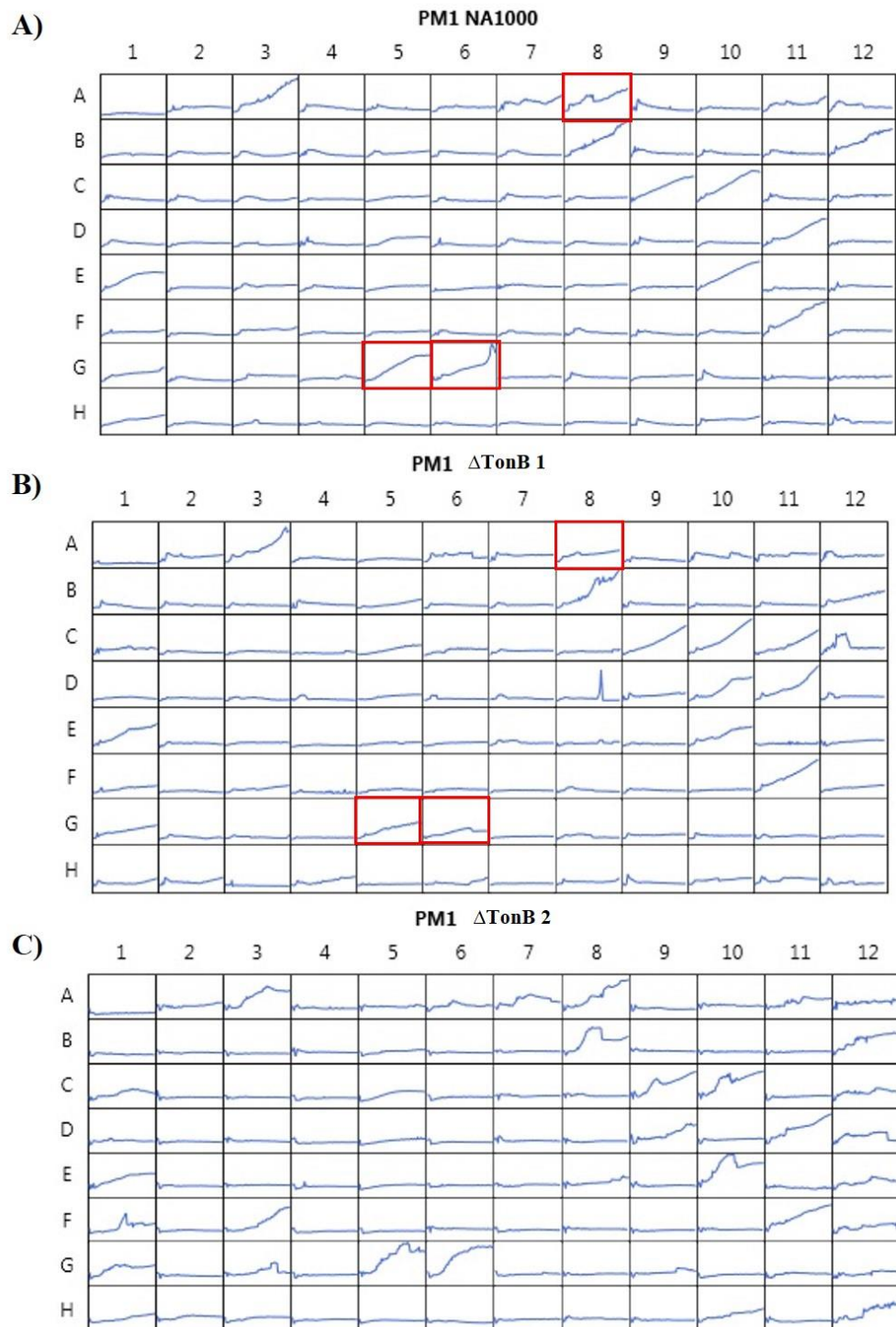
**Figura 27 – Ensaio de viabilidade com as linhagens mutantes  $\Delta$ TonB1 e  $\Delta$ TonB2.** As placas foram mantidas a 30°C por três dias. Todos os ensaios de viabilidade foram realizados em duplicata.

#### 4.4.5 - Análise das fontes de carbono utilizadas pelas linhagens mutantes para a proteína TonB

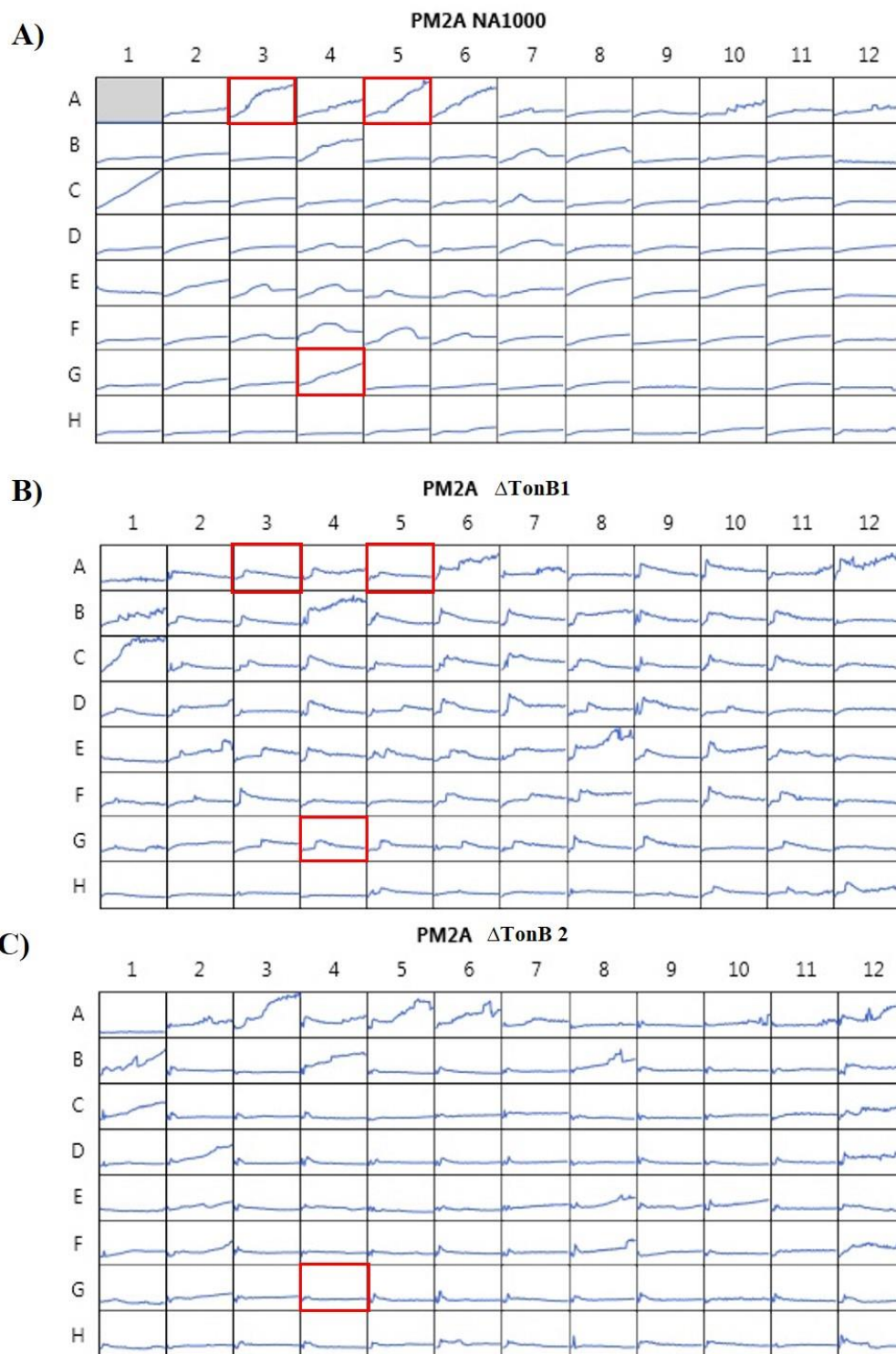
Espécies de bactérias que vivem em ambientes oligotróficos ou com uma alta carência nutricional, como água e solo, são particularmente ricos em receptores dependentes de TonB (ENDRISS et al., 2003), indicando que outros nutrientes além do ferro podem ser captados por sistemas ativo através da membrana. Já se sabe que em *C. crescentus* o transporte de maltose é realizado através do sistema TonB-ExbB-ExbD e que supostamente a proteína TonB1 é a que estaria interagindo com o transportador da maltose dependente de TonB (LOHMILLER et al., 2008). Decidimos realizar alguns testes de crescimento com as linhagens mutantes para *tonB* ( $\Delta 02419$  e  $\Delta 02412$ ) na presença de fontes de carbono. Para isso foram utilizadas microplacas (Biolog), que consistem em 96 poços contendo diferentes compostos (podendo ser carbônicos, nitrogenados, antibióticos, entre outros). O crescimento das culturas nestas placas é feito adicionando-se o meio mínimo sem fonte de carbono, e as culturas utilizam apenas a fonte de carbono fornecida em cada poço, comparando-se o perfil de crescimento dos mutantes  $\Delta tonB1$  e  $\Delta tonB2$  com o de NA1000.

As figuras 28 e 29 mostram uma representação gráfica do crescimento neste tipo de experimento, em que cada poço da placa possui uma curva de crescimento independente; dessa forma, é possível determinar de forma rápida a presença ou ausência de crescimento em uma determinada fonte de carbono após 24 horas de incubação.

Inicialmente testamos as linhagens mutantes na placa PM1 (Anexo M) a qual é composta na maioria por diferentes fontes de carbono, o crescimento da placa PM1 pode ser visto na figura 28. Posteriormente utilizamos a placa PM2A (Anexo N) que também é composta por fontes de carbono, mas apresenta uma grande quantidade de aminoácidos, o crescimento desta placa está na figura 29.



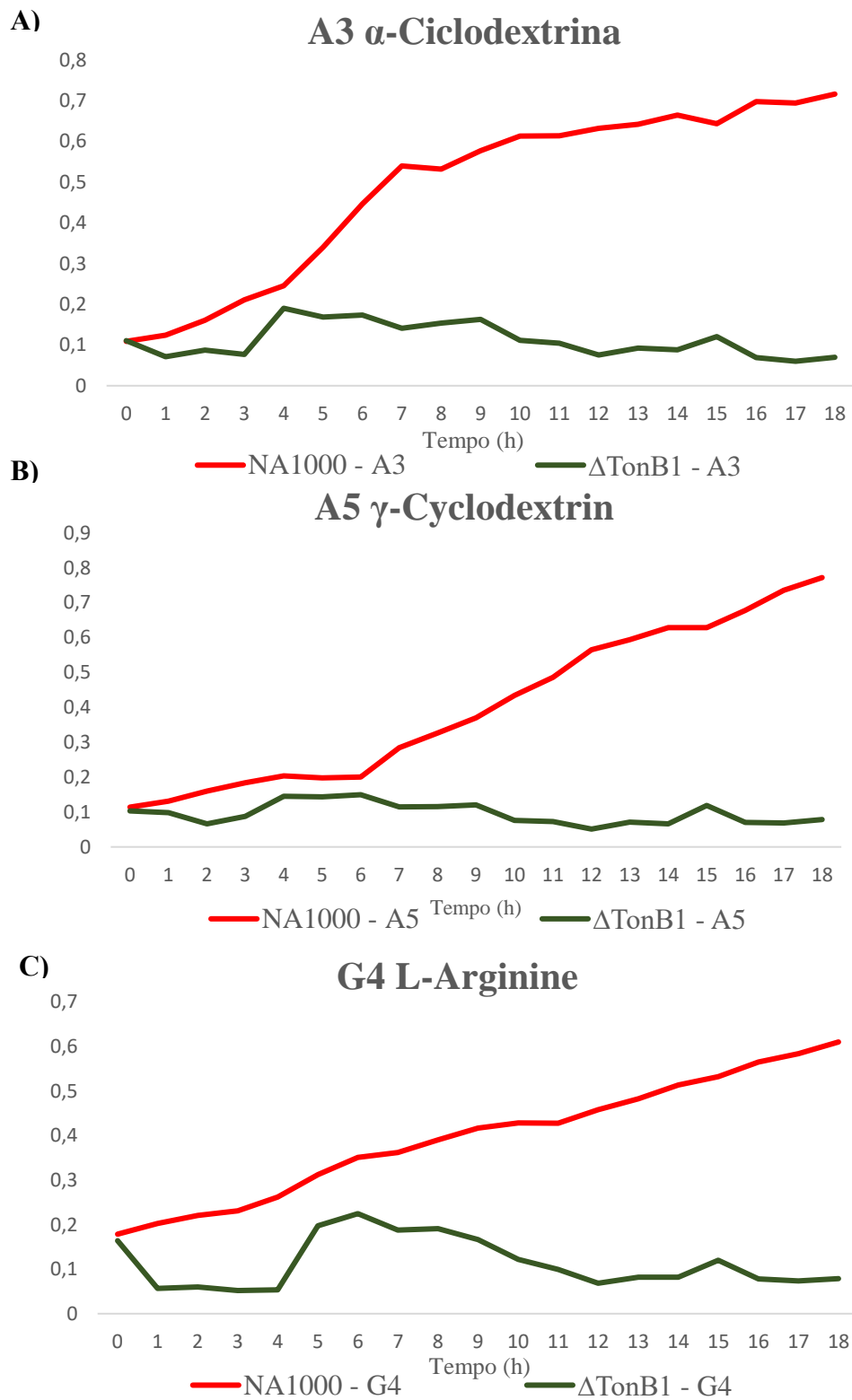
**Figura 28 – Representação esquemática do perfil de crescimento observado em microplacas PM1 Biolog.** As fontes de carbono presentes na placa são identificadas pelas coordenadas, e em cada uma delas pode ser observada a curva de crescimento correspondente obtida. Sendo que o poço A1 corresponde ao controle negativo (sem fonte de carbono e sem cultura). Mostrando em: (A) Experimento realizado com a linhagem selvagem NA1000. (B) Experimento realizado com a linhagem  $\Delta$ tonB 1. (C) Experimento realizado com a linhagem  $\Delta$ tonB2. As caixas vermelhas destacam os poços que aparentemente possuem diferença de crescimento entre as linhagens. As curvas de crescimento foram obtidas pela medida da absorbância a 600 nm a cada 15 minutos no sistema Paradigm (Molecular Devices).



**Figura 29 – Representação esquemática do perfil de crescimento observado em microplacas PM2A Biolog.** As fontes de carbono presentes na placa são identificadas pelas coordenadas, e em cada uma delas pode ser observada a curva de crescimento correspondente obtida. Sendo que o poço A1 corresponde ao controle negativo (sem fonte de carbono e sem cultura). Mostrando em: (A) Experimento realizado com a linhagem selvagem NA1000. (B) Experimento realizado com a linhagem  $\Delta$ TonB 1. (C) Experimento realizado com a linhagem  $\Delta$ TonB 2. As caixas vermelhas destacam os poços que aparentemente possuem diferença de crescimento entre as linhagens. As curvas de crescimento foram obtidas pela medida da absorbância a 600 nm a cada 15 minutos no sistema Paradigm (Molecular Devices).

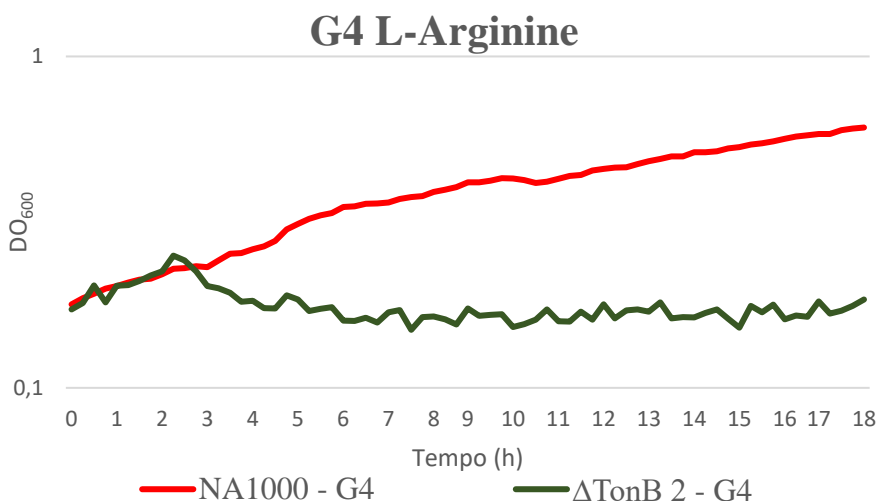
As caixas vermelhas nas figuras 28 e 29 indicam os poços onde aparentemente se obteve um crescimento diferente das linhagens mutantes comparada a NA1000. Na primeira placa testada a PM1 (Figura 28), notamos uma diminuição de crescimento na linhagem  $\Delta tonB1$  em três poços (A8, G5 e G6), porém ao analisar cada curva que apresentou uma diminuição no crescimento separadamente em gráficos, é observado que a diferença de crescimento não é significativa (dados não mostrados). Isto não significa necessariamente um defeito no crescimento, mas pode significar apenas uma variabilidade normal do experimento.

Já na placa PM2A (Figura 29) notamos diminuição de crescimento em ambas as linhagens mutantes. No mutante  $\Delta tonB1$ , identificamos em três poços: A3; A5 e G4 um crescimento menor com relação a NA1000, e para melhor visualização desses crescimentos foram analisadas as curvas juntas, onde constatou que havia uma diferença no crescimento da linhagem mutante. Os gráficos estão representados na figura 30.



**Figura 30 – Gráfico de comparação das linhagens NA1000 e  $\Delta$ TonB1.** Gráfico realizado para demonstrar a diferença encontrada nos poços A3; A5 e G4 da placa PM2A. (A) Poço A3 composto por  $\alpha$ -Ciclodextrina; (B) Poço A5 composto por  $\gamma$ -Cyclodextrin e (C) Poço G4 composto por L-Arginine. A curva de crescimento foi obtida pela medida da absorbância a 600 nm a cada 15 minutos no sistema Paradigm (Molecular Devices).

Já no  $\Delta$ TonB2 a única diferença observada foi novamente no poço G4, outra vez fizemos um gráfico para entre a linhagem mutante e a selvagem do poço G4, para observarmos se há realmente a diferença de crescimento (Figura 31).



**Figura 31 – Gráfico de comparação das linhagens NA1000 e  $\Delta$ TonB2.** Gráfico realizado para demonstrar a diferença encontrada no poço G4 da placa PM2A. O poço G4 é composto por L-Arginine. A curva de crescimento foi obtida pela medida da absorbância a 600 nm a cada 15 minutos no sistema Paradigm (Molecular Devices).

Encontramos diferença de crescimento na linhagem  $\Delta$ tonB1, quando crescida na presença de  $\alpha$  e  $\gamma$  ciclodextrina. A Ciclodextrina é uma família de oligossacarídeos cíclicos, consistindo de um anel macrocíclico de subunidades de glicose sendo produzidas a partir do amido por conversão enzimática. As ciclodextrinas são formadas por monômeros de glicose que pode variar de 6 a 8 unidades, dando a forma de cone. A quantidade de monômeros de glicose, que além de caracterizar a ciclodextrina é que dará origem ao nome, como por exemplo: a que possui 6 carbonos na sua estrutura é  $\alpha$  – ciclodextrina; 7  $\beta$  – ciclodextrina e 8 carbonos  $\gamma$  – ciclodextrina (BECKET; SCHEP; TAN, 1999).

Com o resultado das placas PM2A do Biolog do  $\Delta$ tonB1, notamos a que a linhagem não cresce na presença dessas fontes de carbono, indicando que a falta específica dessa proteína TonB possa estar envolvida de alguma maneira com a utilização dessa fonte de carbono.

Outra diferença encontrada nas duas linhagens  $\Delta$ tonB1 e  $\Delta$ tonB2 quando utilizado a placa PM2A é o não crescimento das linhagens no poço G4 que contém a presença de L-Arginina.



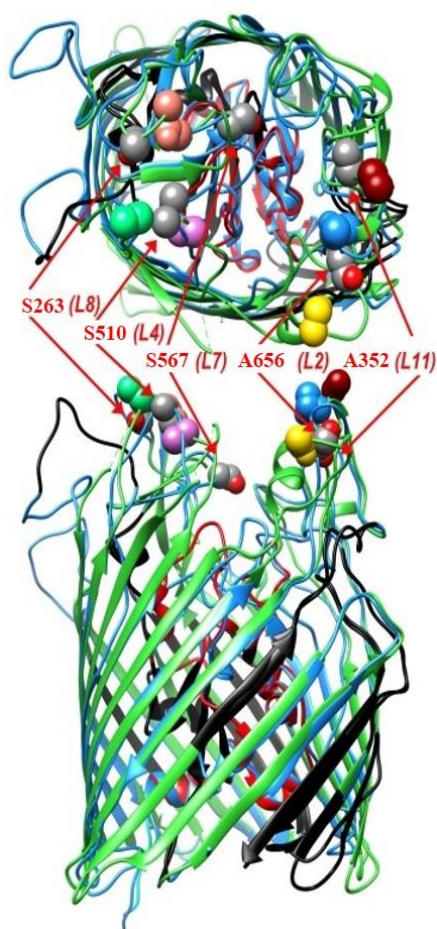
A arginina é um aminoácido semi-essencial e principal carregadora de nitrogênio e faz parte da síntese de moléculas importantes e de outros aminoácidos como a prolina. Com a obtenção do gráfico da comparação das linhagens NA1000 e  $\Delta tonB1$  (Figura 30C) e NA1000 e  $\Delta tonB2$  (Figura 31) é possível reparar a diminuição de crescimento das linhagens mutantes. No caso de  $\Delta tonB1$  desde do início do crescimento a linhagem não consegue crescer igual a selvagem, já  $\Delta tonB2$  consegue crescer igual a NA1000, mas após três horas de crescimento tem uma queda no crescimento não conseguindo mais recuperar ao longo da curva. Para melhor compreensão e confirmação deste resultado ainda são necessários novos experimentos independentes com todas as fontes de carbono que foram observadas.

#### 4.4.6 - Mutações sítio-dirigidas em aminoácidos da proteína HutA

A partir da mutação do gene CCNA\_02277 chamado de *hutA*, conseguimos provar que *C. crescentus* também é capaz de adquirir ferro de fontes como heme e hemoglobina, (BALHESTEROS et al, 2017), o que provavelmente está relacionado à presença destes componentes, oriundos da decomposição de matéria orgânica, nos ambientes aquáticos em que *C. crescentus* vive. Como já mencionado anteriormente, acredita-se que a região dos *loops* externos presente nos receptores dependentes de TonB possua os aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento dos sideróforos.

No caso de HutA, nosso colaborador, Prof<sup>o</sup> Phillip Klebba da Universidade Kansas State (USA), a partir de uma predição comparando receptores dos quais se conhecem os aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento do sideróforo (KLEBBA, 2016; NAIRN et al., 2017; SMALLWOOD et al., 2014) identificou alguns possíveis aminoácidos candidatos em HutA que ligam heme (Figura 32).

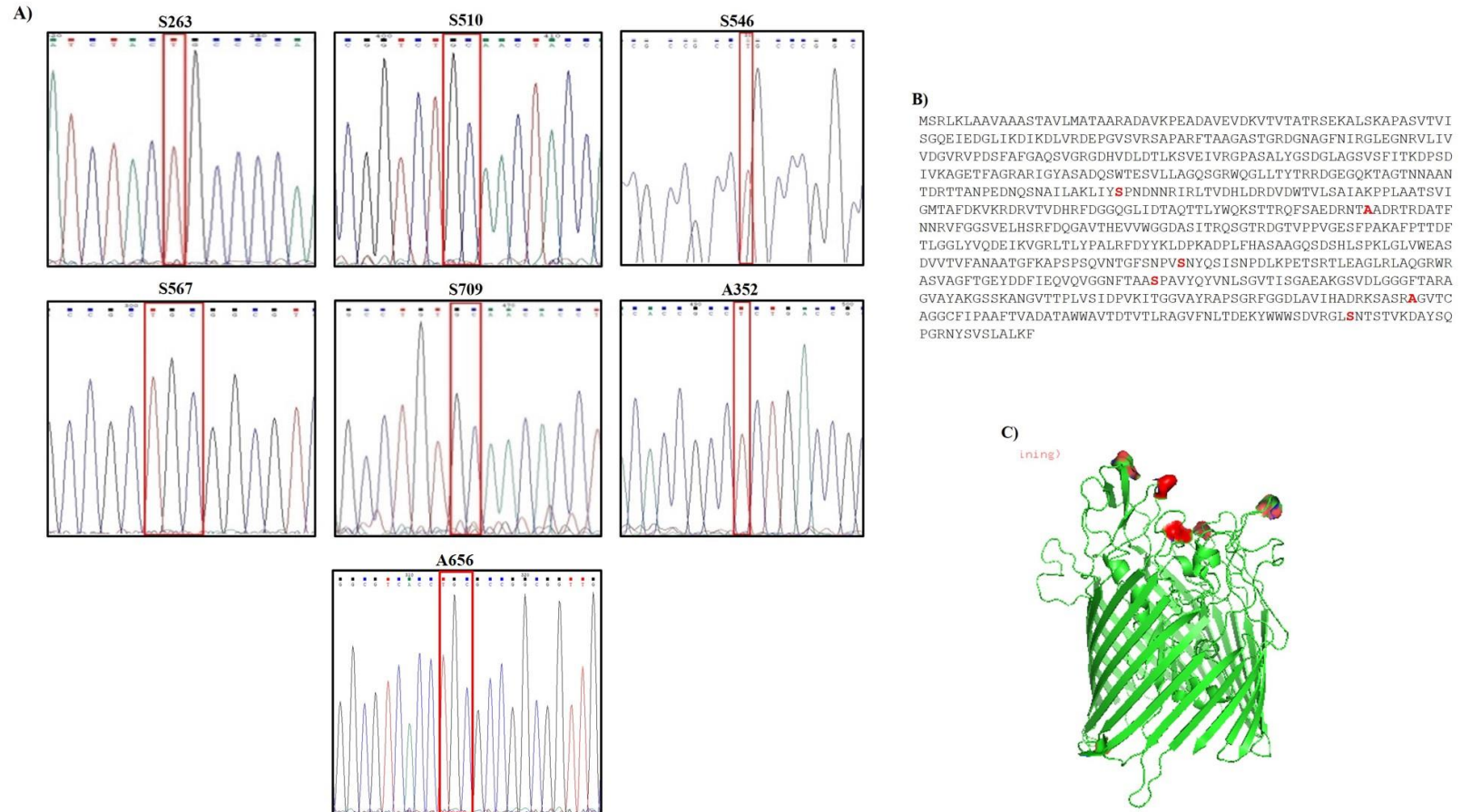
Estes aminoácidos selecionados foram trocados por cisteínas para realizar ensaios de transporte de heme. A troca obrigatoriamente tem que ser pelo aminoácido cisteína pois o mesmo possui enxofre na composição o que é necessário para que o fluoróforo maleimida possa se ligar (NAIRN et al., 2017). Ao total localizamos seis aminoácidos onde realizamos as trocas nucleotídicas que codificarão para uma cisteína. São eles: S263; S510; S567; S709, A352 e A656. As trocas foram feitas na cópia do gene *hutA* no plasmídeo pMR20, para complementação do mutante deletado do gene original.



**Figura 32 – Modelagem da estrutura da proteína HutA de *C. crescentus*.** Indicando os possíveis aminoácidos envolvidos no reconhecimento do grupo heme. Obtido do Prof. Phillip Klebba.

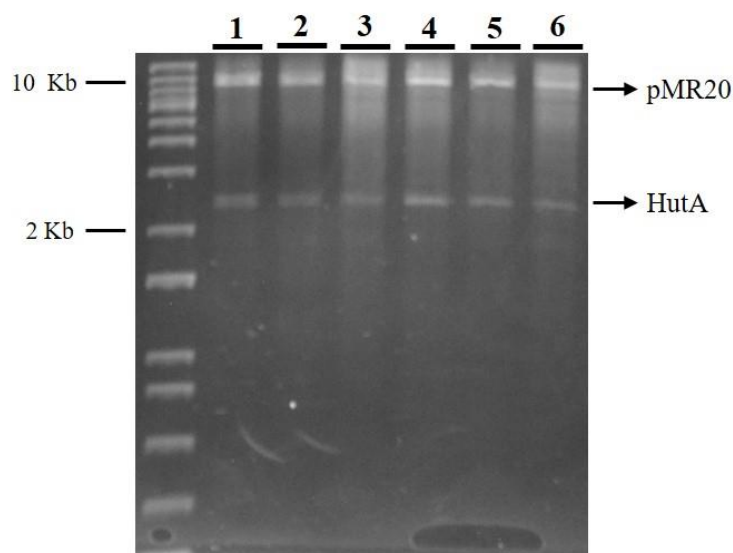
Todos os códons para os seis aminoácidos pré-selecionados foram trocados por códons de cisteínas utilizando o Kit QuickChange XL (Agilent) (Item 2.14). Para que tivéssemos certeza que a mutação dirigida ocorreu e que somente o códon para o aminoácido desejado tenha sido alterado no cromossomo, o gene de cada mutação independente foi submetido a uma reação de sequenciamento de DNA.

O resultado do sequenciamento gerou um eletroferograma, onde é possível confirmar as mutações. Também realizamos uma análise por BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) para confirmar novamente se a troca que ocorreu no gene foi somente a realizada pelo Kit. Na Figura 33 mostramos todos os eletroferogramas obtido para cada mutação específica.



**Figura 33 – Representação da confirmação das mutações sitio-dirigidas em HutA.** (A) Eletroferograma do sequenciamento de *hutA* para a confirmação da troca de nucleotídeos. O quadrado vermelho indica onde encontra-se a troca do nucleotídeo realizada. (B) A sequência FASTA de HutA, onde os aminoácidos trocados estão marcados em vermelho; (C) Modelagem de HutA feita pelo Swiss-Prot indicando em vermelho os aminoácidos presentes nos loops que foram mutados.

A seguir, após realizar e confirmar as mutações sítio-dirigidas, realizamos a clonagem do gene com cada mutação independente no plasmídeo pMR20 (Figura 34).



**Figura 34 – Confirmação da clonagem no plasmídeo pMR20.** Comprovação da clonagem no plasmídeo pMR20 com as mutações independentes em *hutA*. Visualização em gel de agarose 1%.

Com a construção no vetor pMR20 contendo as mutações independentes em HutA, estes foram inseridos por eletroporação em *E. coli* S17-1 e posteriormente foram introduzidos por conjugação na linhagem  $\Delta hutA$ . Assim, obtivemos no total 6 linhagens com as mutações em aminoácidos de HutA importantes para o transporte de heme. Estas linhagens serão utilizadas no futuro nos ensaios de cinética pelo nosso colaborador Prof<sup>o</sup> Philip Klebba e Prof<sup>a</sup> Salete Newton.

Em suma, os resultados desse trabalho demonstraram que possivelmente *C. crescentus* pode utilizar citrato ou cloreto férrico como sideróforo, porém mais estudos são necessários, para a confirmação de qual sideróforo é transportado por cada TBDT. Ainda não é conhecida a utilização de  $\alpha$  e  $\gamma$  ciclodextrina como fonte de carbono em *C. crescentus*, necessitando assim uma melhor averiguação sobre o assunto. Não obstante, este trabalho permitiu a caracterização de algumas das proteínas que são necessárias para o transporte de ferro em *C. crescentus*.

## 5. CONCLUSÕES

Os receptores dependentes de TonB (TBDTs) de *C. crescentus* foram comparados com os TBDTs de *E. coli* por alinhamentos de sequência de aminoácidos, o qual mostraram que há um pequeno percentual de conservação de sequências entre os transportadores. Foi possível identificar algumas regiões como o TonB Box e *plug*, que apresentaram a maior conservação entre as sequências. A maior diferença se encontra nos *loops*, provavelmente devido a presença de aminoácidos específicos de interação com os diferentes tipos de sideróforos. Também realizamos um alinhamento entre as duas proteínas TonBs de *C. crescentus*, e foram encontradas regiões muito conservadas entre elas, com a presença da região rica em Prolina e Lisina que compõe o domínio que se localiza no periplasma da célula.

Foram realizadas modelagens das estruturas das proteínas TBDTs e das proteínas TonB1 e TonB2, e foi visto que possuem as mesmas estruturas presentes em proteínas já cristalizadas e descritas de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Foram construídas linhagens mutantes para todos os quatro genes codificando os TBDTs e os dois genes codificando TonB, e foi realizada uma análise fenotípica das linhagens mutantes. O crescimento com três fontes diferentes de ferro, e ensaios de viabilidade mostraram que apenas o  $\Delta 00028$  apresentou um atraso de crescimento perante as fontes testadas, sugerindo que este transportador esteja relacionado à incorporação de citrato férrico ou de cloreto férrico.

Em relação às proteínas TonBs, ambas as linhagens mutantes não apresentaram uma diferença de crescimento nos dois experimentos realizados para observar o crescimento bacteriano, provavelmente por uma compensação de função entre elas.

Determinamos que a linhagem  $\Delta tonB1$  não cresceu na presença de três fontes diferentes de carbono, sendo elas:  $\alpha$  e  $\gamma$  ciclodextrina e L-Arginina. Já o  $\Delta tonB2$  apresentou somente uma diferença de crescimento na presença de L-Arginina.

Seis mutações sítio-dirigidas foram realizadas em HutA, para permitir futuros ensaios *de* cinética do transporte de heme/hemoglobina pelo nosso colaborador Dr<sup>o</sup> Phillip Klebba. Essas análises nos ajudarão a compreender melhor o transporte desse sideróforo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUÍÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 215–237, 2003.

BAGOS, P. G. et al. PRED-TMBB: A web server for predicting the topology of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. WEB SERVER ISS., p. 400–404, 2004.

BALHESTEROS, H. et al. TonB-Dependent Heme/Hemoglobin Utilization by *Caulobacter crescentus* HutA. **Journal of Bacteriology** v. 199, n. 6, p. 1–15, 2017.

BARNARD, T. J.; WATSON, M. E.; MCINTOSH, M. A. Mutations in the *Escherichia coli* receptor FepA reveal residues involved in ligand binding and transport. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 527–536, 2001.

BECKET, G.; SCHEP, L. J.; TAN, M. Y. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, n. 1, p. 65–71, 1999.

BEINERT; HOLM; MÜNCK; Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. **Science**, v. 277, n. August, p. 653, 2007.

BEROUAL, W.; BRILLI, M.; BIONDI, E. G. Non-coding RNAs Potentially Controlling Cell Cycle in the Model *Caulobacter crescentus*: A Bioinformatic Approach. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. May, p. 1–9, 2018.

BOUVIER, B.; CÉZARD, C. Impact of iron coordination isomerism on pyoverdine recognition by the FpvA membrane transporter of *Pseudomonas aeruginosa*. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, 2017.

BRADBEER, C. The Proton Motive Force Drives the Outer Membrane Transport of Cobalamin in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** v. 175, n. 10, p. 3146–3150, 1993.

CARTER, D. M. et al. Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35413–35424, 2006.

CASCALES, E. et al. Colicin Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 1, p. 158–229, 2007.

CELIA, H. et al. Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. **Nature**, v. 538, n. 7623, p. 60–65, 2016.

CHALLIS, G. L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. **ChemBioChem**, v. 6, n. 4, p. 601–611, 2005.

CHANG, C. et al. Crystal Structure of the Dimeric C-terminal Domain of TonB Reveals a Novel Fold. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27535–27540, 2001.

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.

CHIMENTO, D. P. et al. Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 5, p. 394–401, 2003.

CHIMENTO, D. P.; KADNER, R. J.; WIENER, M. C. Comparative structural analysis of TonB-dependent outer membrane transporters: Implications for the transport cycle. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 59, n. 2, p. 240–251, 2005a.

CHRISTEN, B. et al. The essential genome of a bacterium. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 528, p. 1–7, 2011.

CHU, B. C. 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.

CHU, B. C. H. et al. The solution structure, binding properties, and dynamics of the bacterial siderophore-binding protein FepB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 42, p. 29219–29234, 2014.

CHU, B. C. H.; PEACOCK, R. S.; VOGEL, H. J. Bioinformatic analysis of the TonB protein family. **BioMetals**, v. 20, n. 3–4, p. 467–483, 2007.

COBESSI, D.; CELIA, H.; PATTUS, F. Crystal Structure at High Resolution of Ferric-pyochelin and its Membrane Receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology** p. 893–904, 2005.

COLLIER, J. BBA - Gene Regulatory Mechanisms Cell division control in *Caulobacter crescentus* ☆. **BBA - Gene Regulatory Mechanisms**, n. February, p. 0–1, 2018.

CONTRERAS, H. et al. Heme uptake in bacterial pathogens. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 34–41, 2014.

CORNELIS, P.; DINGEMANS, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. November, p. 75, 2013.

CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR** v. 66, n. 2, p. 223–249, 2002.

CURTIS, P. D.; BRUN, Y. V. Getting in the loop: regulation of development in

*Caulobacter crescentus*. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 1, p. 13–41, mar. 2010.

DA SILVA NETO, J. F. et al. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 14, p. 4812–4825, 2009.

DE CASTRO FERREIRA, I. G. et al. Role and regulation of ferritin-like proteins in iron homeostasis and oxidative stress survival of *Caulobacter crescentus*. **BioMetals**, v. 29, n. 5, p. 851–862, 2016.

DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1081–1090, 2004.

DONG, Y. et al. Catecholamine-Stimulated Growth of *Aeromonas hydrophila* Requires the TonB2 Energy Transduction System but Is Independent of the Amonabactin Siderophore. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. December, p. 1–12, 2016.

ELY, B. Genetics of *Caulobacter crescentus*. **Methods**, v. 2, p. 372–384, 1991.

ENDRISS, F. et al. Mutant Analysis of the. **Society**, v. 185, n. 16, p. 4683–4692, 2003.

ENGLAND, J. C. et al. Global regulation of gene expression and cell differentiation in *Caulobacter crescentus* in response to nutrient availability. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 3, p. 819–833, 2010.

FERGUSON, A. D. et al. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5397, p. 2215–20, 1998a.

FERGUSON, A. D. Structural Basis of Gating by the Outer Membrane Transporter FecA. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1715–1719, 2002.

FERGUSON, A. D.; DEISENHOFER, J. TonB-dependent receptors — structural perspectives. **Elsevier** v. 1565, p. 318–332, 2002a.

FERGUSON, A. D.; DEISENHOFER, J. TonB-dependent receptors-structural perspectives. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1565, n. 2, p. 318–332, 2002b.

FERGUSON, A. D.; DEISENHOFER, J. Metal Import through Microbial Membranes. **Cell**, v. 116, n. 1, p. 15–24, 2004.

FREDERICK M. AUSUBEL, ROGER BRENT, R. E. **Current protocols in molecular biology**. [s.l: s.n.]. v. 171

GOLEY, E. D.; INIESTA, A. A.; SHAPIRO, L. Cell cycle regulation in *Caulobacter* : location , location , location. **Journal of Cell Science** 2007.

GONZÁLEZ, A. et al. Expanding the role of FurA as essential global regulator in



cyanobacteria. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–22, 2016.

GOTTESMAN, S.; MASSE, E. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **PNAS** v. 99, n. 7, 2002.

GREENE, N. P. et al. Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: A structural and functional perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, 2018.

GRESOCK, M. G.; KASTEAD, K. A.; POSTLE, K. From homodimer to heterodimer and back: Elucidating the TonB energy transduction cycle. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 21, p. 3433–3445, 2015a.

GRESOCK, M. G.; POSTLE, K. Going outside the TonB box: Identification of novel FepA-TonB interactions in vivo. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 10, p. 1–16, 2017.

GRINTER, R. et al. Structure of the bacterial plant-ferredoxin receptor FusA. **Nature Communications**, v. 7, p. 13308, 2016.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL : an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381–3385, 2003.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.

HANNAUER, M. et al. An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Letters**, v. 584, n. 23, p. 4751–4755, 2010.

HANTKE, K. Iron and metal regulation in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 172–177, 2001.

HASSAN, A. et al. Pangenome and immuno-proteomics analysis of *Acinetobacter baumannii* strains revealed the core peptide vaccine targets. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 732, 2016.

HICKMAN, S. J. et al. Gating of TonB-dependent transporters by substrate-specific forced remodelling. **Nature Communications**, v. 8, p. 14804, 2017.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores †‡. **Natural Product Reports** p. 637–657, 2010.

JANA, B.; MANNING, M.; POSTLE, K. Mutations in the ExbB cytoplasmic carboxy terminus prevent energy-dependent interaction between the TonB and ExbD periplasmic domains. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 20, p. 5649–5657, 2011.

JEONG, J. Y. et al. One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5440–5443, 2012.

JOHNSTONE, T. C.; NOLAN, E. M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. **Dalton Trans.**, v. 44, n. 14, p. 6320–6339, 2015.

KATOH, K. et al. MAFFT : a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research** v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.

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.

KILLMANN, H.; BENZ, R.; BRAUN, V. Conversion of the FhuA transport protein into a diffusion channel through the outer membrane of Escherichia coli. **The EMBO journal**, v. 12, n. 8, p. 3007–16, 1993.

KIRKPATRICK, C. L.; VIOLLIER, P. H. Decoding Caulobacter development. **FEMS Microbiology Reviews** v. 36, p. 193–205, 2012.

KLEBBA, P. E. ROSET model of TonB action in Gram-negative bacterial iron acquisition. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 7, p. 1013–1021, 2016.

KOEDDING, J. et al. Dimerization of TonB Is Not Essential for Its Binding to the Outer Membrane Siderophore Receptor FhuA of Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 9978–9986, 2004.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1781–1804, 2008.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. TonB or not TonB: is that the question? This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled CSBMCB 53rd Annual Meeting — Membrane Proteins in Health and Disease, and has undergone the Journal's usual peer review process. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 89, n. 2, p. 87–97, 2011.

KUEHL, C. J.; CROSA, J. H. systems in Vibrio species. p. 1403–1412, 2010.

LARSEN, R. A.; THOMAS, M. G.; POSTLE, K. Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. **Molecular microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1809–1824, 1999.

LAU, C. K. Y.; KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Bacterial ferrous iron transport : the Feo system. **FEMS Microbiology Reviews** n. November 2015, p. 273–298, 2017.

LEADEN, L. et al. Iron deficiency generates oxidative stress and activation of the sos response in Caulobacter crescentus. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–14, 2018.

LILL, Y. et al. Confined mobility of TonB and FepA in Escherichia coli membranes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–18, 2016.

LOCHER, K. P. et al. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: Crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. **Cell**, v. 95, n.

6, p. 771–778, 1998.

LOCHER, K. P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nature structural & molecular biology**, v. 23, n. 6, p. 487–93, 2016.

LOHMILLER, S. et al. TonB-dependent maltose transport by *Caulobacter crescentus*. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1748–1754, 2008.

MARKS, M. E. et al. The Genetic Basis of Laboratory Adaptation in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology** v. 192, n. 14, p. 3678–3688, 2010.

MASSÉ, E. et al. Small RNAs controlling iron metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 140–145, 2007.

MASSE, E.; VANDERPOOL, C. K.; GOTTESMAN, S. Effect of RyhB Small RNA on Global Iron Use in. **Pharmacia**, v. 187, n. 20, p. 6962–6971, 2005.

MIAO, S. et al. Roles of the TonB1 and TonB2 proteins in haemin iron acquisition and virulence in *Riemerella anatipestifer*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 161, n. 8, p. 1592–1599, 2015.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413–451, 2007.

MOYNIÉ, L. et al. Structure and function of the PiuA and PirA siderophore-drug receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–14, 2017.

NAGOBA, B.; VEDPATHAK, D. Medical Applications of Siderophores. **European Journal of General Medicine**, v. 8, n. 3, p. 229–235, 2011.

NAIRN, B. L. et al. Fluorescence high-throughput screening for inhibitors of TonB action. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 10, p. 1–20, 2017.

NIERMAN, W. C. et al. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 7, p. 4136–41, mar. 2001.

NOINAJ, N. et al. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. **Annu Rev Microbiol.** 2010 Oct 13; 64: 43–60

NOINAJ, N. et al. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 43–60, 2010b.

OEMIG, J. S.; OLLILA, O. H. S.; IWAŃ, H. NMR structure of the C-terminal domain of TonB protein from *Pseudomonas aeruginosa*. **PeerJ**, v. 6, p. e5412, 2018.

OGIERMAN, M.; BRAUN, V. Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: Studies of the FecA TonB box. **Journal of Bacteriology**, v. 185,

n. 6, p. 1870–1885, 2003.

OLLIS, A. A. et al. Cytoplasmic membrane protonmotive force energizes periplasmic interactions between ExbD and TonB. **Molecular Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 466–481, 2009.

OLLIS, A. A.; POSTLE, K. Identification of functionally important TonB-exbD periplasmic domain interactions In vivo. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 12, p. 3078–3087, 2012.

PARK, S.; YOU, X.; IMLAY, J. A. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 26, p. 9317–22, 2005.

PI, H.; HELMANN, J. D. Ferrous iron efflux systems in bacteria. **Metallomics**, v. 9, n. 7, p. 840–851, 2017.

POSTLE, K. TonB protein and energy transduction between membranes. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 25, n. 6, p. 591–601, 1993.

POSTLE, K.; KADNER, R. J. Touch and go: Tying TonB to transport. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 869–882, 2003.

PRADENAS, G. A.; MYERS, J. N.; TORRES, A. G. Characterization of the Burkholderia cenocepacia TonB Mutant as a Potential Live Attenuated Vaccine. **Vaccines** p. 1–12, 2017.

REMES, B. et al. Role of oxygen and the OxyR protein in the response to iron limitation in Rhodobacter sphaeroides. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 794, 2014.

SAHA, M. et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016.

SAHA, R. et al. Microbial siderophores: A mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013.

SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 2844–2854, 2011.

SCHALK, I. J.; MISLIN, G. L. A.; BRILLET, K. Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore-Iron Outer Membrane Transporters. [s.l.] **Elsevier**, 2012. v. 69

SILVA NETO, J. F.; LOURENÇO, R. F.; MARQUES, M. V. Global transcriptional response of *Caulobacter crescentus* to iron availability. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 549–565, 2013.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System

for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

SMALLWOOD, C. R. et al. Concerted loop motion triggers induced fit of FepA to ferric enterobactin. **The Journal of General Physiology**, v. 144, n. 1, p. 71–80, 2014.

SVERZHINSKY, A. et al. Membrane Protein Complex ExbB4–ExbD1–TonB1 from *Escherichia coli* Demonstrates Conformational Plasticity. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 11, p. JB.00069-15, 2015.

THERIAULT, G.; NKONGOLO, K. K. Evidence of prokaryote like protein associated with nickel resistance in higher plants: horizontal transfer of TonB-dependent receptor/protein in *Betula* genus or de novo mechanisms? **Heredity**, v. 118, n. 4, p. 358–365, 2017.

TOUATI, D. Iron and oxidative stress in bacteria. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 373, n. 1, p. 1–6, 2000.

TSIRIGOS, K. D.; ELOFSSON, A.; BAGOS, P. G. PRED-TMBB2: Improved topology prediction and detection of beta-barrel outer membrane proteins. **Bioinformatics**, v. 32, n. 17, p. i665–i671, 2016.

WEXLER, M. et al. The *Rhizobium leguminosarum* tonB gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 801–816, 2001.

WHITE, P. et al. Exploitation of an iron transporter for bacterial protein antibiotic import. **PNAS** p. 0–2, 2007.

WIENER, M. C. TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? **Elsevier**, 2005.

WILSON, B. R. et al. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 12, p. 1077–1090, 2016.

WINKELMANN, G. Microbial siderophore-mediated transport. **Biochemical Society transactions**, v. 30, n. 4, p. 691–6, 2002.

YUE, W. W.; GRIZOT, S.; BUCHANAN, S. K. Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. **Journal of Molecular Biology**, v. 332, n. 2, p. 353–368, 2003.

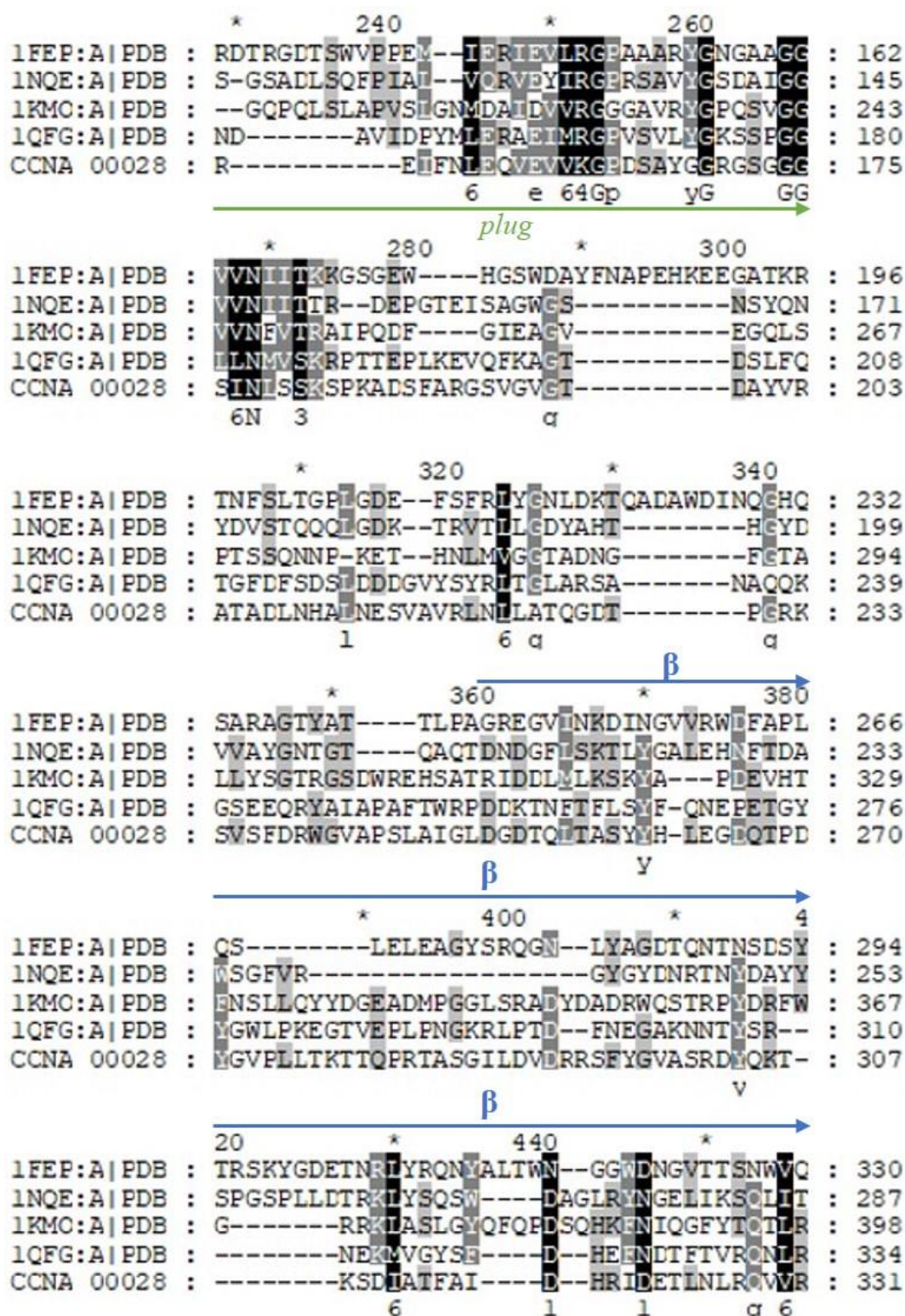
ZHAI, Y. F.; HEIJNE, W.; SAIER, M. H. Molecular modeling of the bacterial outer membrane receptor energizer, ExbBD/TonB, based on homology with the flagellar motor, MotAB. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1614, n. 2, p. 201–210, 2003.

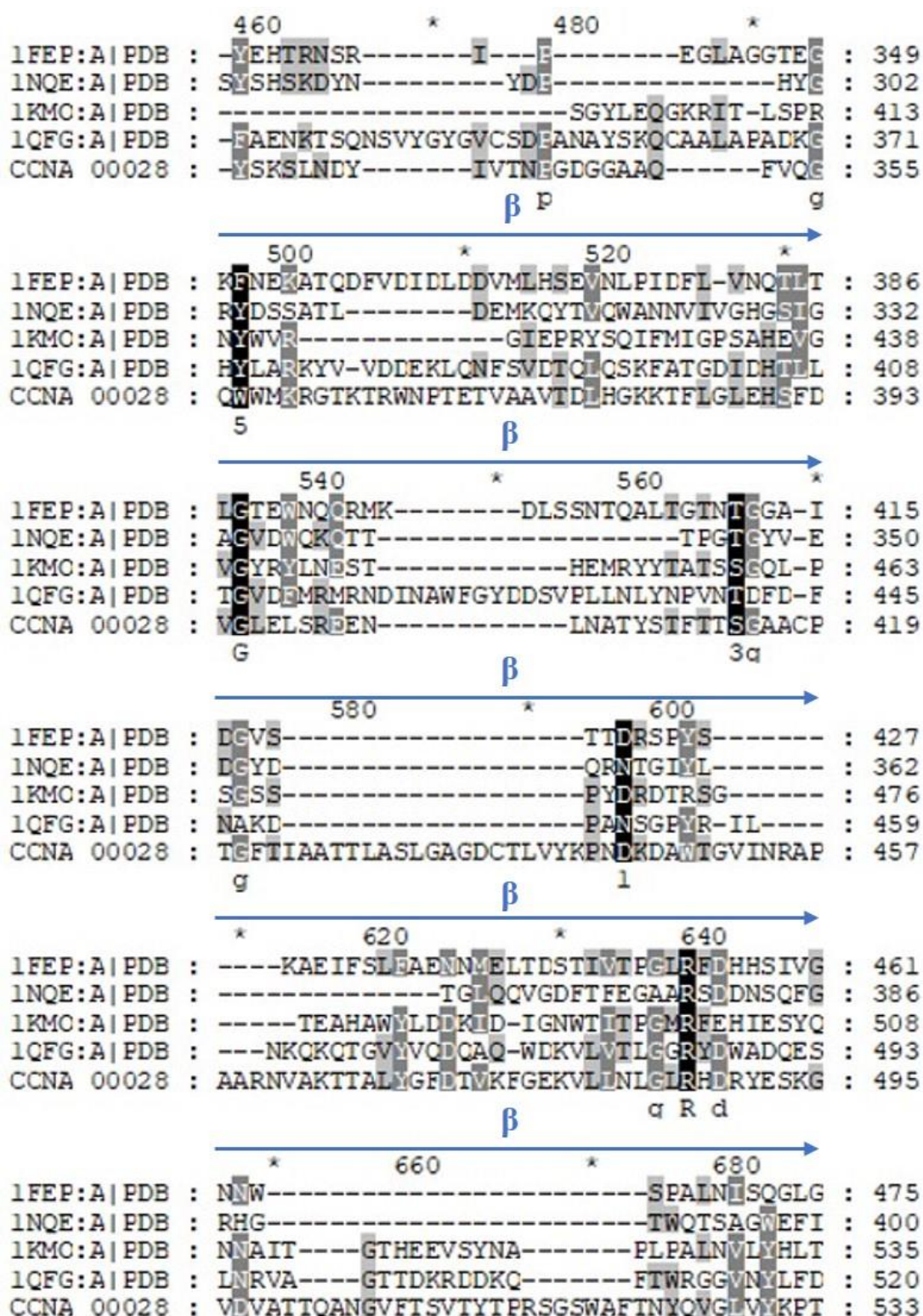
## ANEXO

A – Alinhamento com os receptores dependentes de TonBs de *Escherichia Coli* e o receptor CCNA\_00028 de *Caulobacter crescentus*

		*	20	*														
1FEP:A PDB :	M	-----NKKIH-----	SL	AL	VNLG	TYGVAQAC :	23											
1NQE:A PDB :	M	-----	IKKASL	TACS	VTAFSAWA :	20												
1KMC:A PDB :	M	TPL	---RVFRKTTPLVNTIRISL	PLAGLS	SFAFAA :	34												
1QFG:A PDB :	MA	-----	RS	TAQPKHSLRKA	VAVATAVSGMSVYA :	31												
CCNA_00028 :	M	LRNPNFTGVVSEPRR	-----	ALSIA	AAVAGVAGLGLAQ :	32												
			6	6														
		40	*	60	*													
1FEP:A PDB :		PTDT	EVSHD	-----	-----	:	33											
1NQE:A PDB :		C	-----	-----	-----	:	21											
1KMC:A PDB :		C	VNIA	EGSLDKALNQYAAHSGFTLSVDASL	TRGKQNSG :	72												
1QFG:A PDB :		CAAVE	EKEDTI	-----	-----	:	42											
CCNA_00028 :		AAVAGE	DSADA	-----	-----	:	43											
		p																
		80	*	100	*													
1FEP:A PDB :		-----	-----	-----	-----	:	-											
1NQE:A PDB :		-----	-----	-----	DTSE	-----	:	25										
1KMC:A PDB :		LHGDYDVESGLQQLLDGSGLQVKPLGNN	SWTLE	PAPAP :	110													
1QFG:A PDB :		-----	-----	-----	TVTAAPAP :	50												
CCNA_00028 :		-----	-----	-----	AVTTANAD :	51												
		120	*	140	*													
		<i>TonB Box</i>	<i>plug</i>															
1FEP:A PDB :		-----	DTIVVTA	-----	AEQN	-----	LQAPGVSTIIT :	54										
1NQE:A PDB :		-----	DTLVVTE	NRFEQPRSTVL	-----	APT	EVV :	49										
1KMC:A PDB :		KE	---	DAL	TVVGDWLG	DARENDV	---	FEHAGARDV :	140									
1QFG:A PDB :		QESAWGPAATIA	ARQSATG	TKTDT	---	PIQKVPQ	SISVV :	86										
CCNA_00028 :		DRSV	---	SSV	LDKRVADPSSKFTAPL	VDTEKSV	EVV :	87										
		6	a	6	6													
		<i>plug</i>																
		160	*	180	*													
1FEP:A PDB :		ADE	IRKNFVARIVSKII	R	TPGVNIT	GNSTSGQRGNN :	91											
1NQE:A PDB :		TRCD	IDRWQSTSVNDVLRRL	PGVDIT	QNGGSGQLSS	-----	:	85										
1KMC:A PDB :		RREDFAKTGAT	IMREVLNRI	PGVSAP	ENNGTGSHDLA :	177												
1QFG:A PDB :		TAEEMALHQP	KSVEALS	YTPGVSVG	TRGASNTYDH	-----	:	122										
CCNA_00028 :		PAKIIIEQTAATS	SLADIL	R	TSEGIT	FGAGEGGQPLADR	-----	:	124									
		6	6	6	6													
		<i>plug</i>																
		200	*	220	*													
1FEP:A PDB :		RQ	IDIRGMGPE	---	NTL	IL	IDGKPVSSRNS	VRQGWGRGE :	126									
1NQE:A PDB :		--	IFIRG	TN	---	ASHVL	V	LDG	-----	VRNL	LAGV :	110						
1KMC:A PDB :		MN	FIRGLN	PR	LS	R	ST	V	MDG	-----	IPV	PFAPY :	207					
1QFG:A PDB :		--	LI	IRG	FAAE	---	G	S	Q	NN	Y	LN	-----	LR	LQGNFY :	149		
CCNA_00028 :		--	P	F	IRG	---	A	S	ANN	V	F	V	DG	-----	VR	D	SGGQV :	148
		IRG	6	1G	6													









1FEP:A|PDB : DDFTLKMG<sup>\*</sup>IARAK<sup>\*</sup>KA<sup>\*</sup>PSLYQTNPNYILYSKGGQGCYASA : 513  
 1NQE:A|PDB : EGYRFIASYGT<sup>\*</sup>SYKAENLGQLYGFY----- : 425  
 1KMC:A|PDB : DSWNLYANTEGSE<sup>\*</sup>GT<sup>\*</sup>VQY<sup>\*</sup>SOIGKAV----- : 560  
 1QFG:A|PDB : NGVTPYFSYSES<sup>\*</sup>EPSSQV<sup>\*</sup>GKDGNI----- : 545  
 CCNA 00028 : PGSSLYVSYSTASTP<sup>\*</sup>PGI<sup>\*</sup>SAGDQNS-----NTA : 561

 $\beta$ 

1FEP:A|PDB : GGCYLQGNDD<sup>\*</sup>LKA<sup>\*</sup>ET<sup>\*</sup>SINKE<sup>\*</sup>IGLEEK--RDGWL<sup>\*</sup>AGV<sup>\*</sup>TW : 549  
 1NQE:A|PDB : -----GNPNI<sup>\*</sup>DPEKSKQ<sup>\*</sup>WEGAFE-----G<sup>\*</sup>TAGV<sup>\*</sup>NW : 451  
 1KMC:A|PDB : -----QSGNVE<sup>\*</sup>PEKART<sup>\*</sup>WELG<sup>\*</sup>TRYD--DGA<sup>\*</sup>TAEM<sup>\*</sup>GL : 590  
 1QFG:A|PDB : -----FAPSKGKQ<sup>\*</sup>MEV<sup>\*</sup>GVKYVPEDR<sup>\*</sup>PTVVTGAV : 573  
 CCNA 00028 : TGTGNLATVQL<sup>\*</sup>EPEDSE<sup>\*</sup>SEEA<sup>\*</sup>CAKANVFHDT<sup>\*</sup>ALSAAL : 599

pe  $\beta$  E  $\alpha$ 

1FEP:A|PDB : ERNDYRNKI<sup>\*</sup>EAGYVAVGQNAVGTDL<sup>\*</sup>YQW<sup>\*</sup>-----NV : 580  
 1NQE:A|PDB : RISGYRNDV<sup>\*</sup>-----SDLIDY<sup>\*</sup>DDHILK<sup>\*</sup>YYNE : 476  
 1KMC:A|PDB : ELINENNQ<sup>\*</sup>-----YDS<sup>\*</sup>Q<sup>\*</sup>TNDT<sup>\*</sup>VTAR : 611  
 1QFG:A|PDB : YNLTKTNNL<sup>\*</sup>-----MADPEGS<sup>\*</sup>FFSVEG : 595  
 CCNA 00028 : EQTSRKN<sup>\*</sup>NAQ<sup>\*</sup>-----IQI<sup>\*</sup>LATTIYA<sup>\*</sup>--QV : 619

N

 $\beta$ 

1FEP:A|PDB : PKAVVEG<sup>\*</sup>IEGSLNV---PVSE<sup>\*</sup>T---VMW<sup>\*</sup>TNNIT<sup>\*</sup>YMLK- : 611  
 1NQE:A|PDB : GKARIK<sup>\*</sup>GVEATANFDTG<sup>\*</sup>PLTH<sup>\*</sup>TV-----SYD<sup>\*</sup>YVDA- : 506  
 1KMC:A|PDB : GKTRHTG<sup>\*</sup>LETQARYDLG<sup>\*</sup>TLTPTLD<sup>\*</sup>NVSIYAS<sup>\*</sup>WAYVNAE : 649  
 1QFG:A|PDB : GEIRARG<sup>\*</sup>VEIEAKA---ALSAS---VNV<sup>\*</sup>VGS<sup>\*</sup>TYTDAE : 627  
 CCNA 00028 : GEVEVKGF<sup>\*</sup>FGVSG---NLT<sup>\*</sup>PK---WCV<sup>\*</sup>FGG<sup>\*</sup>TYMISE : 651

g G E  $\beta$  63 y Y

1FEP:A|PDB : -----SENKTT<sup>\*</sup>GR<sup>\*</sup>LSI<sup>\*</sup>IEYTLNSTLS<sup>\*</sup>QAR-----ED : 640  
 1NQE:A|PDB : -----RNAITDT<sup>\*</sup>PL<sup>\*</sup>LRAK<sup>\*</sup>QOVKYQ<sup>\*</sup>LDWQLY-----D : 533  
 1KMC:A|PDB : I---REKGD<sup>\*</sup>TYGNL<sup>\*</sup>VPFS<sup>\*</sup>PKHK<sup>\*</sup>GT<sup>\*</sup>LGVD<sup>\*</sup>YKPG-----N : 679  
 1QFG:A|PDB : Y---TTDT<sup>\*</sup>TYK<sup>\*</sup>NTPAQ<sup>\*</sup>VPK<sup>\*</sup>HMASLWAD<sup>\*</sup>YTF<sup>\*</sup>FDG<sup>\*</sup>PLSG : 662  
 CCNA 00028 : LVRGAYTSVNQ<sup>\*</sup>GL<sup>\*</sup>PLANTE<sup>\*</sup>KHS<sup>\*</sup>ISSFT<sup>\*</sup>TYKVT----RK : 685

 $\alpha$   $\beta$  pk 5

1FEP:A|PDB : LSMQTTF<sup>\*</sup>FTWY<sup>\*</sup>GKQ<sup>\*</sup>PKKYNYK<sup>\*</sup>GQPAVGPET<sup>\*</sup>KEI--SP<sup>\*</sup>Y : 676  
 1NQE:A|PDB : FDWGITYQ<sup>\*</sup>YLGTR<sup>\*</sup>DKDYS-----SYPYQ<sup>\*</sup>TVKM--GGV : 564  
 1KMC:A|PDB : WTFNLNSD<sup>\*</sup>EQSSQ<sup>\*</sup>EALNANTV<sup>\*</sup>KE-SADG<sup>\*</sup>STGR<sup>\*</sup>I--PG<sup>\*</sup>F : 714  
 1QFG:A|PDB : LTLGTGGR<sup>\*</sup>YTGSS<sup>\*</sup>YGD<sup>\*</sup>PAN-----SFK<sup>\*</sup>V--GS<sup>\*</sup>Y : 688  
 CCNA 00028 : IALGGGAYHVS<sup>\*</sup>KS<sup>\*</sup>EGGNQ<sup>\*</sup>G-----GAGGG<sup>\*</sup>AS<sup>\*</sup>LIYAPAN : 718

6

```

          920          *          940          *
1FEP:A|PDB : SIVGLSATWDV----TKNVSITGGVDNLEDKRLW-RAG : 709
1NQE:A|PDB : SIWDLAVAYPV----TSHITVRGKIANLEDKDYE-TVY : 597
1KMC:A|PDB : MHWGARVAYDFGP-QMADINLAFGVKNIEDQDYFIRSY : 751
1QFG:A|PDB : TVVDALVRYDVARVGMAGSNVALHVNNLEDREYV--AS : 724
CCNA 00028 : WRYDAFASWAV----STGVDLQLNIQLNLTDERMI---- : 748
          5          6          6 N6fd          y

```

```

          960          *          980
1FEP:A|PDB : NAQITCDLAGANYIAGAGAYTYNEPGRTWYMSVNTHF : 746
1NQE:A|PDB : GYQDA-----GREYTLSGSYTF : 614
1KMC:A|PDB : DDNNKGIYAGQ-----PRILYMQGSLKF : 774
1QFG:A|PDB : CFNYGCFWGA-----ERQVVAATATFRF : 747
CCNA 00028 : -ARQNEVHHAD-----PAPGRQAILTINVKY : 773
          t g          R          5

```



**B – Alinhamento com os receptores dependentes de TonBs de *Escherichia Coli* e o receptor CCNA\_00138 de *Caulobacter crescentus***

```

                *           20           *
1FEP:A|PDB : MN----- : 2
1NQE:A|PDB : M----- : 1
1KMC:A|PDB : MTPLRVFRKTTPLVNTIRLSLLPLAGLSFSAFAAQVNI : 38
CCNA_00138 : MS-----IV----- : 4
1QFG:A|PDB : MA----- : 2
                M

                40           *           60           *
1FEP:A|PDB : ----- : -
1NQE:A|PDB : ----- : -
1KMC:A|PDB : APGSLDKALNQYAAHSGFTLSVDASLTRGKQSNGLHGD : 76
CCNA_00138 : ----- : -
1QFG:A|PDB : -----RSKTAQPK----- : 10

                80           *           100           *
1FEP:A|PDB : -----KKIHSLALIVNLGIYGVAQAQPTDTEV--S : 31
1NQE:A|PDB : -----IKKASLITACSVTAFSAWAQDT----- : 23
1KMC:A|PDB : YDVESGLQQLLDGSGIQVKPIGNNSWTLEPAPAP---- : 110
CCNA_00138 : --IRSHRHAVRFGASISVLAILGPAFGANAKEAAPLDA : 40
1QFG:A|PDB : -----HSLRKIADVAVATAVSGMSVYAAAVEE---- : 37
                6           6           6

TonB box
                120           *           140           *
1FEP:A|PDB : HDDL-----IVVTAA----- : 41
1NQE:A|PDB : SPDE-----LVVTIAN----- : 33
1KMC:A|PDB : KEDA-----LTVVGDW-----LGD : 124
CCNA_00138 : KADTEISEVIVLVRG----- : 55
1QFG:A|PDB : KEDL-----ITVTAAAPAPQESAWGPAATIAARQSATGT : 70
                Dt           6 6

                plug
                160           *           180           *
1FEP:A|PDB : ---EQNLQAPGVSTITADEIRKNPVARVSKIIRTMPG : 76
1NQE:A|PDB : RFEQPRSTVLAFTIVVTRCDIDRWQSTSVNDVLRRI : 71
1KMC:A|PDB : ARENDVFEHAGARDVIRREDFAKTGATIMREVLNRI : 162
CCNA_00138 : ---AQLRIAGSSHVVNEADLERSRVLTWNEALRQV : 90
1QFG:A|PDB : KTDTPIQKVPQISVVTADEMALHQPKSVKEALSYPG : 108
                6           6           6           PG

                plug
                200           *           220           *
1FEP:A|PDB : VNLTGNSTSGQRGNNRQIDIRGMGFE---NTLILIDGK : 111
1NQE:A|PDB : VDITQNGGSGQLSS---IFIRGTNAS---HVLVLIDG : 103
1KMC:A|PDB : VSAPENNGTGSDDLAMNFGIRGLNPERLASRSTVIM : 200
CCNA_00138 : VYARDEEGLGLRPN---IGIRGLAPTRSTKILQLED : 125
1QFG:A|PDB : VSVGTRGASNTYDH---IIRGFAAEGQSNNYL-NG : 142
                V           g           IRG           L IG

```

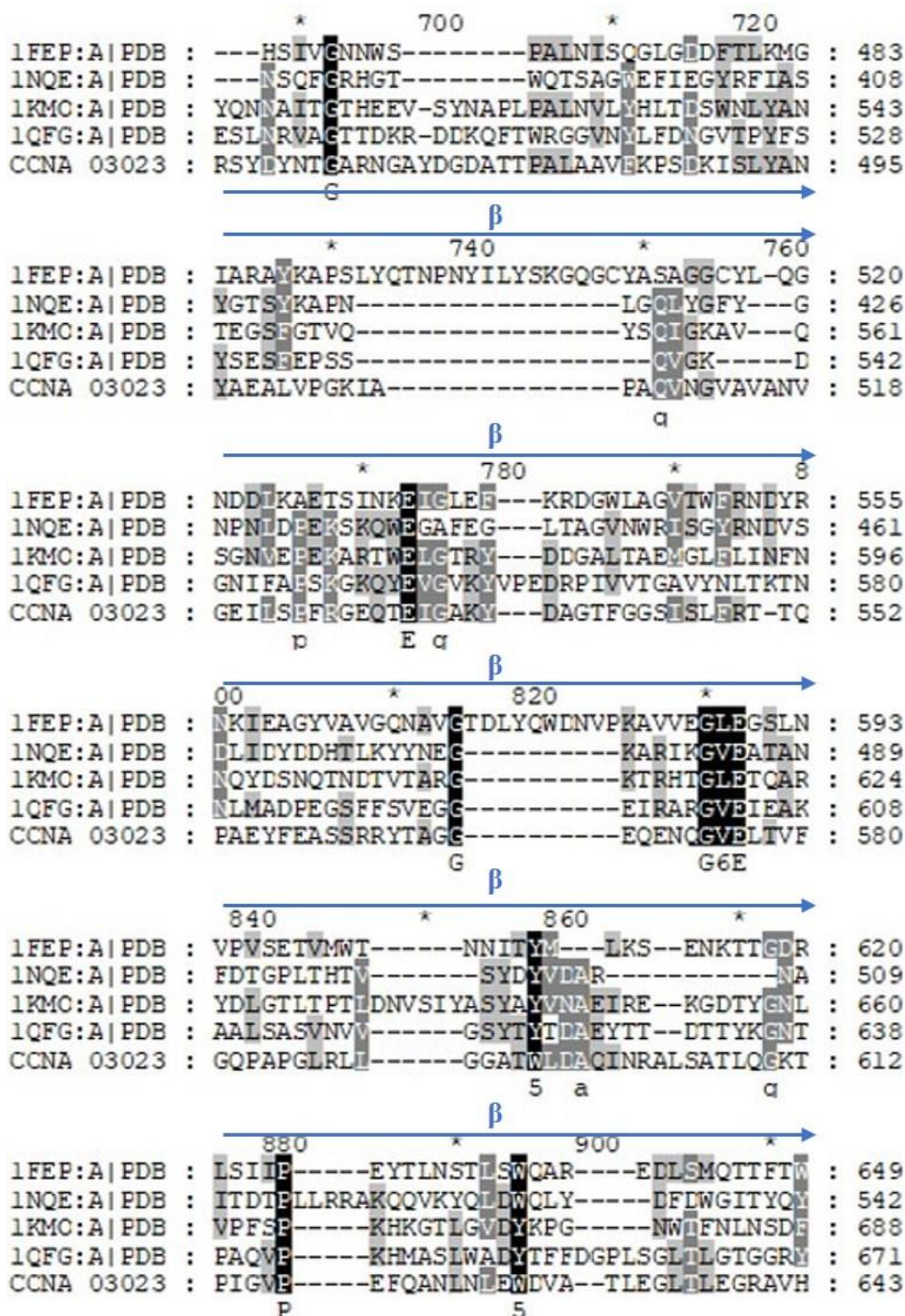
	*-----*	240	*-----*	260																								
1FEP:A PDB :	EVSSRNSVRQGW	GERDTRGDT	SWVPEEM	---IERIEVI	: 147																							
1NQE:A PDB :	RLNL-----	AGVSGSADL	SQFPAL	---VQRVPEYI	: 130																							
1KMC:A PDB :	EVPF-----	APYG-QPQL	SLAPVSL	IGNMDAILDV	: 228																							
CCNA 00138 :	PLSY-----	APYTDNASYS	MEPFRR	---FVRIETL	: 152																							
1QFG:A PDB :	KLQG-----	NFYN---	DAVIDEY-M	---LERADIM	: 165																							
	6		s P	r e 6																								
		<i>plug</i>																										
	*-----*	280	*-----*	300																								
1FEP:A PDB :	RGPAAR	YGNAAAGGV	VNIIITK	GS---GEWHG	SWDA : 181																							
1NQE:A PDB :	RGPRSA	VYGSDAIG	GVNIIIT	RDE--PGTEI	SAGWGS : 166																							
1KMC:A PDB :	RGGA	VRYGQSV	GGVNV	FVTRAI	P---QDFGIE	AGV : 262																						
CCNA 00138 :	KSASQ	IRFGPNT	VGGVIN	EITPSAP	ETFGGDL	FMAAGG : 190																						
1QFG:A PDB :	RGEVSV	LYGKSSP	GGLLN	VSKRP	TTEPLKE	VQFKAGT : 203																						
	4 $\alpha$	5G	GG66N	63	$\alpha$																							
			$\beta$																									
	*-----*	320	*-----*	340																								
1FEP:A PDB :	YFN-APE	HKEEGAT	KRTNFS	LTGPI	GDE--ESFRI	YGN : 216																						
1NQE:A PDB :	-----	NSYQNY	DVSTQ	QQIGDK	---TRVT	LGD : 191																						
1KMC:A PDB :	EGQLS	PTSSQ	NNPKETH	NLMV	GGTAD	NG--EGTAL	L : 296																					
CCNA 00138 :	-----	RGYQEL	DLKIG	GPV	LGE---	LAAIGH : 213																						
1QFG:A PDB :	-----	DSL	FQTGF	DFSDS	LD	DGVYSYR	IG- : 229																					
			$\beta$		1 $\alpha$																							
	*-----*	360	*-----*	380																								
1FEP:A PDB :	LDKQ	QADAW	DINQGH	QSARAG	TYATTL	PAGREG	VINKD : 254																					
1NQE:A PDB :	YAH	-----	HGYD	VVAY	GNTGT	QAQTD	NDGFL	SKT : 221																				
1KMC:A PDB :	YSG	RGSD	WREHS	ATRI	-----	DDL	MLKS : 320																					
CCNA 00138 :	ANR	RSNG	VRDNT	ALEI	-----	QD	: 232																					
1QFG:A PDB :	LARS	-ANA	QQK	GSE	EQR	YAI	APAF	TWRP	DDK	TNF---- : 262																		
	3			$\beta$																								
	*-----*	400	*-----*	4																								
1FEP:A PDB :	INGV	RWDF	FAPL	QSLE	LEAG	SRQGN	---LY	AGDT	QNTN : 290																			
1NQE:A PDB :	LYGA	LEHN	FTDA	WS	-----	GEVR	-----	GY	YDN	RNTNY : 249																		
1KMC:A PDB :	KYAP	DE---	VHIF	NSL	LQ	YDGE	AD-	MP	G	LSR	ADY : 352																	
CCNA 00138 :	LWG	KLE	GRL	SAH	HA	ALR	VGH	ATED	SQ	V	TYS	GLTAA	EY : 270															
1QFG:A PDB :	-----	-----	-----	-----	-----	TFLS	MF	QNE	PET	GY	Y	G	WLP	KEG : 284														
						$\beta$				v $\alpha$																		
	20	*-----*	440	*-----*																								
1FEP:A PDB :	SDSY	TRS	-----	KY	DET	NRL	YR	QN	---YA	IT	WN : 316																	
1NQE:A PDB :	DAY	SPG	-----	SPL	L	TR	K	LY	SQ	SW	DAG	IR	YN : 277															
1KMC:A PDB :	DADR	WQS	-----	TR	P	Y	R	F	W	G	R	R	KL	---AS	L	G	Y	Q : 378										
CCNA 00138 :	AADR	PR	QN	-----	P	F	A	N	H	F	K	I	K	R	A	T	H	G : 296										
1QFG:A PDB :	TVE	PL	PNG	KRL	P	T	D	F	N	E	G	A	K	N	T	Y	S	R	N	E	K	M	---V	G	Y	S	D	: 320



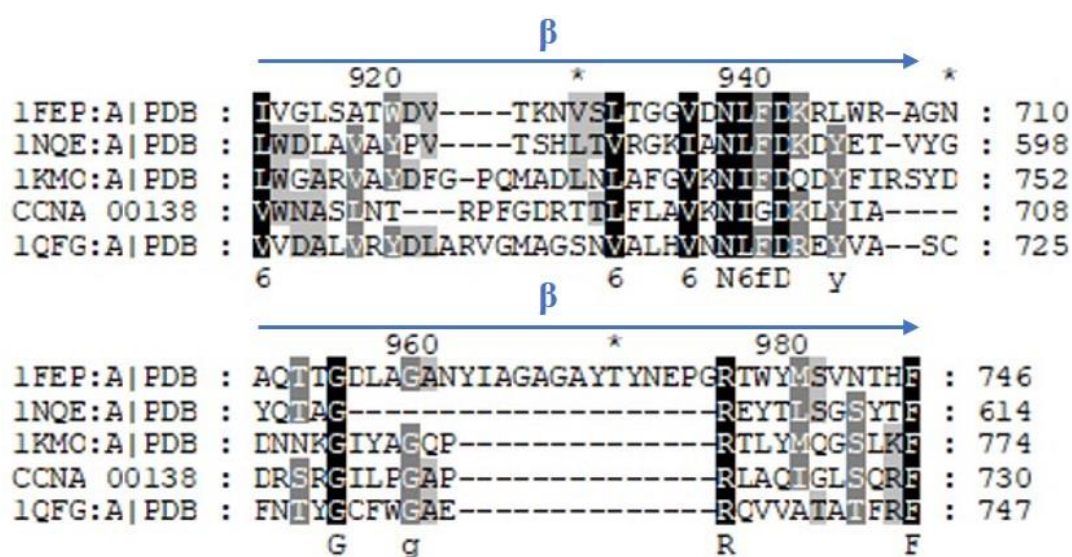
```

      460          *          480          *
1FEP:A|PDB : GGWDN--GVTTSNWVQ-----VEHTRNSRI----- : 339
1NQE:A|PDB : GEL-----LKSQLITS-----YSHSKDYN----- : 297
1KMC:A|PDB : FQPDSQHKFNIQGF-----YTQILRSGYLEQ GKRI : 408
CCNA 00138 : WTLSESLNKTSAWSLWFDRIWDRQSSNSGQ----- : 327
1QFG:A|PDB : HEFNDIFTVRQNLR---FAENKTSQNSVYGY-----GV : 350
      β
      500          *          520          *
1FEP:A|PDB : ---EE-----GLAGGTEGKFNKAT-QDEVD----- : 361
1NQE:A|PDB : ---DE-----HYGRYDSSATL----- : 310
1KMC:A|PDB : TLSE-----RNYWV----- : 417
CCNA 00138 : --RENDASDPACGGMANLNTTCGNEGRL-REYNT---- : 358
1QFG:A|PDB : CSDGANAYSKQCAALAPADKGHYLA---RKYVVDDEK : 384
      P      β
      540          *          560          *
1FEP:A|PDB : ---IDDDVVLHSEVNLPIDFLVNQT-LTLGTEWNCQR : 395
1NQE:A|PDB : -----DEMKQYTVQWANNVI VGHGSI GAGVDWQKOT : 341
1KMC:A|PDB : ---RGEPRYSQIFMIGPSAHE-----VGVGYRMLNES : 447
CCNA 00138 : ---YGLDTRITWTGALVGAQAV-----IEACARHQWER : 388
1QFG:A|PDB : LQNFSDTQLQSKFATGDIHT-----LLTGVDIMRMR : 417
      β      6 G
      580          *          600
1FEP:A|PDB : M-----KDLSSNTQALITGNTGGAI DGVSTTDRSP : 425
1NQE:A|PDB : -----ITPGIGYVEDGGYDQRNTGI : 360
1KMC:A|PDB : -----THEMRYYTATSSGQLPSGSSPYDRDT : 473
CCNA 00138 : Q-----NRLQLNGDRPRTARTACTSVNGGVRENLR : 418
1QFG:A|PDB : NDINAWFGYDDSVPLLNLYNFVNI DFDFAKDPANSGP : 455
      τ      g      g      l
      β
      *          620          *          640
1FEP:A|PDB : MS---KAEIFSLAENNMELTDSTIVTPGLRFEDH---- : 456
1NQE:A|PDB : ML-----TGLQQVGDFTFEGAARSDD---- : 381
1KMC:A|PDB : RS---GTEAHAWYLDKIDI-GNWTITPGMRFEHIESY : 507
CCNA 00138 : YG-----EASAGVSLSLTW-DRLTVNPGLRVEQIDYR : 450
1QFG:A|PDB : VRILNKQKQTGVVYVQDQAGW-DKVLVTLGGRYDWADQE : 492
      v      q R
      β
      *          660          *          680
1FEP:A|PDB : --HSLVGNW-----SPALNISQGLGDDFTLKMGIA : 485
1NQE:A|PDB : --NSQFGRHG-----TWQTSAGVEFIEGYRFIASYG : 410
1KMC:A|PDB : CNNATIGTHEEVSYNAPLEALNVLNHLTDSWNLYANTE : 545
CCNA 00138 : RVNRLNGITGETDLSEVI EGLGFAMAVKPGAYLYGGVH : 488
1QFG:A|PDB : SLNRVAGITDKRDDKQFTWRGGVNLFDNGVTPYFSYS : 530
      n      G

```



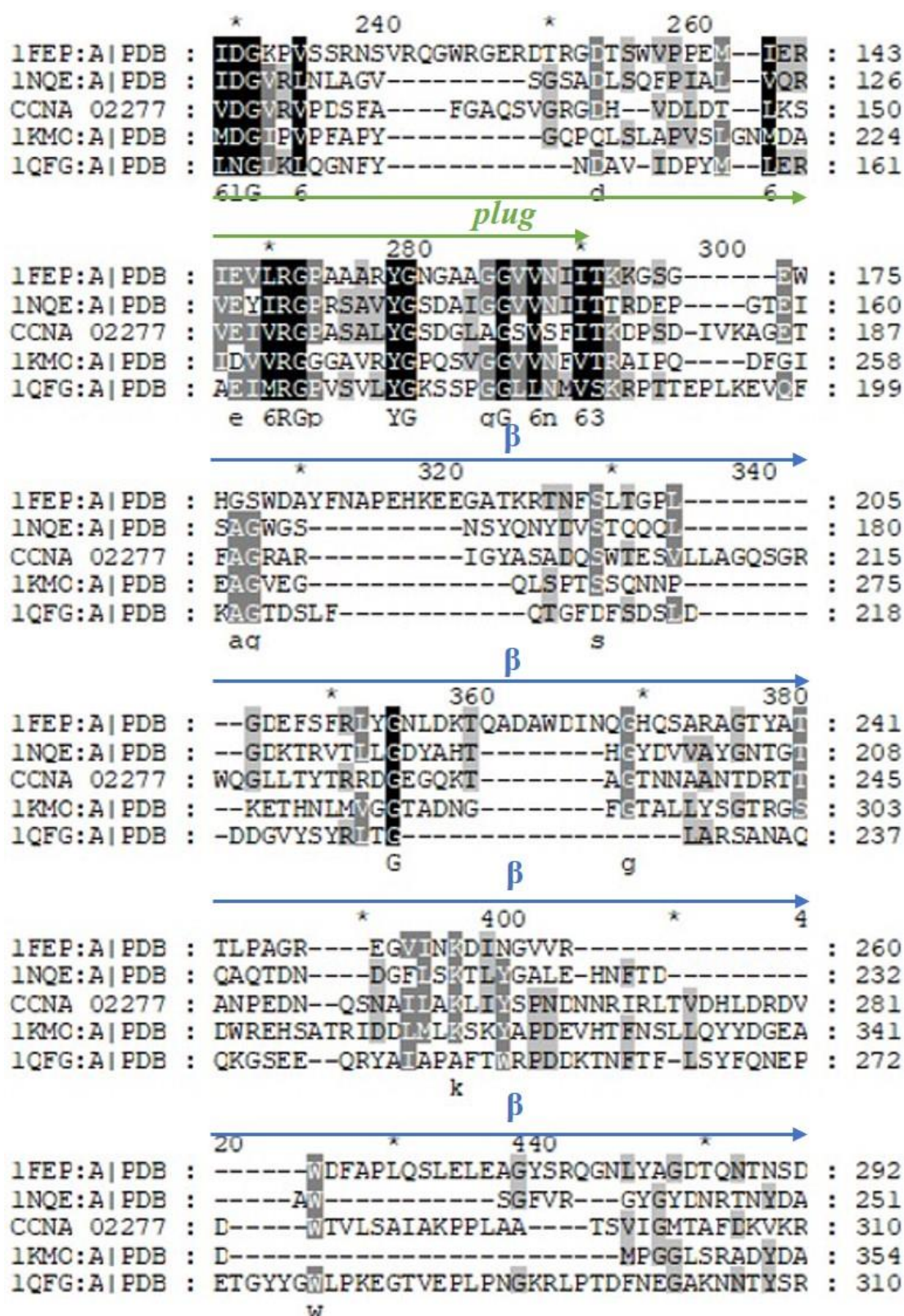


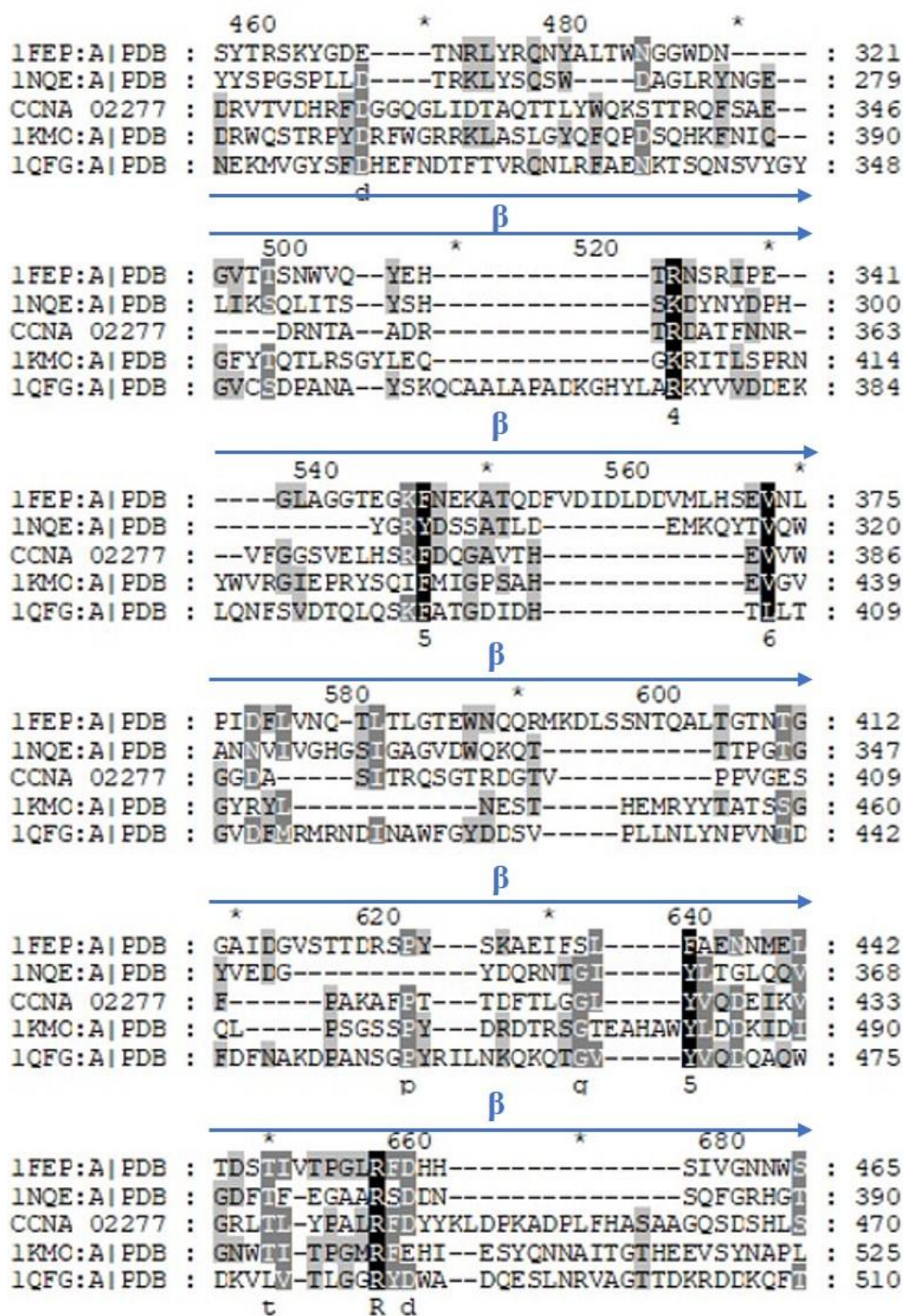


**C – Alinhamento com os receptores dependentes de TonBs de *Escherichia Coli* e o receptor *hutA* de *Caulobacter crescentus***

		*	20	*		
1FEP:A PDB	:	MNK	-----	KIHST	ALLVNLGIYGVAC	--- : 21
1NQE:A PDB	:	MIK	-----	KASLI	TACSVTAFSAWAC	--- : 21
CCNA_02277	:	MSRLKLA	-----	A	AAASTAVIMATAARAD	--- : 25
1KMC:A PDB	:	MTPLRVFRKTTPLVNTI	-----	RI	SLPLAGISFSAFAA	OVNI : 38
1QFG:A PDB	:	MARSKTAQPKHSLR	---	KI	AVVWATAVSGMSVY	AOA-- : 33
		M				Aq
		40	*	60	*	
1FEP:A PDB	:	-----	-----	-----	-----	: -
1NQE:A PDB	:	-----	-----	-----	-----	: -
CCNA_02277	:	-----	-----	-----	-----	: -
1KMC:A PDB	:	APGSLDKALNQYAAHSGFTLSVDASLTRGKQSNGLHGD				: 76
1QFG:A PDB	:	-----	-----	-----	-----	: -
		80	*	100	*	
1FEP:A PDB	:	-----	-----	-----	AQEP	TDFVSHD : 33
1NQE:A PDB	:	-----	-----	-----	DTSP	----- : 25
CCNA_02277	:	-----	-----	-----	AVKPEADAVEV	--- : 36
1KMC:A PDB	:	YDVESGLQQLLDGSGLQVKPLGNSWTL	-----	EP	PAPAPKE	--- : 112
1QFG:A PDB	:	-----	-----	-----	AVEPKE	----- : 39
					P	
		TonB Box	→	plug	→	
		120	*	140	*	
1FEP:A PDB	:	DTIIVVTA	-----	-----	AEQ	----- : 43
1NQE:A PDB	:	DTLVVTA	-----	-----	NRFEQFRS	----- : 40
CCNA_02277	:	DKVIVTA	-----	-----	TRSEKALS	----- : 51
1KMC:A PDB	:	DALIVVG	-----	-----	DWLGDARE	----- : 127
1QFG:A PDB	:	DTIIVTA	APAPQESAWGPAATIAARQSATG	TKT	DTPIQ	----- : 77
		D 6 Vta				
		plug	→	plug	→	
		160	*	180	*	
1FEP:A PDB	:	N--LQAPGVSTITADEIRKKNFVARDVSK	-----	IR	TMPGVNI	----- : 79
1NQE:A PDB	:	T---VLAPTTVVTRCDIDRWQSTSVNDV	-----	LR	RLPGVDI	----- : 74
CCNA_02277	:	K---APASVTVISGCEIEDGLIKDIKDI	-----	VR	DEPGVSV	----- : 85
1KMC:A PDB	:	NDVFEHAGARDVIRREDFAKTGATTMRE	-----	LN	RIPGVSA	----- : 165
1QFG:A PDB	:	K---VPCSISVVTAEEMALHQPKSVKEAL	-----	SY	TEGVSV	----- : 111
		6	2	6	6	PGV
		plug	→	plug	→	
		200	*	220	*	
1FEP:A PDB	:	-----	TGNST	SG	RGNNRQIDIRGMGPE	-----NTLII : 107
1NQE:A PDB	:	-----	TQNGG	SG	QLSS--IFIRGTNAS	-----HVLVI : 99
CCNA_02277	:	RSAPARFTAAGASTGRDGNAGFNIRGLEGN	-----	RV	LIV	----- : 120
1KMC:A PDB	:	-----	FENNG	T	GSHDLAMNFGIRGLNPRLASRSTVI	----- : 196
1QFG:A PDB	:	-----	GTRGAS	N	TYDH--LIRGFAAEGQ	-----SQNNY : 138
		3			IRG	

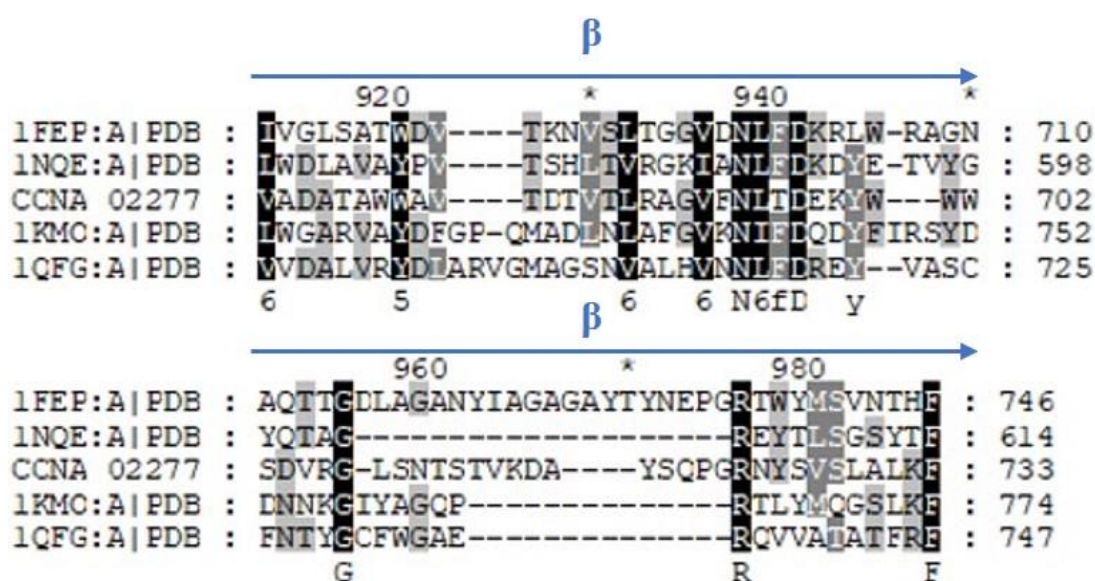










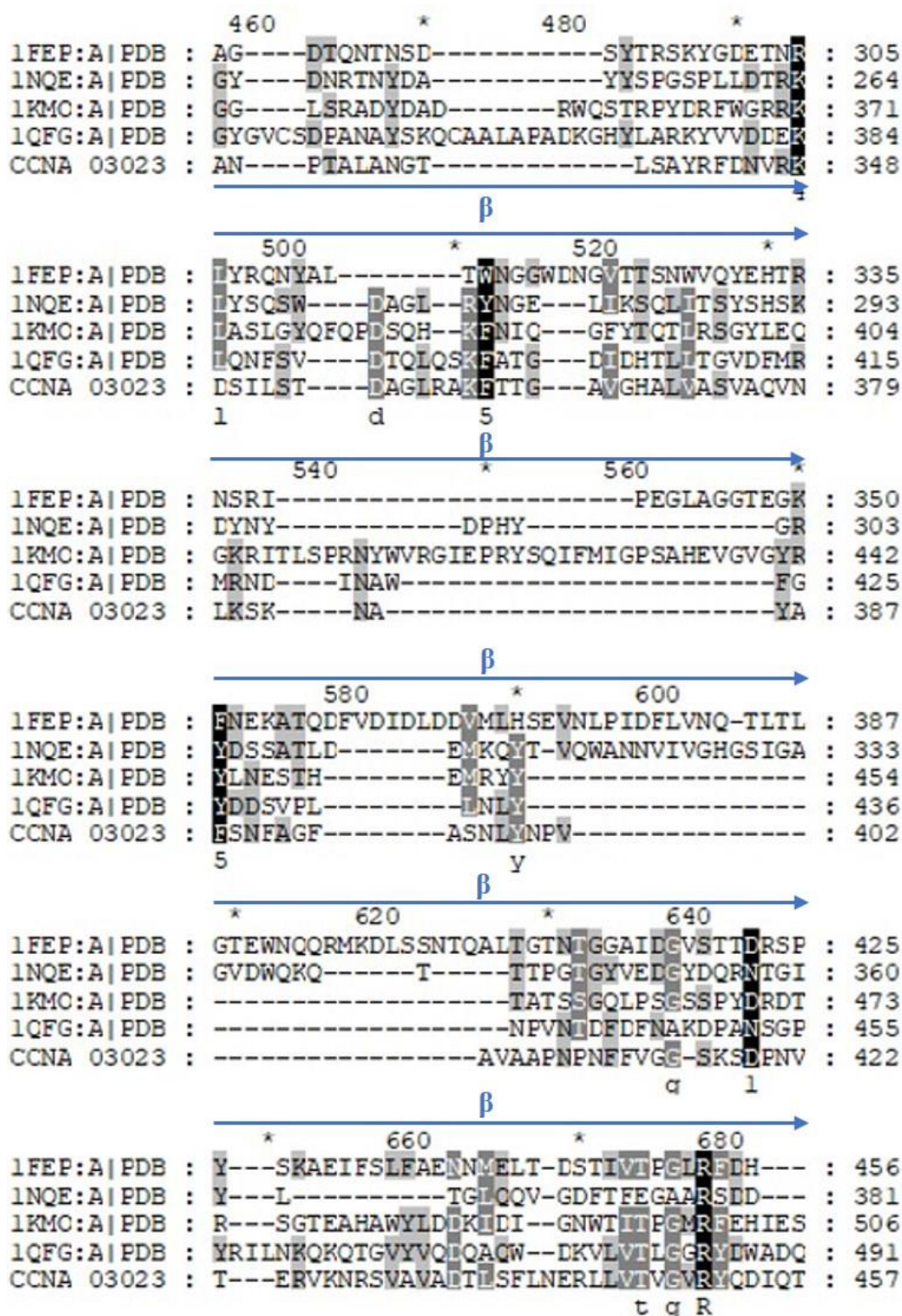


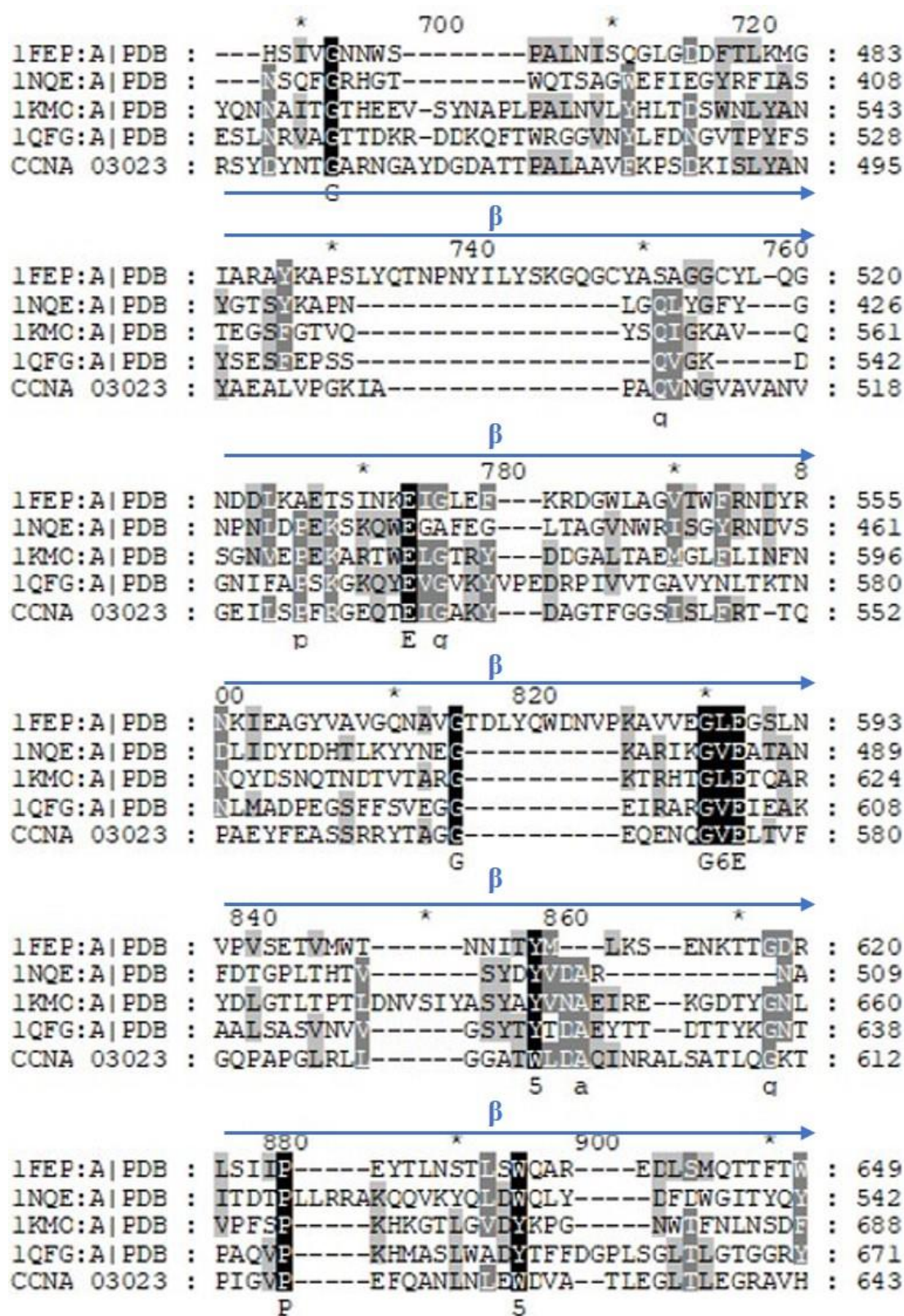














$\beta$

920 \* 940 \*

```

1FEP:A|PDB : YGKQOPKKYgYKQCPAVGPEnTKEI3SPYS6IVGLSAT5ADV : 687
1NQE:A|PDB : LGTRYDKDYS-----SYPYQIVRMGGVSIWDLAVAMPV : 575
1KMC:A|PDB : QSSQFADNAgTVKE-SADGSTGRIPGEMWnGARVANDF : 725
1QFG:A|PDB : TGSSYGDPAn-----SFFVGS3IVLALVR6IDL : 699
CCNA_03023 : TGSSQANTANn-----IVSLDAW3REDLGAR6IAF : 671

```

$\beta$

960 \* 980

```

1FEP:A|PDB : ----TKN6VS6LTGGVDN6LEN6FDDKRLW-RAGNAQTTGDLAGSA : 720
1NQE:A|PDB : ----TSH6ITVRGKIAN6LEN6FDDKDYE-TVYGYQIAG----- : 603
1KMC:A|PDB : GP-QMADIN6LAFGVKNI6ELQDYEIRSYDNNKGIYAGGQC : 762
1QFG:A|PDB : ARVGMAGSNVALHVN6NLEN6FDDREYVASCF--NTYGCGFEWGA : 735
CCNA_03023 : EA-GGKAV6ITLRARVEN6LTDRNN6FDQWVAV-----GGYGFGA : 702

```

$\beta$

1000 \*

```

1FEP:A|PDB : NYIAGAGAYTYNEPGRRIWYMSVNIFHF : 746
1NQE:A|PDB : -----REYTLRSGSYFIF : 614
1KMC:A|PDB : P-----RILYMQGSLRKF : 774
1QFG:A|PDB : E-----RQVVARIAFIFRE : 747
CCNA_03023 : NYL-----TLGAP-RILRRLSISFIDE : 721

```



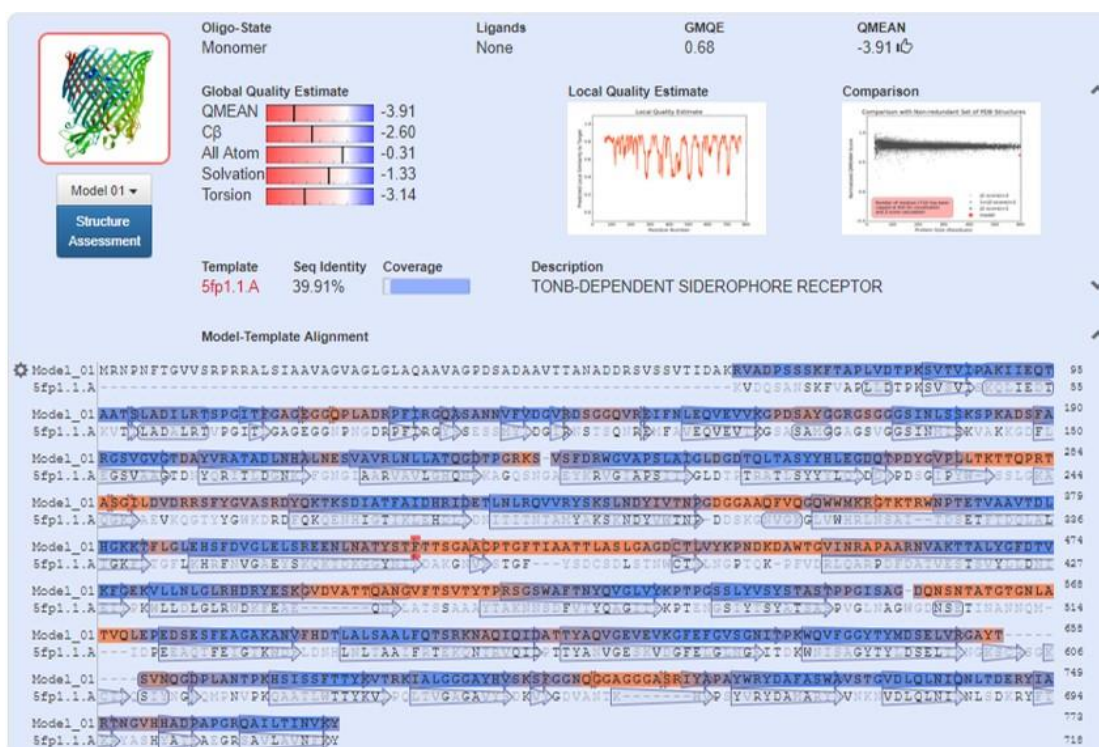




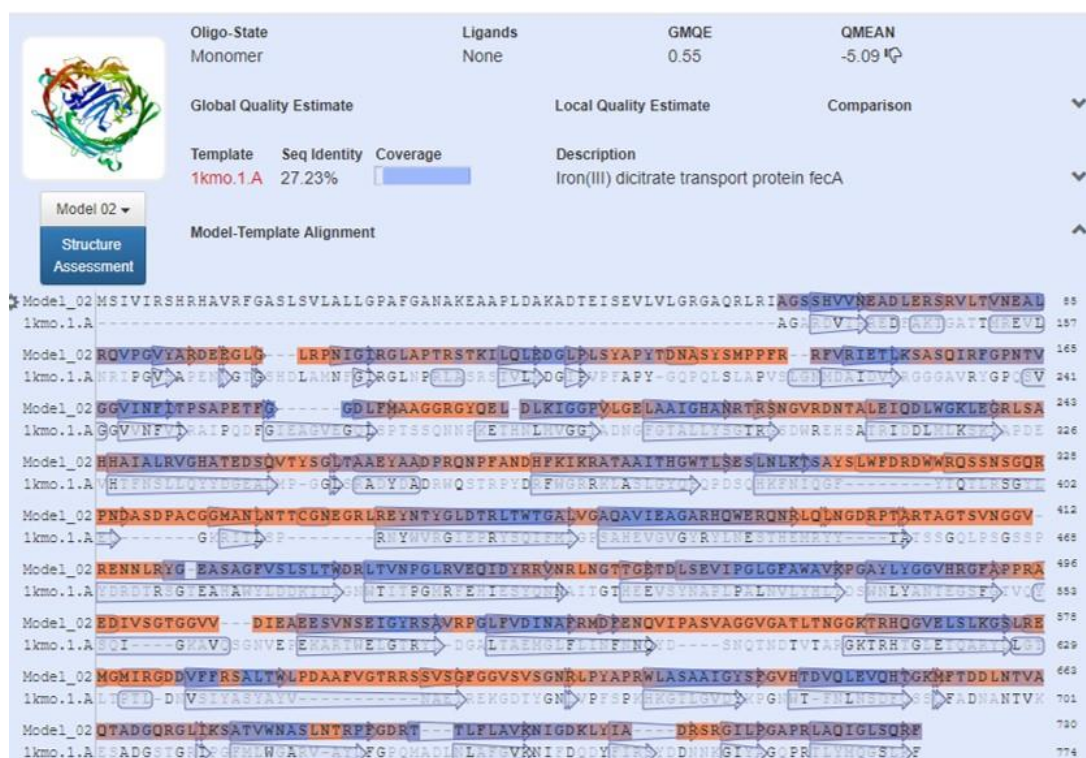




## I – Resultado da modelagem do transportador CCNA\_00028



## J – Resultado da modelagem do transportador CCNA\_00138







## M – Placa PM1 de Biolog

*PM1 MicroPlate™ Carbon Sources*

A1 Negative Control	A2 L-Arabinose	A3 N-Acetyl-D- Glucosamine	A4 D-Saccharic Acid	A5 Succinic Acid	A6 D-Galactose	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Proline	A9 D-Alanine	A10 D-Trehalose	A11 D-Mannose	A12 Dulcitol
B1 D-Serine	B2 D-Sorbitol	B3 Glycerol	B4 L-Fucose	B5 D-Glucuronic Acid	B6 D-Gluconic Acid	B7 D,L- $\alpha$ -Glycerol- Phosphate	B8 D-Xylose	B9 L-Lactic Acid	B10 Formic Acid	B11 D-Mannitol	B12 L-Glutamic Acid
C1 D-Glucose-6- Phosphate	C2 D-Galactonic Acid- $\gamma$ -Lactone	C3 D,L-Malic Acid	C4 D-Ribose	C5 Tween 20	C6 L-Rhamnose	C7 D-Fructose	C8 Acetic Acid	C9 $\alpha$ -D-Glucose	C10 Maltose	C11 D-Melibiose	C12 Thymidine
D-1 L-Asparagine	D2 D-Aspartic Acid	D3 D-Glucosaminic Acid	D4 1,2-Propanediol	D5 Tween 40	D6 $\alpha$ -Keto-Glutaric Acid	D7 $\alpha$ -Keto-Butyric Acid	D8 $\alpha$ -Methyl-D- Galactoside	D9 $\alpha$ -D-Lactose	D10 Lactulose	D11 Sucrose	D12 Uridine
E1 L-Glutamine	E2 M-Tartaric Acid	E3 D-Glucose-1- Phosphate	E4 D-Fructose-6- Phosphate	E5 Tween 80	E6 $\alpha$ -Hydroxy Glutaric Acid- $\gamma$ - Lactone	E7 $\alpha$ -Hydroxy Butyric Acid	E8 $\beta$ -Methyl-D- Glucoside	E9 Adonitol	E10 Maltotriose	E11 2-Deoxy Adenosine	E12 Adenosine
F1 Glycyl-L- Aspartic Acid	F2 Citric Acid	F3 M-Inositol	F4 D-Threonine	F5 Fumaric Acid	F6 Bromo Succinic Acid	F7 Propionic Acid	F8 Mucic Acid	F9 Glycolic Acid	F10 Glyoxylic Acid	F11 D-Cellobiose	F12 Inosine
G1 Glycyl-L- Glutamic Acid	G2 Tricarballic Acid	G3 L-Serine	G4 L-Threonine	G5 L-Alanine	G6 L-Alanyl- Glycine	G7 Acetoacetic Acid	G8 N-Acetyl- $\beta$ -D- Mannosamine	G9 Mono Methyl Succinate	G10 Methyl Pyruvate	G11 D-Malic Acid	G12 L-Malic Acid
H1 Glycyl-L- Proline	H2 p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H3 m-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H4 Tyramine	H5 D- Psicose	H6 L-Lyxose	H7 Glucuronamide	H8 Pyruvic Acid	H9 L-Galactonic Acid- $\gamma$ -Lactone	H10 D-Galacturonic Acid	H11 Phenylethyl- amine	H12 2-Aminoethanol



## N – Placa PM2A de BioLog

*PM2A MicroPlate™ Carbon Sources*

A1 Negative Control	A2 Chondroitin Sulfate C	A3 $\alpha$ -Cyclodextrin	A4 $\beta$ -Cyclodextrin	A5 $\gamma$ -Cyclodextrin	A6 Dextrin	A7 Gelatin	A8 Glycogen	A9 Inulin	A10 Laminarin	A11 Mannan	A12 Pectin
B1 N-Acetyl-D-Galactosamine	B2 N-Acetyl-Neuraminic Acid	B3 $\beta$ -D-Allose	B4 Amygdalin	B5 D-Arabinose	B6 D-Arabitol	B7 L-Arabitol	B8 Arbutin	B9 2-Deoxy-D-Ribose	B10 l-Erythritol	B11 D-Fucose	B12 3-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-D-Arabinose
C1 Gentiobiose	C2 L-Glucose	C3 Lactitol	C4 D-Melezitose	C5 Maltitol	C6 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside	C7 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C8 3-Methyl Glucose	C9 $\beta$ -Methyl-D-Glucuronic Acid	C10 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	C11 $\beta$ -Methyl-D-Xyloside	C12 Palatinose
D1 D-Raffinose	D2 Salicin	D3 Sedoheptulosa n	D4 L-Sorbose	D5 Stachyose	D6 D-Tagatose	D7 Turannose	D8 Xylitol	D9 N-Acetyl-D-Glucosaminitol	D10 $\gamma$ -Amino Butyric Acid	D11 $\delta$ -Amino Valeric Acid	D12 Butyric Acid
E1 Capric Acid	E2 Caproic Acid	E3 Citraconic Acid	E4 Citramalic Acid	E5 D-Glucosamine	E6 2-Hydroxy Benzoic Acid	E7 4-Hydroxy Benzoic Acid	E8 $\beta$ -Hydroxy Butyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid	E10 $\alpha$ -Keto Valeric Acid	E11 Itaconic Acid	E12 5-Keto-D-Gluconic Acid
F1 D-Lactic Acid Methyl Ester	F2 Malonic Acid	F3 Mellibionic Acid	F4 Oxalic Acid	F5 Oxalomalic Acid	F6 Quinic Acid	F7 D-Ribono-1,4-Lactone	F8 Sebacic Acid	F9 Sorbic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 D-Tartaric Acid	F12 L-Tartaric Acid
G1 Acetamide	G2 L-Alaninamide	G3 N-Acetyl-L-Glutamic Acid	G4 L-Arginine	G5 Glycine	G6 L-Histidine	G7 L-Homoserine	G8 Hydroxy-L-Proline	G9 L-isoleucine	G10 L-Leucine	G11 L-Lysine	G12 L-Methionine
H1 L-Ornithine	H2 L-Phenylalanine	H3 L-Pyroglutamic Acid	H4 L-Valine	H5 D,L-Carnitine	H6 Sec-Butylamine	H7 D,L-Octopamine	H8 Putrescine	H9 Dihydroxy Acetone	H10 2,3-Butanediol	H11 2,3-Butanone	H12 3-Hydroxy 2-Butanone

