

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

VINICIUS MARQUES DE LIMA

**Mecanismos de captação de heme em *Chromobacterium violaceum***

Ribeirão Preto, SP, Brasil

2020

VINICIUS MARQUES DE LIMA

**Mecanismos de captação de heme em *Chromobacterium violaceum***

Versão Original

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

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ribeirão Preto, SP, Brasil

2020

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

de Lima, Vinicius Marques

Mecanismos de captação heme em *Chromobacterium violaceum*. Ribeirão Preto, 2020.

78 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: da Silva Neto, José Freire.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Captação de heme. 3. Captação de ferro. 4. Fisiologia bacteriana. 5. Virulência bacteriana. 6. Genética de bactérias.

Nome: DE LIMA, Vinicius Marques

Título: Mecanismos de captação heme em *Chromobacterium violaceum*.

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

Área de Concentração: Biologia Celular e  
Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



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

CEUA  
FMRP-USP  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
Replacement/Reduction/Refinement



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Mecanismos de captação de heme em Chromobacterium violaceum*”, registrado com o número 146/2019, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Freire da Silva Neto, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 29 de julho de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 100 camundongos Balb c fêmeas pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Vigência da autorização: 29/07/2019 a 10/09/2021.

We certify that the Protocol nº 146/2019, entitled “*Mechanisms of heme uptake in Chromobacterium violaceum*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 07/29/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 100 female Balb c mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 09/10/2021.

Ribeirão Preto, 29 de julho de 2019

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales  
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP

À minha mãe Eli, quem amo incondicionalmente e sempre acreditou no meu potencial.

## **AGRADECIMENTOS PELO APOIO FINANCEIRO**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa e concessão da bolsa de mestrado (processo n° 2018/17716-2).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e concessão inicial da bolsa de mestrado.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital de Clínicas da FMRP-USP (FAEPA) pelo auxílio financeiro destinado ao Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José F. da Silva Neto pelo voto de confiança ao aceitar me orientar durante o mestrado, por todo conhecimento e ensinamentos compartilhados, por ser um exímio orientador, pela paciência e disponibilidade, e por ser um profissional que muito me inspira e causa admiração.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos e ao Programa de Biologia Celular e Molecular pela infraestrutura fornecida para realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Dario S. Zamboni, Dra. Larissa D. da Cunha, Dr. Luiz R. O. Tosi, Dra. Maria C. R. A. Barreira e Dr. Paulo S. R. Coelho por disponibilizarem o espaço físico, equipamentos e/ou reagentes de seus laboratórios.

À minha colaboradora Me. Bianca B. Batista, pela ajuda na maioria dos experimentos realizados, por ser uma cientista maravilhosa que me inspira, por todos os anos de nossa amizade e companheirismo, por estar presente em todos os bons e maus momentos.

À minha amiga de laboratório Dr. Maristela Previato-Mello pela ajuda prestada nos ensaios de purificação de proteínas e de carga bacteriana em órgãos, pelas conversas prazerosas que temos no laboratório e por me auxiliar sempre que precisei de ajuda.

Aos demais colegas do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana; à técnica Cláudia, por todo suporte fornecido ao laboratório; à secretária Gabriela, por toda ajuda e esclarecimentos prestados sobre minhas dúvidas.

Aos meus pais, Eli e Moacir, por todo amor e suporte que me deram ao longo de todos esses anos, pelas oportunidades que me proporcionaram de ser uma pessoa melhor e por todo incentivo demonstrado; aos meus irmãos, Elisangela, Ewerton e Karina por todos os momentos de amor e amizade fraternais que passamos juntos.



## RESUMO

de Lima, VM. Mecanismos de captação de heme em *Chromobacterium violaceum*. 2020. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O ferro é um metal essencial em diversos processos celulares, como respiração e regulação gênica, atuando como cofator de diferentes proteínas bacterianas. Uma importante fonte de ferro no hospedeiro é encontrada no grupo heme de hemoproteínas como a hemoglobina. Desta forma, bactérias evoluíram mecanismos eficazes para aquisição de ferro, como a síntese de pequenas moléculas quelantes conhecidas como sideróforos e a expressão de transportadores especializados na captação de sideróforos e hemoproteínas. Neste trabalho, os mecanismos de captação de heme foram caracterizados em *Chromobacterium violaceum*, uma beta-proteobactéria Gram-negativa oportunista que ocasionalmente causa severas infecções em humanos. Análises *in silico* no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 revelaram os genes CV\_3895-96-97-RS19290-CV\_3898-99, aqui nomeados *chuPRSTUV*, como candidatos a codificar uma proteína regulatória (ChuP), um receptor dependente de TonB de membrana externa (ChuR), uma enzima de degradação de heme (ChuS) e um transportador do tipo ABC de membrana interna (ChuTUV). Linhagens mutantes nulas com deleção dos genes *chuP*, *chuR*, *chuS*, *chuTUV* e *chuPRSTUV* foram obtidas; um mutante com deleção dos genes *chuPRSTUV* e dos genes de síntese de sideróforos *cbaCEBA* também foi gerado. Tanto a linhagem selvagem quanto as linhagens mutantes apresentaram alta tolerância à toxicidade do heme avaliada por viabilidade celular. Com exceção de *chuS*, todos os demais genes do operon *chuPRSTUV* se mostraram necessários para utilização de heme e hemoglobina em ensaios de estimulação. Além disso, as linhagens  $\Delta chuP$ ,  $\Delta chuPRSTUV$  e  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  apresentaram atraso de crescimento em situações de carência e/ou suficiência de ferro obtida com heme. Interessantemente, o gene *chuP* apresentou papel na atividade de sideróforos, demonstrado por ensaio de CAS com halo aumentados nos mutantes sem *chuP*. Ensaios de expressão demonstraram que o operon *chuPRSTUV* é controlado por um promotor a frente do gene *chuP* que responde à presença de ferro e heme, sendo

mais expresso em situação de limitação destas moléculas. A proteína ChuP interagiu com heme *in vitro* e sua atividade regulatória parece ser pós-transcricional, pois ChuP não mostrou atividade de ligação ao DNA. Ensaio *in vivo* em camundongos revelaram que o sistema ChuPRSTUV tem papel na virulência de *C. violaceum*, sendo observada atenuação de virulência em mutantes do operon *chu* sobretudo na ausência de sideróforos. Portanto, os dados obtidos neste trabalho revelaram que *C. violaceum* utiliza de modo hierárquico os mecanismos de captação de ferro por sideróforos e por heme para estabelecer infecção bem sucedida no hospedeiro.

**Palavras-chave:** *Chromobacterium violaceum*, captação de heme, captação de ferro, fisiologia bacteriana, virulência bacteriana, genética de bactérias.

## ABSTRACT

de Lima, VM. Mechanisms of heme uptake in *Chromobacterium violaceum*. 2020. 78 p. Dissertation – Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo.

Iron is an essential metal in several cell processes, including respiration and gene expression, acting as a cofactor of different bacterial proteins. An important iron source in the host is found into the heme group of hemoproteins like hemoglobin. Therefore, bacteria evolved efficient mechanism for iron acquisition, like the production of small chelating molecules known as siderophores and the expression of specialized transporters for the uptake of siderophores and hemoproteins. In this work, we characterized the mechanisms of heme uptake in *Chromobacterium violaceum*, an opportunistic Gram-negative beta-proteobacterium that occasionally causes severe infections in humans. *In silico* analyses in the *C. violaceum* ATCC 12472 genome revealed the genes CV\_3895-96-97-RS19290-CV\_3898-99, here named *chuPRSTUV*, as candidates for coding a regulatory protein (ChuP), an outer membrane TonB-dependent receptor (ChuR), a heme degradation enzyme (ChuS), and an inner membrane ABC-type transporter (ChuTUV). Null-mutant strains with deletion of *chuP*, *chuR*, *chuS*, *chuTUV*, and *chuPRSTUV* were obtained; a mutant strain with deletion of the *chuPRSTUV* and *cbaCEBA* genes, the latter for siderophore synthesis, was also generated. Both the wild-type and mutant strains showed high tolerance to heme toxicity assessed by cell viability. With the exception of *chuS*, all other genes in the *chuPRSTUV* operon were required for heme and hemoglobin utilization in stimulation assays. Besides, the  $\Delta chuP$ ,  $\Delta chuPRSTUV$ , and  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  strains displayed delayed growth under iron deficiency and/or heme sufficiency. Interestingly, the *chuP* gene demonstrated a role in siderophore activity, displayed by increased halos in CAS assay for the mutants without *chuP*. Expression assays demonstrated that the *chuPRSTUV* operon is controlled by a promoter in front of the *chuP* gene that responds to the presence of iron and heme, being more expressed in a situation where these molecules are limited. The ChuP protein interacted with heme *in vitro* and its regulatory activity appears to be post-transcriptional, as ChuP showed no DNA-binding activity. *In vivo* assays with mice revealed that the ChuPRSTUV system plays a role in the *C. violaceum* virulence, with attenuation of virulence

observed in mutants of the *chu* operon mainly in the absence of siderophores. Therefore, the data obtained in this work revealed that *C. violaceum* uses hierarchically the mechanisms of iron uptake by siderophores and by heme to establish a successful infection in the host.

**Keywords:** *Chromobacterium violaceum*, iron uptake, heme uptake, bacterial physiology, bacterial virulence, bacterial genetics.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Linhagens bacterianas e plasmídeos.....	27
<b>Tabela 2:</b> Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A batalha por ferro entre hospedeiros e patógenos. ....	19
<b>Figura 2:</b> Sistemas de captação de ferro em bactérias. ....	22
<b>Figura 3:</b> O patógeno oportunista <i>Chromobacterium violaceum</i> e sua interação com o sistema imune.....	25
<b>Figura 4:</b> Esquema da estratégia utilizada para obtenção das linhagens mutantes	34
<b>Figura 5:</b> Organização em operon dos genes <i>chuPRSTUV</i> .....	43
<b>Figura 6:</b> Confirmação das linhagens mutantes dos genes do operon <i>chuPRSTUV</i> .....	44
<b>Figura 7:</b> Confirmação das linhagens complementadas de mutantes do operon <i>chuPRSTUV</i> .. ..	45
<b>Figura 8:</b> Padronização de situações de carência de ferro por concentração inibitória mínima de DP .....	46
<b>Figura 9:</b> Análise do efeito citotóxico de Hm por viabilidade celular.....	47
<b>Figura 10:</b> Ensaio de estimulação para avaliar a utilização de heme via operon <i>chuPRSTUV</i> nas linhagens selvagem e mutantes de <i>C. violaceum</i> .....	48
<b>Figura 11:</b> Ensaio de estimulação para avaliar a utilização de heme via operon <i>chuPRSTUV</i> nas linhagens complementadas de <i>C. violaceum</i> .....	49
<b>Figura 12:</b> Curvas de crescimento em meio mínimo e com suplementação de heme .....	50
<b>Figura 13:</b> Curvas de crescimento da linhagem selvagem em condições de carência de ferro e suficiência de heme.....	51
<b>Figura 14:</b> Curvas de crescimento das linhagens em condições de carência de ferro.. ..	52
<b>Figura 15:</b> Curvas de crescimento das linhagens em condições de carência de ferro e suficiência de heme .....	54
<b>Figura 16:</b> Atividade hemolítica das linhagens selvagem e mutantes do operon <i>chuPRSTUV</i> de <i>C. violaceum</i> .....	56
<b>Figura 17:</b> Ensaio de CAS para avaliar atividade de sideróforos nas linhagens selvagem, mutantes e complementadas de <i>C. violaceum</i> .. ..	57
<b>Figura 18:</b> Ensaio de viabilidade das linhagens de <i>C. violaceum</i> em LB (suficiência de ferro) .....	58

<b>Figura 19:</b> Ensaio de sobrevivência animal após infecção com linhagens de <i>C. violaceum</i> .....	60
<b>Figura 20:</b> Ensaio de carga bacteriana em órgãos de animais infectados por <i>C. violaceum</i> .....	60
<b>Figura 21:</b> Análise da indução e purificação das proteínas ChuP e ChuS recombinantes por SDS-PAGE .....	61
<b>Figura 22:</b> Ensaio de afinidade da proteína ChuP a heme.....	62
<b>Figura 23:</b> Ensaio de EMSA para avaliar interação de ChuP com promotores de genes <i>chu</i> .....	63
<b>Figura 24:</b> Análise do papel regulatório de ChuP em promotores de genes de captação de heme e síntese de sideróforos.....	64

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1. Mecanismos de homeostase de ferro em bactérias.....	18
1.2. Homeostase de ferro em humanos e na interação patógeno-hospedeiro .....	18
1.3. O heme como cofator e uma fonte de ferro para bactérias no hospedeiro.....	20
1.4. Estratégias de captação de heme e sua regulação em bactérias.....	21
1.5. Mecanismos de degradação de heme .....	23
1.6. <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	24
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Linhagens e Plasmídeos .....	27
3.2. Condições de cultivo .....	29
3.3. Análises <i>in silico</i> .....	29
3.4. Procedimentos gerais de clonagem .....	29
3.4.1. Reações de PCR e eletroforese em gel de agarose.....	29
3.4.2. Digestão de DNA com enzimas de restrição .....	30
3.4.3. Ligaçãõ de DNA e transformação bacteriana por eletroporaçãõ.....	30
3.4.4. Sequenciamento de DNA.....	31
3.5. Construçãõ das linhagens mutantes por troca alélica.....	33
3.6. Construçãõ das linhagens complementadas .....	34
3.7. Construçãõ das linhagens para expressãõ heteróloga de proteínas.....	35
3.8. Construçãõ das linhagens de fusãõ transcricional ao gene <i>lacZ</i> .....	35
3.9. Caracterizaçãõ fenotípica do sistema de captaçãõ de heme em <i>C. violaceum</i> .....	36
3.9.1. Determinaçãõ da concentraçãõ inibitória mínima de dipiridil.....	36
3.9.2. Avaliaçãõ da citotoxicidade da hemina .....	36
3.9.3. Ensaio de estimulaçãõ do crescimento bacteriano.....	36
3.9.4. Curvas de crescimento bacteriano.....	37
3.9.5. Hemólise em ágar sangue .....	37
3.9.6. Ensaio de CAS.....	37
3.10. Papel da captaçãõ de heme na patogênese de <i>C. violaceum</i> .....	37
3.10.1. Viabilidade celular das linhagens de <i>C. violaceum</i> .....	37
3.10.2. Ensaio de virulência.....	38



3.10.3. Ensaio da carga bacteriana em órgãos .....	38
3.11. Caracterização das proteínas ChuP e ChuS de <i>C. violaceum</i> .....	39
3.11.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes .....	39
3.11.2. Ensaio de afinidade a heme.....	40
3.12. Co-transcrição e regulação da expressão do operon <i>chuPRSTUV</i> .....	41
3.12.1. Extração de RNA e RT-PCR.....	41
3.12.2. Ensaio de $\beta$ -galactosidase .....	41
3.12.3. Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA).....	42
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1. Identificação e análise do operon <i>chuPRSTUV</i> e obtenção de linhagens mutantes e complementadas de genes deste operon em <i>C. violaceum</i> .....	43
4.2. Determinação das situações de carência de ferro e de suficiência de heme .	46
4.3. Papel do operon <i>chuPRSTUV</i> na captação heme em <i>C. violaceum</i> .....	47
4.4. Papel do operon <i>chuPRSTUV</i> nas atividades hemolítica e de sideróforos em <i>C.</i> <i>violaceum</i> .....	55
4.5. Papel do operon de utilização de heme <i>chuPRSTUV</i> na virulência de <i>C.</i> <i>violaceum</i> .....	58
4.6. Caracterização das proteínas ChuP e ChuS de <i>C. violaceum</i> .....	61
4.7. Análise do papel regulatório de ChuP em <i>C. violaceum</i> .....	62
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Mecanismos de homeostase de ferro em bactérias

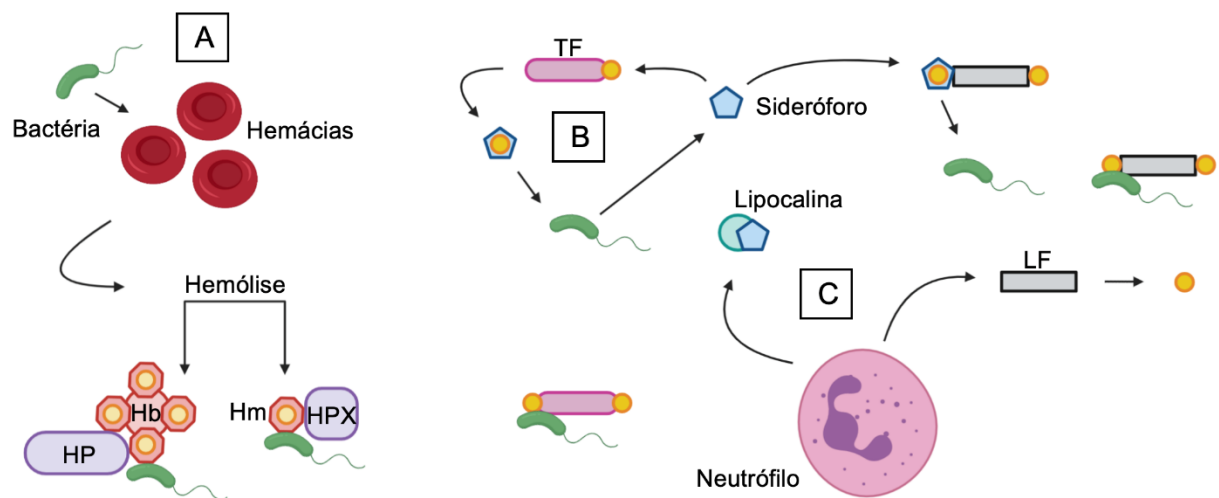
O ferro é um micronutriente necessário a quase todos os organismos, pois atua como cofator de muitas enzimas, seja de modo direto, seja como *cluster* ferro-enxofre [Fe-S] ou na forma de grupo heme. Enzimas contendo ferro estão envolvidas em diferentes processos celulares, como a respiração e a regulação gênica (BRAUN e HANTKE, 2011; HOOD e SKAAR, 2012; PALMER e SKAAR, 2016). A capacidade do ferro variar entre os estados ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), solúvel e reativo, e férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), insolúvel em ambientes aeróbicos, confere-lhe suas propriedades catalíticas e sua toxicidade (geração de espécies reativas de oxigênio) (IMLAY, 2013), além de impor desafios para sua captação (BRAUN e HANTKE, 2011; WANDERSMAN e DELEPELAIRE, 2012; HUANG e WILKS, 2017).

Desta forma, as bactérias possuem mecanismos para manter a homeostase do ferro, controlando sua captação, estocagem e incorporação em enzimas (BRAUN e HANTKE, 2011; PALMER e SKAAR, 2016). Muito deste controle é exercido por Fur, uma proteína repressora dimérica da família de metaloreguladores, que usando  $\text{Fe}^{2+}$  como cofator liga-se em regiões do DNA denominadas *Fur box*, reprimindo a expressão de genes envolvidos na captação de ferro. A diminuição dos níveis de ferro causa a dissociação do repressor do DNA e a transcrição dos genes por ele regulados (OCHSNER *et al.*, 2000; MEY *et al.*, 2005; DA SILVA NETO *et al.*, 2013; SHELDON *et al.*, 2016; SARVAN *et al.*, 2018). Dentre os genes mais comumente regulados por Fur estão aqueles envolvidos em síntese e captação de sideróforos e os sistemas de captação e degradação de heme, garantindo que estas complexas maquinarias sejam expressas apenas em limitação de ferro (RATLIFF *et al.*, 2001; MEY *et al.*, 2005; RUNYEN-JANECKY, 2013; SARVAN *et al.*, 2018).

### 1.2. Homeostase de ferro em humanos e na interação patógeno-hospedeiro

Em humanos a maior parte do ferro é encontrado no heme da hemoglobina intracelular das hemácias (um pouco também em mioglobina), estando o restante presente em macrófagos esplênicos (degradação das hemácias), sequestrado em proteínas circulantes como transferrina e lactoferrina, ou armazenado em ferritinas nos hepatócitos do fígado (CASSAT e SKAAR, 2013; PARROW *et al.*, 2013). Os níveis plasmáticos de ferro são regulados pelo hormônio hepcidina produzido nos

hepatócitos (ROSSI, 2005). Quando produzida, a hepcidina bloqueia a captação de ferro nos enterócitos do duodeno e o fluxo de ferro dos estoques intracelulares para o plasma por se ligar e internalizar para degradação os transportadores ferroportina, que exportam ferro das células para o plasma (PARROW *et al*, 2013; GANZ e NEMETH, 2015). Por ser essencial tanto ao hospedeiro quanto ao patógeno, o ferro está no centro de uma batalha evolutiva (Figura 1) (SKAAR, 2010; SHELDON *et al.*, 2016). Se por um lado o hospedeiro evoluiu mecanismos de defesa que limitam a disponibilidade de ferro ao patógeno durante a infecção, a chamada imunidade nutricional, por outro as bactérias possuem mecanismos eficazes para captação do ferro de seus hospedeiros (CASSAT e SKAAR, 2013; RUNYEN-JANECKY, 2013; SOARES e WEISS, 2015; PALMER e SKAAR, 2016; HUANG e WILKS, 2017).



**Figura 1: A batalha por ferro entre hospedeiros e patógenos.** O esquema demonstra os mecanismos de competição pelo ferro durante a infecção. **A.** A ação de hemolisinas causa liberação de hemoglobina e heme das hemácias. As proteínas haptoglobina e hemopexina se ligam a estas moléculas, respectivamente, para limitar o ferro circulante e os efeitos tóxicos. Porém, os sistemas de captação de heme das bactérias apresentam maior afinidade a estas moléculas, sequestrando-as. **B.** Os sideróforos produzidos pelas bactérias são capazes de sequestrar o  $Fe^{3+}$  transportado por transferrina e lactoferrina. **C.** As células do sistema imune inibem a atuação dos sideróforos ao secretarem lipocalina 2. Em mucosas, os sistemas de captação a partir da lactoferrina sequestram o ferro destas moléculas. **HP.** Haptoglobina. **Hb.** Hemoglobina. **Hm.** Heme. **HPX.** Hemopexina. **TF.** Transferrina. **LF.** Lactoferrina. (Adaptado de SHELDON *et al.*, 2016).

São vários os mecanismos que ocorrem nesta batalha pelo ferro. Por exemplo, durante uma infecção bacteriana a produção de hepcidina é aumentada para limitar a quantidade de ferro circulante (ARMITAGE *et al.*, 2011) e os neutrófilos e macrófagos secretam lactoferrina (sequestro de ferro) e siderocalina (lipocalina 2) (inativação de sideróforos) nos sítios de infecção (CASSAT e SKAAR, 2013). Entretanto, diversos

patógenos subvertem estes mecanismos produzindo moléculas quelantes de ferro secretadas (sideróforos e hemóforos) e captando, via receptores, estes complexos ou o ferro direto de proteínas do hospedeiro, como transferrina, lactoferrina e hemoproteínas (Figura 1) (HOOD e SKAAR, 2012; CASSAT e SKAAR, 2013).

### **1.3. O heme como cofator e uma fonte de ferro para bactérias no hospedeiro**

O heme é um anel heterocíclico de porfirina (tetrapirrol) que coordena no centro um átomo de ferro em sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sendo o composto que contém a forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) denominado hemina (CHOBY e SKAAR, 2016). O ferro coordenado pelo heme gera um centro redox ativo que confere a este grupo prostético, quando ligado a hemoproteínas, a capacidade de (i) transferir elétrons, em citocromos da cadeia de transporte de elétrons; (ii) transportar oxigênio, nas hemoproteínas hemoglobina e mioglobina; (iii) atuar no ciclo catalítico de enzimas, como catalases e peroxidases. Além de suas funções em hemoproteínas, o próprio heme livre tem funções de sinalização celular em plantas e mamíferos (RUNYEN-JANECKY, 2013; CHOBY e SKAAR, 2016). Assim, praticamente todos os organismos necessitam de heme, o qual é obtido através de síntese ou de captação de fontes exógenas (RUNYEN-JANECKY, 2013; CHOBY e SKAAR, 2016).

O heme é o maior reservatório de ferro de um hospedeiro mamífero (70% do ferro no corpo humano), sendo que a maior parte do heme (67%) está na hemoglobina, dentro dos eritrócitos (hemácias) (Figura 1A), realizando o transporte de oxigênio no sangue (CASSAT e SKAAR, 2013; RUNYEN-JANECKY, 2013; CHOBY e SKAAR, 2016). Devido à reatividade do heme e para evitar seu acesso aos patógenos, quando ocorre lise das hemácias a hemoglobina é sequestrada pela proteína do soro haptoglobina e reciclada em macrófagos e hepatócitos. Caso o heme seja liberado pela degradação da hemoglobina este é ligado à albumina no soro e sequestrado pela proteína hemopexina (CASSAT e SKAAR, 2013; Parrow *et al.*, 2013; SOARES e WEISS, 2015). Apesar destas estratégias de defesa, muitos patógenos bacterianos evoluíram mecanismos para captar e utilizar heme e hemoproteínas do hospedeiro como uma abundante fonte de ferro (Figura 1A) (CONTRERAS *et al.*, 2014; HUANG e WILKS, 2017), sendo que para algumas bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, o heme é até a fonte preferencial de ferro (SHELDON *et al.*, 2016).

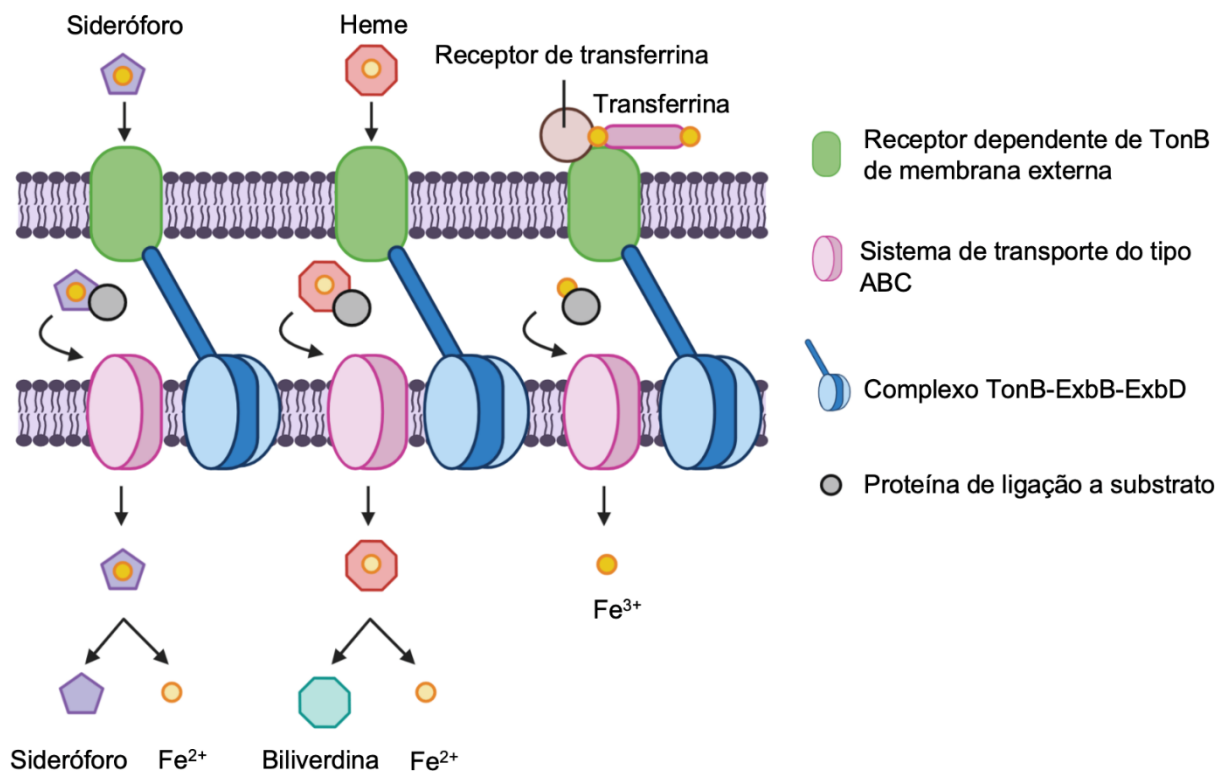
#### 1.4. Estratégias de captação de heme e sua regulação em bactérias

Além do heme (livre ou ligado a hemoproteínas), as bactérias também captam como fontes de ferro o íon ferroso livre ( $\text{Fe}^{2+}$ ), em anaerobiose via transportador FeoAB, ou o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) complexado com quelantes de baixo peso molecular secretados chamados sideróforos (WEINBERG, 2009; CONTRERAS *et al.*, 2014; SHELDON *et al.*, 2016). Os sistemas de captação de heme são de dois tipos: sistemas diretos ou sistemas dependentes de hemóforos, sendo os hemóforos pequenas proteínas secretadas ou ancoradas (exemplos HasA, HxuA) que apresentam alta afinidade pelo heme, sendo capazes de sequestrá-lo de hemoproteínas, de modo análogo ao papel dos sideróforos como quelantes do íon férrico (LÉTOFFÉ *et al.*, 1998; BENEVIDES-MATOS e BIVILLE, 2010; FOURNIER *et al.*, 2011; WANDERSMAN e DELEPELAIRE, 2012; HUANG e WILKS, 2017). O transporte tanto dos complexos ferri-sideróforos quanto de heme e hemoproteínas envolve o reconhecimento destas moléculas por receptores específicos na superfície celular, a sua passagem através da parede celular e membrana e entrega no citosol (Figura 2) (BRAUN e HANTKE, 2011; PARROW *et al.*, 2013; HUANG e WILKS, 2017).

Em bactérias Gram-negativas, os receptores que reconhecem com alta afinidade e transportam através da membrana externa heme e/ou hemoproteínas são os receptores dependentes de TonB (TonBdr), proteínas de membrana externa que consistem de 22 fitas beta em barril preenchidas parcialmente por um plugue na região N-terminal (Figura 2) (KRIEG *et al.*, 2009; NOINAJ *et al.*, 2010). Os TonBdr podem ser específicos ou não em relação à fonte de heme, podendo atuar como receptores de hemóforos (HasR), de hemoglobina (ShuA, HemR, HmbR), de complexos haptoglobina/hemoglobina (HpuB) e de hemopexina (HxuC), extraíndo heme de todas estas moléculas. O transporte do heme é então realizado pelo TonBdr utilizando a força próton-motora do complexo TonB/ExbB/ExbD (KRIEG *et al.*, 2009; NOINAJ *et al.*, 2010). Proteínas solúveis do periplasma (como HmuT, ShuT ou PhuT) podem captar e enviar o heme aos sistemas de transporte ABC (como HmuUV) para que tais permeases dependentes de ATP o transportem através da membrana interna (Figura 2) (EAKANUNKUL *et al.*, 2005; FOURNIER *et al.*, 2011; RUNYEN-JANECKY, 2013; CHOBY e SKAAR, 2016). No citosol o heme pode ser degradado, liberando o ferro.

Uma versão mais complexa dos sistemas de captação de heme envolve proteínas que fazem parte de uma cascata regulatória de transdução de sinal em

resposta a heme, sendo o sistema Has de *Serratia marcescens* o mais bem caracterizado (WANDERSMAN e DELEPELAIRE, 2012; HUANG e WILKS, 2017). Neste sistema o hemóforo HasA carregado com heme liga-se no TonBdr HasR, induzindo uma mudança de conformação no seu domínio de sinalização N-terminal, o que resulta no recrutamento do anti-sigma HasS e liberação do sigma HasI. Este fator sigma de função extracitoplasmática (ECF) associa-se ao cerne da RNA polimerase, transcrevendo o operon *has* de captação de heme (WANDERSMAN e DELEPELAIRE, 2012; HUANG e WILKS, 2017). Assim, além da regulação mais geral por Fur, os genes de captação de heme podem ser regulados por sistemas locais como os sigma ECF do tipo HasI, ou ainda fatores de transcrição locais de resposta a heme (RUNYEN-JANECKY, 2013). Pequenas proteínas da família HemP, como HmuP de *Sinorhizobium melioli* e HemP de *Burkholderia multivorans*, têm sido descritas como ativadores de operons envolvidos na captação de heme, embora elas não apresentem domínio de ligação ao DNA característico (AMARELLE *et al.*, 2010; SATO *et al.*, 2017).



**Figura 2: Sistemas de captação de ferro em bactérias.** Os principais sistemas de captação de ferro em bactérias Gram-negativas estão demonstrados. A utilização de ferro a partir de sideróforos, heme e transferrina ocorre da mesma maneira. Inicialmente, há internalização das moléculas por receptores dependentes de TonB de membrana externa e sistemas de transporte do tipo ABC, sendo o ferro separado das moléculas de sideróforo e heme no citosol. (Adaptado de HOOD e SKAAR, 2012).

### 1.5. Mecanismos de degradação de heme

O catabolismo de heme em humanos envolve diversas enzimas em diferentes órgãos, sendo fundamental para remoção da grande quantidade desta molécula liberada da hemoglobina de hemácias senescentes (CASSAT e SKAAR, 2013). Inicialmente, em macrófagos do baço, o heme é convertido em biliverdina (composto verde) pela enzima heme oxigenase (HO) e a biliverdina é transformada em bilirrubina (composto amarelo) pela enzima biliverdina redutase. A bilirrubina é então (i) transportada no sangue ligada à albumina; (ii) conjugada com ácido glucurônico no fígado; (iii) excretada na bile. Produtos finais do catabolismo da bilirrubina são então produzidos no intestino e nos rins e excretados nas fezes e na urina, dando-lhes suas colorações características (NELSON e COX, 2005). O catabolismo de heme é importante porque o heme, assim como o ferro, é citotóxico, podendo causar a formação de espécies reativas de oxigênio e danos à membrana celular devido sua reatividade e caráter lipofílico (CASSAT e SKAAR, 2013; CHOBY e SKAAR, 2016).

A etapa mais importante para reduzir a toxicidade de heme e permitir seu uso como fonte de ferro é a sua oxidação enzimática catalisada pelas enzimas heme oxigenases (HO), que resulta na quebra do anel tetrapirrol e liberação do ferro. As HOs, sendo a HO-1 de mamíferos a mais bem caracterizada, degradam heme liberando biliverdina (tetrapirrol linear), ferro ( $Fe^{2+}$ ) e monóxido de carbono (CO) em três etapas sucessivas de oxigenação, usando três moléculas de oxigênio ( $O_2$ ) e sete elétrons provindos de NADPH via NADPH-citocromo P450 redutase (WILKS e HEINZL, 2014; WILKS e IKEDA-SAITO, 2014; CHOBY e SKAAR, 2016). Também já foi demonstrado que HOs bacterianas canônicas atuam similarmente às eucarióticas, como HemO de *Neisseria meningitidis* (ZHU *et al.*, 2000) e PigA/HemO de *Pseudomonas aeruginosa* (RATLIFF *et al.*, 2001). Entretanto, mecanismos de degradação não canônicos foram descritos. Em *S. aureus*, IsdG e IsdI convertem heme a estafilobilina e formaldeído, enquanto MhuD de *Mycobacterium tuberculosis* gera micobilina, sem produção de monóxido de carbono (NAMBU *et al.*, 2012; MATSUI *et al.*, 2013). Uma via alternativa de degradação anaeróbica foi descrita em *E. coli* (LAMATTINA *et al.*, 2016). Além disso, diferentes proteínas que contêm motivo HemS, como PhuS de *P. aeruginosa* (LEE *et al.*, 2017), estão sendo descritas como capazes de realizar degradação, transferência ou estocagem de heme (SUITS *et al.*, 2005; WILKS e IKEDA-SAITO, 2014; LYLES e EICHENBAUM, 2018).

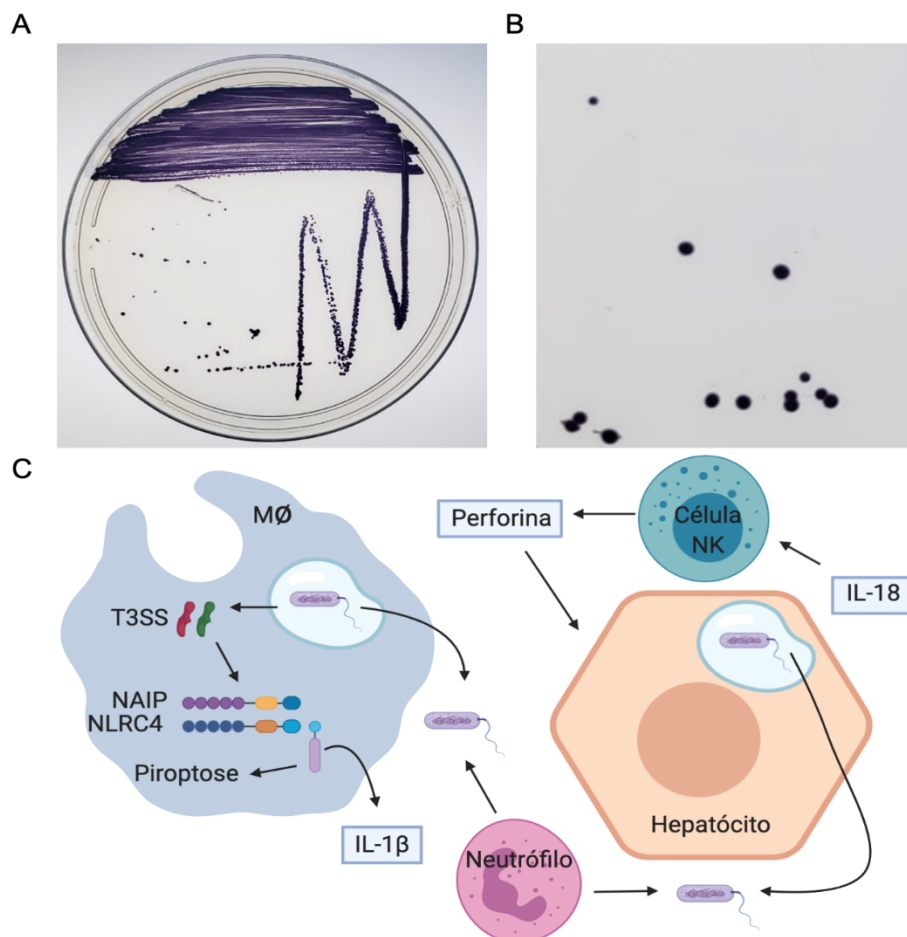
### 1.6. *Chromobacterium violaceum*

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa da família Chromobacteriaceae encontrada no solo e água de regiões tropicais e subtropicais (DURÁN e MENCK, 2001; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017). Esta beta-proteobactéria é um bacilo móvel, anaeróbio facultativo e resistente a antibióticos. Além disso, trata-se de um patógeno oportunista, com casos de infecção urinária, sepse, lesões hepáticas e cutâneas relatados (PANT e SHARMA, 2015; RICHARD *et al.*, 2015; MATSUURA *et al.*, 2017; MEHER-HOMJI *et al.*, 2017). Os principais sintomas são febre, dores abdominais e o aparecimento de erupções cutâneas (YANG e LI, 2011; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017). Dentre os vários metabólitos secundários produzidos por *C. violaceum* um dos mais estudados é o pigmento violaceína, que apresenta *in vitro* atividades antibacteriana, antiviral e antitumoral (HASHIMI *et al.*, 2015; JUSTO e DURÁN, 2017; ARULDASS *et al.*, 2018) e confere coloração roxa às colônias de *C. violaceum* (Figura 3). A violaceína é sintetizada a partir da condensação de duas moléculas de L-triptofano por enzimas codificadas pelo operon *vioABCDE* (BALIBAR e WALSH, 2006; IMMANUEL *et al.*, 2018), o qual é regulado por *quorum sensing* (MCCLEAN *et al.*, 1997). A violaceína faz parte de um arsenal de moléculas, que incluem ainda quitinases e cianeto de hidrogênio, usadas por *C. violaceum* para competir com outros organismos (BATISTA e DA SILVA NETO, 2017).

Apesar de serem raros, os casos de infecção por *C. violaceum* apresentam altas taxas de mortalidade e se iniciam pelo contato da bactéria com lesões cutâneas. A bactéria então dissemina-se para múltiplos órgãos e a infecção culmina em muitos casos em sepse fatal (YANG e LI, 2011; KUMAR, 2012; KHALIFA *et al.*, 2015). No Brasil, três casos de sepse foram relatados na Bahia e um caso de pneumonia com abscessos hepáticos em São Paulo (MARTINEZ *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2005). Outros locais onde foram relatados casos incluem Oriente Médio, Malásia, Coreia do Sul, Índia e Estados Unidos (LEE *et al.*, 1999; KHALIFA *et al.*, 2015; TIWARI *et al.*, 2017). Pouco ainda se sabe a respeito dos mecanismos de patogênese de *C. violaceum*. Um importante fator de virulência em *C. violaceum* ATCC 12472 é o sistema de secreção do tipo III (T3SS) localizado na ilha de patogenicidade Cpi1/1a, um complexo em forma de agulha que injeta efetores nas células do hospedeiro, pois mutação neste sistema causa atenuação de virulência (MIKI *et al.*, 2010). Este T3SS



ativa o inflamassoma NLRC4 no citosol de macrófagos (Figura 3C), levando ao processo de morte celular programada denominado piroptose (MIAO *et al.*, 2010). As bactérias são então ejetadas do meio intracelular e expostas ao ataque das espécies reativas de oxigênio dos neutrófilos (MALTEZ *et al.*, 2015). Este papel fundamental da resposta imune inata (macrófagos e neutrófilos) em conter a infecção por *C. violaceum* visto em camundongos parece ser um bom modelo para o que ocorre na infecção em humanos, inclusive com a preferência da bactéria em infectar hepatócitos (MIKI *et al.*, 2010; MALTEZ *et al.*, 2015). A importância da captação de ferro por sideróforos na patogênese de *C. violaceum* já foi demonstrada (BATISTA *et al.*, 2019), mas nada se sabe sobre o papel do heme na fisiologia e patogênese desta bactéria.



**Figura 3: O patógeno oportunista *Chromobacterium violaceum* e sua interação com o sistema imune. A e B.** *C. violaceum* cultivada em LB, evidenciando a produção de violaceína. **C.** Esquema da ativação do sistema imune inato após infecção por *C. violaceum*. Componentes estruturais do T3SS ativam inflamassoma do tipo NLRC4, induzindo a ativação da caspase-1 e piroptose do macrófago. As citocinas liberadas ativam células NK que lisam hepatócitos infectados. Em ambos os casos ocorre liberação de *C. violaceum* para ação de neutrófilos. (Item C, adaptado de MALTEZ *et al.*, 2015). **Mφ.** Macrófago. **NK.** Natural killer.

## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os mecanismos de captação de heme em *Chromobacterium violaceum*, além de definir o papel destes sistemas na virulência deste patógeno oportunista.

Para tal foram utilizadas as seguintes estratégias experimentais:

- Análise da capacidade de *C. violaceum* captar e utilizar diferentes fontes de heme;
- Identificação por análise *in silico* do operon *chuPRSTUV* codificando um potencial sistema de captação e degradação de heme;
- Obtenção e caracterização fenotípica de linhagens mutantes do operon *chuPRSTUV*, tanto *in vitro* em ensaios de utilização de heme, quanto *in vivo* em modelo animal de infecção;
- Caracterização dos mecanismos de regulação da expressão do operon *chuPRSTUV*, com enfoque no papel de ChuP.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens e Plasmídeos

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1. A linhagem de *C. violaceum* ATCC 12472 com genoma sequenciado (VASCONCELOS *et al.*, 2003) foi utilizada como linhagem selvagem. Já as linhagens de *E. coli* DH5 $\alpha$ , S17-1 e BL21(DE3) foram utilizadas nos processos de clonagem, conjugação e expressão de proteínas, respectivamente.

**Tabela 1: Linhagens bacterianas e plasmídeos**

<b>Linhagem</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	Clonagem e manipulação de plasmídeos. F- $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96relA1</i>	(HANAHAN, 1983)
S17-1	Conjugação de plasmídeos	(SIMON <i>et al.</i> , 1983)
BL21(DE3)	Expressão heteróloga de proteínas	Novagen
<b><i>Chromobacterium violaceum</i></b>		
ATCC 12472	Linhagem selvagem com genoma sequenciado	(VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2003)
$\Delta$ <i>chuP</i> (CV_3895)	Mutante nulo para o gene CV_3895	Este trabalho
$\Delta$ <i>chuR</i> (CV_3896)	Mutante nulo para o gene CV_3896	Este trabalho
$\Delta$ <i>chuS</i> (CV_3897)	Mutante nulo para o gene CV_3897	Este trabalho
$\Delta$ <i>chuTUV</i> (RS19290-CV_3898-99)	Mutante nulo para os genes RS19290-CV_3898-99	Este trabalho
$\Delta$ <i>chuPRSTUV</i> (CV_3895-96-97-RS19290-CV_3898-99)	Mutante nulo para os genes CV_3895-96-97-RS19290-CV_3898-99	Este trabalho
$\Delta$ <i>cbaCEBA</i> (CV_1485-84-83-82)	Mutante nulo para os genes CV_1485-84-83-82	(BATISTA <i>et al.</i> , 2019)
$\Delta$ <i>cbaCEBA</i> $\Delta$ <i>chuPRSTUV</i> (CV_1485-84-83-82/CV_3895-96-97-RS19290-CV_3898-99)	Mutante nulo para os genes CV_1485-84-83-82 e CV_3895-96-97-RS19290-CV_3898-99	Este trabalho

$\Delta chuP$ [ <i>chuP</i> ]	Mutante nulo <i>chuP</i> complementado com pMR20 <i>chuP</i>	Este trabalho
$\Delta chuR$ [ <i>chuR</i> ]	Mutante nulo <i>chuR</i> complementado com pMR20 <i>chuR</i>	Este trabalho
$\Delta chuS$ [ <i>chuS</i> ]	Mutante nulo <i>chuS</i> complementado com pMR20 <i>chuS</i>	Este trabalho
$\Delta chuTUV$ [ <i>chuTUV</i> ]	Mutante nulo <i>chuTUV</i> complementado com pMR20 <i>chuTUV</i>	Este trabalho
$\Delta chuPRSTUV$ [ <i>chuPRSTUV</i> ]	Mutante nulo <i>chuPRSTUV</i> complementado com pMR20 <i>chuPRSTUV</i>	Este trabalho
$\Delta cbaCEBA$ [ <i>cbaCEBA</i> ]	Mutante nulo <i>cbaCEBA</i> complementado com pMR20 <i>cbaCEBA</i>	(BATISTA <i>et al.</i> , 2019)
$\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$ [ <i>chuPRSTUV</i> ]	Mutante nulo <i>cbaCEBAchuPRSTUV</i> complementado com pMR20 <i>chuPRSTUV</i>	Este trabalho
WT [ <i>chuP-lacZ</i> ]	Fusão <i>chuP-lacZ</i> na linhagem WT	Este trabalho
WT [ <i>chuR-lacZ</i> ]	Fusão <i>chuR-lacZ</i> na linhagem WT	Este trabalho
$\Delta chuP$ [ <i>chuP-lacZ</i> ]	Fusão <i>chuP-lacZ</i> em $\Delta chuP$	Este trabalho
$\Delta chuP$ [ <i>chuR-lacZ</i> ]	Fusão <i>chuR-lacZ</i> em $\Delta chuP$	Este trabalho
WT [ <i>cbaF-lacZ</i> ]	Fusão <i>cbaF-lacZ</i> na linhagem WT	Bianca Batista
WT [ <i>vbaF-lacZ</i> ]	Fusão <i>vbaF-lacZ</i> na linhagem WT	Bianca Batista
$\Delta chuP$ [ <i>cbaF-lacZ</i> ]	Fusão <i>cbaF-lacZ</i> em $\Delta chuP$	Este trabalho
$\Delta chuP$ [ <i>vbaF-lacZ</i> ]	Fusão <i>vbaF-lacZ</i> em $\Delta chuP$	Este trabalho
<b>Plasmídeos</b>		
pNPTS138	Vetor suicida; replicon ColE1, <i>oriT</i> , <i>npt</i> , <i>sacB</i> (Can <sup>r</sup> )	M.R.K. Alley
pMR20	Vetor de complementação; (Tet <sup>r</sup> )	(ROBERTS <i>et al.</i> , 1996)
pGEM-T-Easy	Vetor de clonagem; (Amp <sup>r</sup> )	Promega
pRK <i>lacZ</i> 290	Vetor para fusão de transcrição ao <i>lacZ</i> ; baixo número de cópias; <i>oriV</i> (Tet <sup>r</sup> )	(GOBERT e SHAPIRO, 1992)
pET-15b	Vetor de expressão; promotor induzido por IPTG; repressor <i>lacI</i> (Amp <sup>r</sup> )	Novagen

\* Abreviaturas: Can, canamicina; Tet, tetraciclina; Amp, ampicilina; <sup>r</sup>, resistência

### 3.2. Condições de cultivo

As linhagens foram cultivadas em meio rico Luria-Bertani (LB) ou em meio mínimo M9 (AUSUBEL *et al.*, 1992) acrescido de 0,1% de hidrolisado de caseína (M9HC). Os ensaios foram realizados a partir de colônias obtidas em placa LB ou M9HC. Pré-inóculos foram realizados em meio líquido do mesmo tipo de meio e cultivados *overnight* a 37 °C sob agitação constante de 250 rpm, respeitando-se o limite de 20% de meio em relação ao volume total dos recipientes de cultivo. Quando necessário, os antibióticos canamicina (50 µg/mL), tetraciclina (12 µg/mL em meio sólido; 6 µg/mL em meio líquido) ou ampicilina (100 µg/mL) foram adicionados ao cultivo. O quelante de alta afinidade a ferro dipiridil (2,2'-Dipyridyl, Sigma) foi utilizado para obter carência de ferro. Sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) (Sigma), cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) (Sigma), hemina (Hm) (Sigma) e hemoglobina (Hb) (Sigma) foram utilizados para suplementação de ferro. Hm e Hb foram preparados em soluções de 20 mM NaOH e 100 mM NaCl, respectivamente.

### 3.3. Análises *in silico*

Para encontrar genes codificando potenciais sistemas de captação de heme no genoma completo de *C. violaceum* ATCC 12472, foram realizadas buscas com a ferramenta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A organização dos genes foi analisada nos bancos de dados KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) e NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

### 3.4. Procedimentos gerais de clonagem

#### 3.4.1. Reações de PCR e eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos dos genes de interesse para clonagem foram amplificados por PCR. A enzima de alta fidelidade Phusion DNA polimerase (Thermo Scientific) foi utilizada em reações de 50 µL finais contendo 0,5 µL de DNA molde, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 2), 0,2 nM de cada dNTP, 1X Phusion HF buffer (Thermo Scientific), 0,6 U da enzima Phusion e 3% DMSO. Os ciclos utilizados para as reações foram: desnaturação inicial a 98 °C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento à temperatura média calculada com a *melting temperature* (T<sub>m</sub>) dos oligonucleotídeos por 30 segundos, e extensão a 72 °C por tempo determinado de acordo com o tamanho dos fragmentos a serem amplificados

(30 segundo a cada 1 kb); extensão final a 72 °C por 7 minutos e, ao final, as reações mantidas a 4 °C.

Já reações para confirmação dos processos de clonagem e obtenção de sondas foram realizadas em 25 µL finais contendo 1 µL de DNA molde, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 2), 0,2 nM de cada dNTP, 1X Taq NH<sub>4</sub> ou KCl buffer (Thermo Scientific), 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Thermo Scientific) e 5% DMSO. Os ciclos utilizados para as reações foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento à temperatura média calculada com a T<sub>m</sub> dos oligonucleotídeos por 30 segundos, e extensão a 72 °C por tempo determinado de acordo com o tamanho dos fragmentos a serem amplificados (60 segundos a cada 1 kb); extensão final a 72 °C por 7 minutos e, ao final, as reações mantidas a 4 °C.

Os produtos amplificados, em ambos os casos, foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8% ou 1% em tampão 0,5 X TBE (*TBE – Tris-borate-EDTA*) e, quando necessário, recuperados do gel com o kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

#### **3.4.2. Digestão de DNA com enzimas de restrição**

Os fragmentos obtidos por PCR e plasmídeos utilizados nas clonagens foram digeridos com enzimas de restrição adequadas (Tabela 2) em tampão apropriado (Thermo Scientific) e à temperatura adequada para cada enzima por 3 horas. As reações foram purificadas com o kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up e avaliadas em gel de agarose.

#### **3.4.3. Ligação de DNA e transformação bacteriana por eletroporação**

A ligação dos insertos aos vetores previamente digeridos foi realizada em reações finais de 20 µL com 200 U da enzima T4 DNA ligase (Biolabs) em 1 X tampão de ligação, fornecido pelo fabricante, por 16 horas a 16 °C. Três microlitros das reações foram utilizados para transformar alíquotas de 40 µL de *E. coli* DH5α eletrocompetentes. A eletroporação foi feita em cubetas de 0,2 cm (Biorad) a 2500 V, 200 Ω e 25 µF. Posteriormente, as células foram recuperadas em 700 µL de LB sob agitação por 1 hora e então plaqueadas em LB suplementado com antibiótico apropriado. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

### 3.4.4. Sequenciamento de DNA

As reações foram realizadas com o kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems) de acordo com protocolo do fabricante e utilizando oligonucleotídeos apropriados (Tabela 2). Os produtos de reação foram precipitados com 62,5% isopropanol e lavados em etanol 70%. Os sequenciamentos foram realizados pelo ABI 3500XL do Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

**Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho**

Nome	Sequência 5' - 3'	Finalidade
CV3895_del1	taccggaagcttcccagctgtagtcgatgatg	Clonagem da região flangeadora do gene CV_3895 ( <i>chuP</i> ) no pNPTS138 para mutagênese (656 pb, <i>HindIII/BamHI</i> )
CV3895_del2	taccgggatccggcggtgagtgatatgtgc	
CV3895_del3	taccgggatccatcaagtaacacccgcaagcc	Clonagem da região flangeadora do gene CV_3895 ( <i>chuP</i> ) no pNPTS138 para mutagênese (599 pb, <i>BamHI/EcoRI</i> )
CV3895_del4	taccgggaattcttgacgctgccgctatccc	
CV3896_del1	taccggaagcttccctgctgtttcctgcgc	Clonagem da região flangeadora do gene CV_3896 ( <i>chuR</i> ) no pNPTS138 para mutagênese (628 pb, <i>HindIII/BamHI</i> )
CV3896_del2	taccgggatccgacctggatggtctccagcg	
CV3896_del3	taccgggatccagaccgcttgcgagac	Clonagem da região flangeadora do gene CV_3896 ( <i>chuR</i> ) no pNPTS138 para mutagênese (672 pb, <i>BamHI/EcoRI</i> )
CV3896_del4	taccgggaattctgtgcacggcttctccgtg	
CV3897_del1	taccggaagcttagtaccagaacatcgccgg	Clonagem da região flangeadora do gene CV_3897 ( <i>chuS</i> ) no pNPTS138 para mutagênese (642 pb, <i>HindIII/BamHI</i> )
CV3897_del2	taccgggatcccagctcgcattcgctgacgc	
CV3897_del3	taccgggatccgagcggcggaatgggtgaa	Clonagem da região flangeadora do gene CV_3897 ( <i>chuS</i> ) no pNPTS138 para mutagênese (632 pb, <i>BamHI/EcoRI</i> )
CV3897_del4	taccgggaattcccagcggctgaaaccgttg	
chuTUV_del1	taccggaagcttagcctgaacgacgtgcacgc	Clonagem da região flangeadora do gene CV_RS19290 ( <i>chuT</i> ) no pNPTS138 para mutagênese (634 pb, <i>HindIII/BamHI</i> )
chuTUV_del2	taccgggatcccagctcggcttcttgctgc	
chuTUV_del3	taccgggatccaagaccgtcgcccaggtgct	Clonagem da região flangeadora do gene CV_3899 ( <i>chuV</i> ) no pNPTS138 para
chuTUV_del4	taccgggaattcgcaagaatacccgctggtg	

		mutagênese (678 pb, <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI)
Operon1485_del1	cctagcaagcttcattgatggacagctacccg	Confirmação da deleção dos genes CV_1485-84-83-82 ( <i>cbaCEBA</i> ) no $\Delta$ <i>cbaCEBA</i> $\Delta$ <i>chuPRSTUV</i> (5771pb, <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI)
Operon1485_del4	ggcctagaattccagctatagaggtcggccag	
chuP_CompFw	taccggggtaccctccccttgctgtttcctgc	Clonagem do gene CV_3895 ( <i>chuP</i> ) no pMR20 para complementação (631 pb, <i>Kpn</i> I/ <i>Eco</i> RI)
chuP_CompRv	taccgggaattctgacctggatggctccagc	
chuR_CompFw	taccggggtaccagtaacacccgcaagccagc	Clonagem do gene CV_3896 ( <i>chuR</i> ) no pMR20 para complementação (2423 pb, <i>Kpn</i> I/ <i>Eco</i> RI)
chuR_CompRv	taccgggaattcaccagctcgcattcgtgac	
chuS_CompFw	taccggggtaccccaattctgatccaccggc	Clonagem do gene CV_3897 ( <i>chuS</i> ) no pMR20 para complementação (1195 pb, <i>Kpn</i> I/ <i>Eco</i> RI)
chuS_CompRv	taccgggaattccgactacgatctcggcgatg	
chuTUV_CompFw	taccggggtaccagcggcggaatgggtgaag	Clonagem dos genes RS19290-CV_3898-99 ( <i>chuTUV</i> ) no pMR20 para complementação (2633 pb, <i>Kpn</i> I/ <i>Eco</i> RI)
chuTUV_CompRv	taccgggaattcctacgcgctgaagtaaggcg	
chuP_ExpFw	taccggcatatgagcacatatcactcaccgc	Clonagem do gene CV_3895 ( <i>chuP</i> ) no pET-15b para superexpressão (174 pb, <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI)
chuP_ExpRv	taccggggatccttacttgatcagtatcagttgcc	
chuS_ExpFw	taccggcatatgagccagctatgggaccg	Clonagem do gene CV_3897 ( <i>chuS</i> ) no pET-15b para superexpressão (1035 pb, <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI)
chuS_ExpRv	taccggggatccttacttgatcagtatcagttgcc	
chuP_promotFw	taccgggaattcgcttgccgaaggtcagcg	Clonagem da região promotora do gene CV_3895 ( <i>chuP</i> ) no pRK <i>lacZ</i> 290 para ensaio de expressão gênica (564 pb, <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III)
chuP_promotRv	taccggaagcttgctgcaggcggtagatctc	
chuR_promotFw	taccgggaattctgagcacatatcactcaccg	Clonagem da região promotora do gene CV_3896 ( <i>chuR</i> ) no pRK <i>lacZ</i> 290 para ensaio de expressão gênica (439 pb, <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III)
chuR_promotRv	taccggaagctttcgccgctcggaatc	
cilA_promotFw	agctagaattcgatcactactcccggccgg	Amplificação da região promotora de <i>cilA</i> (505 pb, <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI)
cilA_promotRv	atcgtggatcccctccagttcctcttgccg	
M13_Fw	gtaaaacgacggccagt	Sequenciamento das clonagens realizadas no pNPTS138
M13_Rv	agcggataacaatttcac	
T7_promoter	taatacgactcactataggg	Sequenciamento das clonagens realizadas no pET15-b
T7_terminator	gctagttattgctcagcgg	
lacZ290up	tgacggctatcaccatca	Confirmação das clonagens realizadas no pRK <i>lacZ</i> 290

\* As regiões sublinhadas indicam os sítios das enzimas de restrição

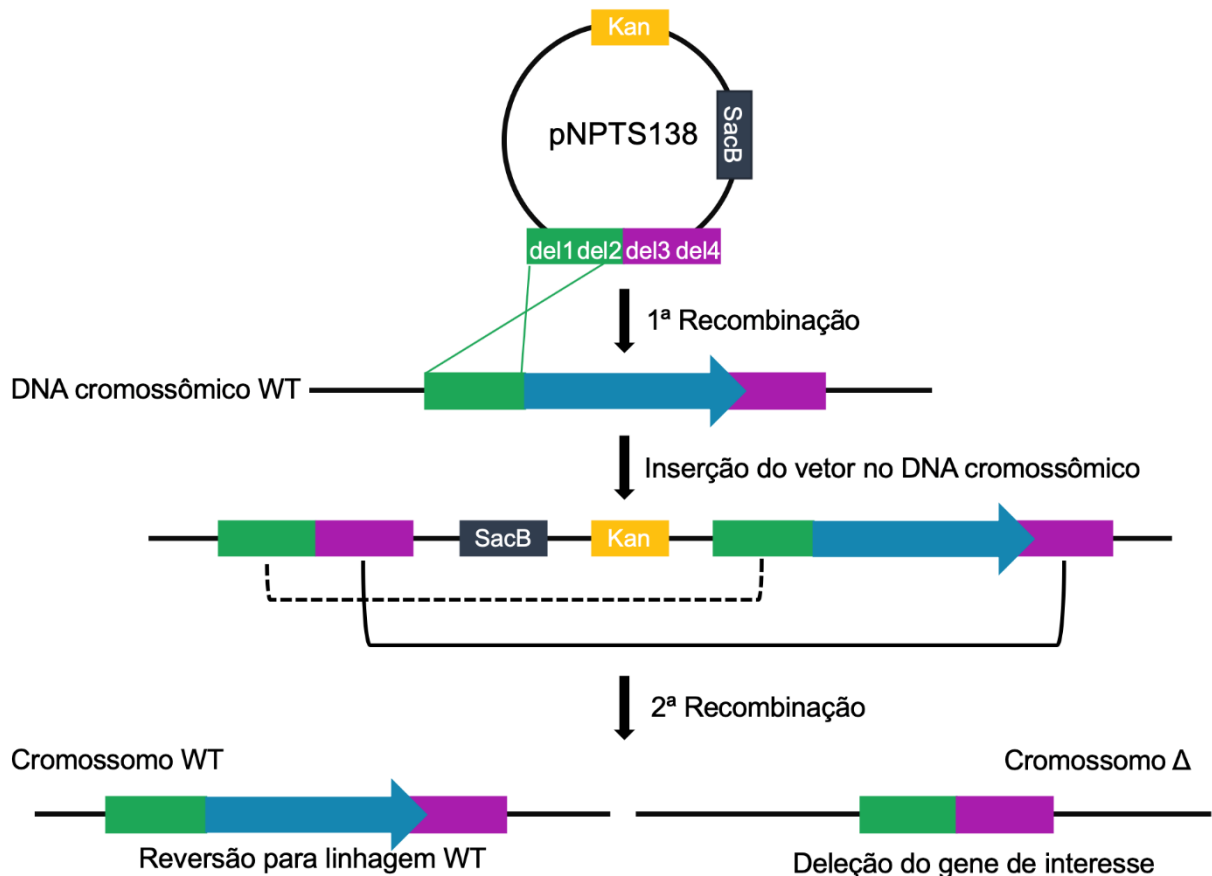


### 3.5. Construção das linhagens mutantes por troca alélica

Para obtenção das linhagens mutantes nulas em *C. violaceum* (DA SILVA NETO *et al.*, 2012), as regiões flanqueadoras aos genes de interesse *chuP*, *chuR*, *chuS*, *chuTUV* e *chuPRSTUV* foram inicialmente amplificadas com a Phusion DNA polimerase utilizando os oligonucleotídeos del1/del2 e del3/del4 (Tabela 2); para o mutante do operon foram utilizados os oligonucleotídeos del1/2 para a região flanqueadora de *chuP* e del3/del4 para a região flanqueadora de *chuTUV*. Os produtos amplificados foram digeridos com enzima de restrição interna comum, ligados pela T4 DNA ligase e uma nova PCR realizada com os oligonucleotídeos del1/del4 (Tabela 2). Os fragmentos obtidos, contendo as regiões flanqueadoras unidas, e o vetor pNPTS138 foram digeridos com as enzimas de restrição externas indicadas na Tabela 2. Em seguida, uma nova ligação foi realizada e a construção completa transformada em *E. coli* DH5 $\alpha$ . As clonagens foram confirmadas por seleção com X-gal (*X-gal* – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) (Sigma) e por PCR de colônia utilizando a Taq DNA polimerase e oligonucleotídeos del1/del4. Minipreparações do DNA plasmidial das construções foram obtidas com o kit Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) e avaliadas por sequenciamento com os oligonucleotídeos del1, del4, M13\_Fw e M13\_Rv (Tabela 2). As clonagens de outros insertos nos demais vetores seguiram basicamente estas mesmas etapas.

As construções finais no vetor pNPTS138 foram então transformadas em *E. coli* S17-1 (conforme previamente descrito para *E. coli* DH5 $\alpha$ ) e transferidas à *C. violaceum* selvagem ou  $\Delta cbaCEBA$  por conjugação. Após 24 horas, a seleção e a confirmação das colônias onde ocorreu primeira recombinação homóloga (inserção das construções no genoma) (Figura 4) foi realizada em placas suplementadas com canamicina e ampicilina, e por PCR, respectivamente. As colônias transconjugantes de *C. violaceum* foram então cultivadas em LB líquido por 48 horas a 37 °C sob agitação constante para que ocorresse o evento de segunda recombinação homóloga (Figura 4). A seleção deste evento foi feita em placas LB suplementadas com 12% de sacarose, uma vez que o vetor pNPTS138 contém o gene *sacB* e, quando presente e expresso, leva à metabolização da sacarose em um produto tóxico. As colônias resistentes à sacarose também foram avaliadas para sensibilidade à canamicina. A confirmação das linhagens mutantes foi realizada por PCR de colônia com os oligonucleotídeos del1/del4, uma vez que nas colônias sensíveis, a segunda

recombinação homóloga pode resultar em reversão ao genótipo selvagem ou na deleção no gene de interesse (Figura 4). As linhagens mutantes foram congeladas em 20% de glicerol a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados para que as deleções ocorressem *in frame* e mantivessem os genes vizinhos inalterados.



**Figura 4: Esquema da estratégia utilizada para obtenção das linhagens mutantes.** As regiões flanqueadoras do gene de interesse a ser deletado, clonadas no vetor suicida pNPTS138, permitem a inserção da construção no genoma de *C. violaceum* (mostrada apenas uma das duas possibilidades de primeira recombinação). Por eventos de segunda recombinação homóloga a deleção do gene (linha contínua) ou reversão ao genótipo selvagem (linha tracejada) pode ocorrer.

### 3.6. Construção das linhagens complementadas

Para complementação das linhagens mutantes de *C. violaceum*, fragmentos contendo a região codificadora com as regiões promotoras (*chuP* e *chuPRSTUV*) ou com cerca de 60 pb antes do ATG, nos genes sem promotor imediato *chuR*, *chuS* e *chuTUV*, foram amplificados com a enzima Phusion DNA polimerase, utilizando os oligonucleotídeos CompFW e CompRV específicos (Tabela 2); para complementação do operon completo foram utilizados os oligonucleotídeos *chuP\_CompFW* e *chuTUV\_CompRV*. Os insertos obtidos foram digeridos e clonados no vetor pMR20,

conforme confirmado por PCR. DNA plasmidial das construções foi transformado em *E. coli* S17-1 e estas foram transferidas às linhagens mutantes por conjugação. Após seleção em placas LB suplementadas com tetraciclina e ampicilina, as colônias de *C. violaceum* resistentes à tetraciclina foram confirmadas por meio de PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos Comp\_Fw e Comp\_Rv (Tabela 2). As linhagens complementadas foram congeladas em 20% de glicerol a -80 °C.

### **3.7. Construção das linhagens para expressão heteróloga de proteínas**

Para obtenção das linhagens utilizadas na expressão heteróloga das proteínas ChuP e ChuS, as regiões contendo as sequências codificadoras das proteínas de interesse foram amplificadas com a enzima Phusion DNA polimerase com oligonucleotídeos específicos (Tabela 2). Os insertos obtidos foram clonados no vetor pET-15b em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Após confirmação das clonagens por PCR e sequenciamento, as construções foram então transformadas em *E. coli* BL21(DE3), sendo as bactérias estocadas em 20% de glicerol a -80 °C.

### **3.8. Construção das linhagens de fusão transcricional ao gene *lacZ***

Para obtenção das construções de fusão de transcrição ao gene *lacZ*, inicialmente as potenciais regiões promotoras dos genes *chuP* e *chuR* foram amplificadas por PCR com oligonucleotídeos específicos para cada gene (Tabela 2). Os produtos amplificados foram diretamente ligados ao vetor pGEM-T easy conforme instruções do fabricante (Invitrogen). Após confirmação das clonagens por PCR, DNA plasmidial das colônias positivas foi extraído e digerido com as enzimas de restrição adequadas (Tabela 2). Estes insertos obtidos do pGEM-T easy foram ligados ao pRK/*lacZ*290 digerido com as mesmas enzimas. As construções finais com os promotores de *chuP* e *chuR* clonados no pRK/*lacZ*290 foram confirmadas por PCR de colônia com os oligonucleotídeos dos próprios genes ou os oligonucleotídeos M13\_Fw e lacZup (Tabela 2). Estas duas construções, assim como os promotores de *cbaF* e *vbaF* clonados no pRK/*lacZ*290 (Doutorado Bianca Batista) foram transferidas às linhagens de *C. violaceum* selvagem e  $\Delta$ *chuP* por conjugação. As linhagens resistentes à tetraciclina foram então mantidas em 20% de glicerol a -80 °C.

### **3.9. Caracterização fenotípica do sistema de captação de heme em *C. violaceum***

#### **3.9.1. Determinação da concentração inibitória mínima de dipiridil**

A concentração inibitória mínima de dipiridil (DP) para a linhagem selvagem foi anteriormente determinada em meio LB (BATISTA *et al.*, 2019), mas não em meio mínimo M9HC. Para isto, pré-inóculos em M9HC foram diluídos para DO<sub>600</sub> 0,01 em M9HC com concentrações de DP variando de 100 µM a 175 µM. Os inóculos foram então cultivados por 24 horas a 37 °C em agitação de 250 rpm. As culturas foram fotografadas e a concentração inibitória mínima de DP (carência de ferro) foi determinada com base na turbidez das culturas.

#### **3.9.2. Avaliação da citotoxicidade da hemina**

Pelo fato de heme ser uma molécula capaz de causar efeitos tóxicos às células, o efeito de diferentes concentrações de hemina sobre a viabilidade celular das linhagens de *C. violaceum* selvagem e mutantes foi avaliado. Os pré-inóculos das diferentes linhagens foram diluídos para DO<sub>600</sub> 0,01 em M9HC acrescido de concentrações variáveis de 30 µM a 2 mM de hemina (Hm). As culturas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em 250 rpm de agitação, diluídas 1:10 até 10<sup>-7</sup> em PBS (*PBS – phosphate buffer saline*) estéril em 100 µL finais e, posteriormente, 10 µL de cada diluição foram plaqueados em M9HC. Após incubação por 24 horas a 37 °C, as placas foram fotografadas e a viabilidade celular determinada.

#### **3.9.3. Ensaio de estimulação do crescimento bacteriano**

Ensaio de estimulação em placa foram realizados para verificar a capacidade de diferentes fontes de ferro estimularem crescimento das linhagens de *C. violaceum* (adaptado de BALHESTEROS *et al.*, 2019). Inicialmente, pré-inóculos em M9HC foram diluídos em M9HC para DO<sub>600</sub> 1,0. Então, 25 µL foram inoculados em 25 mL de meio M9HC 0,8% ágar (quelado para ferro com 50 µM, 100 µM ou 150 µM de DP) para obter uma relação 0,001% (v/v) de bactéria/meio. Filtros de papel foram adicionados às placas e 10 µL das soluções de 1 mM FeSO<sub>4</sub>, 1 mM FeCl<sub>3</sub>, 100 µM Hm, 20 mM NaOH, 150 µM hemoglobina (Hb) e 100 mM NaCl pipetados sobre estes. As placas foram incubadas a 37 °C, fotografadas e as áreas de estímulo quantificadas com o software ImageJ (NIH).

### 3.9.4. Curvas de crescimento bacteriano

Para análise do crescimento bacteriano em diferentes condições ao longo do tempo, as linhagens pré-cultivadas em M9HC foram diluídas para  $DO_{600}$  0,02 em M9HC. Então, uma nova diluição 1:2 em 200  $\mu$ L finais foi realizada em placa de 96 poços com os cultivos diluídos e diferentes soluções (M9HC ou M9HC com 60  $\mu$ M Hm, 200  $\mu$ M DP, 250  $\mu$ M DP, 60  $\mu$ M Hm e 200  $\mu$ M DP, 60  $\mu$ M Hm e 250  $\mu$ M DP) para obter  $DO_{600}$  0,01 e compostos nas concentrações desejadas (100  $\mu$ M DP, 125  $\mu$ M DP e/ou 30  $\mu$ M Hm). As placas foram vedadas e incubadas a 37 °C sob agitação orbital moderada e constante no SpectraMax i3 MiniMax Imaging Cytometer (Molecular Devices). As leituras de  $DO_{600}$  foram obtidas em intervalos de 15 minutos por 24 horas.

### 3.9.5. Hemólise em ágar sangue

A atividade hemolítica de *C. violaceum* foi avaliada em placas com 5% sangue de carneiro (v/v) em ágar Mueller-Hinton (Labclin). Nestas, a produção de compostos hemolíticos pelas bactérias causa o rompimento das hemácias e formação de halos com coloração mais clara em relação ao meio. Para isto, 5  $\mu$ L dos pré-inóculos em M9HC foram pipetados em placas de ágar sangue. As placas foram incubadas por 7 dias a 37 °C, fotografadas e as áreas de hemólise quantificadas com o software ImageJ.

### 3.9.6. Ensaio de CAS

A análise da atividade de sideróforos nas diferentes linhagens foi realizada utilizando o ensaio Cromo Azurol S (ensaio de CAS) (BATISTA *et al.*, 2019). Neste ensaio, a detecção da presença de sideróforos é feita pela alteração da cor do meio. A cor azul das placas resulta do complexo formado por Cromo Azurol S (Sigma),  $FeCl_3$  e HDTMA (*HDTMA - Hexadecyltrimethylammonium bromide*) (Sigma). Caso haja atividade de sideróforos, o ferro do complexo é sequestrado e a cor do meio se altera para laranja. Para isto, 10  $\mu$ L de pré-inóculos em M9HC foram plaqueados em meio CAS. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, fotografadas e as áreas de atividade quantificadas com o software ImageJ.

## 3.10. Papel da captação de heme na patogênese de *C. violaceum*

### 3.10.1. Viabilidade celular das linhagens de *C. violaceum*

Para avaliar a viabilidade celular das linhagens, pré-inóculos foram diluídos em 5 mL de LB para  $DO_{600}$  0,01 em tubo Falcon e então cultivados por 20 horas a 37 °C

sob agitação de 250 rpm. Alíquotas de 1,65 mL dos cultivos foram centrifugadas a 14000 x g por 3 minutos, sendo o pellet ressuspendido em 1 mL de PBS estéril para obter  $10^{10}$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL) para *C. violaceum* selvagem. A partir disto, foram realizadas diluições seriadas 1:10 em PBS até  $10^{-7}$  em 1 mL final e 100  $\mu$ L desta diluição espalhados em placas LB. Após incubação a 37 °C por 24 horas, as colônias foram quantificadas e a UFC/mL calculada.

$$\text{UFC/mL} = n^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{diluição}^{-1} \times \text{volume plaqueado}^{-1} \text{ (mL)}$$

### 3.10.2. Ensaio de virulência

O papel da captação de heme na patogênese de *C. violaceum* foi avaliado por meio de ensaios de virulência *in vivo* em camundongos (MIKI *et al.*, 2010). As linhagens foram cultivadas e diluídas, conforme descrito acima para a viabilidade celular, para infecção de camundongos Balb/c fêmeas com 6 semanas. Os camundongos foram infectados utilizando 100  $\mu$ L da diluição  $10^{-3}$  (aproximadamente  $10^6$  células bacterianas) injetados por via intraperitoneal. Foram plaqueados 100  $\mu$ L da diluição  $10^{-7}$  (aproximadamente 100 células bacterianas) em LB para confirmação da UFC injetada. Os animais infectados foram então monitorados por uma semana para avaliar a sobrevivência dos mesmos. Os ensaios utilizando animais foram realizados no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP, segundo Protocolo de Ética Animal (n° 146/2019) aprovado pela CEUA da FMRP-USP.

### 3.10.3. Ensaio da carga bacteriana em órgãos

A carga bacteriana das linhagens de *C. violaceum* no fígado e no baço dos camundongos foi avaliada conforme descrito por Miki e colaboradores (2010). As linhagens foram cultivadas e diluídas, e os animais infectados conforme descrito acima para o ensaio de virulência. Após 20 horas de infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos coletados assepticamente em tubos (10 mL com fundo em “U”) contendo PBS estéril (5 mL para fígado; 2 mL para baço). Os órgãos foram pesados, homogeneizados e diluições seriadas 1:10 até  $10^{-4}$  em 100  $\mu$ L finais foram realizadas em placa de 96 poços. Então, 10  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueados em LB e as placas incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias obtidas foram quantificadas e a UFC/g calculada.

$$\text{UFC/g} = \text{n}^\circ \text{ de colônias} \times \text{diluição}^{-1} \times \text{peso do órgão}^{-1} \text{ (g)}$$

### 3.11. Caracterização das proteínas ChuP e ChuS de *C. violaceum*

#### 3.11.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes

A expressão das proteínas recombinantes His-ChuP e His-ChuS (cauda de histidina N-terminal para purificação) foi realizada utilizando as linhagens de *E. coli* BL21(DE3) contendo o pET-15b com as regiões codificadoras dos genes *chuP* e *chuS*, respectivamente. Inicialmente, os pré-inóculos das linhagens foram diluídos para DO<sub>600</sub> 0,05 em 500 mL de LB suplementado com ampicilina. As culturas foram então cultivadas a 37 °C sob agitação de 250 rpm até ser atingida DO<sub>600</sub> 0,4 – 0,6. Posteriormente, IPTG (*IPTG – Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) foi adicionado aos cultivos (1 mM para His-ChuP; 0,5 mM para His-ChuS) e estes induzidos (37 °C sob 250 rpm por 2 horas para His-ChuP; 20 °C sob 60 rpm por 24 horas para His-ChuP) (CUSSIOL *et al.*, 2010). Após indução, as culturas foram centrifugadas a 14000 x g por 5 minutos a 4 °C e os *pellets* obtidos foram ressuspensos em água Milli-Q, centrifugados e armazenados a -20 °C. Para avaliar a qualidade das induções, 1 mL das culturas foi coletado antes da adição de IPTG e após indução, centrifugado a 12000 x g por 5 minutos e os *pellets* ressuspensos em tampão 2X SDS gel loading [100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 10% glicerol, 0,1 % azul de bromofenol e 100 mM DTT] (*SDS - sodium dodecyl sulfate; DTT-dithiothreitol*). Tais alíquotas foram utilizadas para SDS-PAGE (*SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) (18% para His-ChuP; 15% para His-ChuS) em conjunto com as alíquotas coletadas durante a purificação abaixo descrita.

Para purificação das proteínas recombinantes, os *pellets* armazenados foram inicialmente ressuspensos em 20 mL de tampão de lise [50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,4), 300 mM NaCl, 50 mM imidazol e 1 mM PMSF] (*PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride*). As amostras ressuspensas foram sonicadas (10 pulsos de 20 segundos com amplitude de 75% e intervalos de 59 segundos) enquanto mantidas em gelo e, posteriormente, tratadas com 1% de estreptomicina a 4 °C por 20 minutos sob agitação. As soluções resultantes foram centrifugadas a 15000 x g por 30 minutos a 4 °C e os sobrenadantes filtrados em membranas de 0,45 μm (Millipore). O extrato solúvel resultante foi então utilizado para purificação das proteínas recombinantes com causa de histidina em coluna de níquel Ni-NTA Superflow (5 mL)

(Qiagen), com bomba peristáltica P1 (GE Healthscience), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Inicialmente, a coluna foi carregada com 2 volumes de solução 100 mM NiSO<sub>4</sub> e equilibrada com 10 volumes do tampão de ligação [50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,4), 300 mM NaCl e 50 mM imidazol]. O extrato solúvel foi aplicado à coluna carregada e equilibrada e, em seguida, foram adicionados 10 volumes de tampão de lavagem [50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,4), 300 mM NaCl e 100 mM imidazol]. Para eluição das proteínas de interesse, 2 volumes de tampão de eluição [50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,4), 300 mM NaCl e 500 mM imidazol] foram utilizados e alíquotas de 1 mL foram coletadas.

A presença das proteínas nas alíquotas coletadas foi avaliada por ensaio de Bradford (Quick Start Bradford 1X Dye – Biorad). As cinco alíquotas com melhor resultado de Bradford foram selecionadas e concentradas em colunas VivaSpin 6 (Sartorius) para 2,5 mL. Posteriormente, as amostras foram dessalinizadas em colunas de filtração em gel PD-10 (GE Healthcare). Foram utilizados os protocolos fornecidos pelos fabricantes de ambas as colunas. Então, as proteínas purificadas foram armazenadas a 4 °C em tampão de estocagem (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 600 mM NaCl, 20% glicerol, pH 8,0) (PURI e O'BRIAN, 2006). A determinação da concentração final de His-ChuP e His-ChuS foi realizada utilizando DO<sub>280</sub> e o coeficiente de extinção de cada proteína recombinante, segundo o programa Protparam Tool (Expasy) (<https://web.expasy.org/protparam/>).

$$[\text{Proteína}] \text{ (M)} = \text{DO}_{280} \times \text{diluição} \times \text{coeficiente de extinção}^{-1}$$

### 3.11.2. Ensaio de afinidade a heme

A capacidade de interação da proteína ChuP com Hm foi avaliada por espectrofotometria (PURI e O'BRIAN, 2006; AMARELLE *et al.*, 2016). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços em volumes finais de 100 µL. Para isto, alíquotas de Hm foram adicionados aos poços contendo a proteína ChuP em tampão de ensaio (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 8,0) para obter diferentes concentrações de Hm (0 a 50 µM) e 10 µM de ChuP. Para os poços de referência, Hm foi adicionado somente ao tampão de interação. Imediatamente após a adição de Hm, as placas foram mantidas a 25 °C por 5 minutos e posteriormente as DOs coletadas. A leitura das DOs foi realizada no SpectraMax i3 MiniMax Imaging Cytometer, entre



os comprimentos de onda de 300 a 600 nm, em intervalos de 5 nm a 25 °C. Um aumento na DO<sub>413</sub> se refere à interação específica entre a proteína e Hm.

### **3.12. Co-transcrição e regulação da expressão do operon *chuPRSTUV***

#### **3.12.1. Extração de RNA e RT-PCR**

O RNA total da linhagem selvagem de *C. violaceum* foi extraído para ensaio de RT-PCR. Inicialmente, o pré-inóculo foi diluído para DO<sub>600</sub> 0,01 em M9HC e a cultura incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm até DO<sub>600</sub> entre 1 e 1,2. Após crescimento, 1,5 mL de cultura foram coletados e uma centrifugação a 20000 x g por 2 minutos realizada. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 500 µL de Trizol (Invitrogen) e o tubo incubado a 65 °C por 10 minutos, sendo homogeneizado por inversão a cada 5 minutos. Após incubação, 100 µL de clorofórmio foram adicionados, a mistura foi homogeneizada por inversão durante 15 segundos e o tubo mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Após nova centrifugação a 12000 x g a 4 °C por 15 minutos, a fase líquida superior foi coletada para purificação do RNA com o kit Direct-zol™ RNA Miniprep Plus (Zymo Research) segundo protocolo do fabricante. A qualidade e quantidade do RNA total extraído e purificado foram avaliadas por espectrofotometria no NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-VIS Spectrophotometer (Thermo Scientific) e por gel de agarose. Os RNAs foram armazenados a -80 °C.

As reações de RT-PCR foram realizadas com o kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen) de acordo com protocolo do fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações foram: *chuR\_promotFw* e *chuR\_promotRv* (região de *chuP* a *chuR*; 439 pb), *chuR\_del3* e *chuS\_del2* (região de *chuR* a *chuS*; 373 pb), e *chuTUV\_CompFw* e *chuS\_del4* (região de *chuS* a *chuT*; 662 pb) (Tabela 2). Amplificações por PCR convencional utilizando Taq DNA polimerase, com as mesmas combinações de oligonucleotídeos, foram realizadas como controles positivo (DNA genômico) e negativo (RNA total).

#### **3.12.2. Ensaio de β-galactosidase**

Os níveis de expressão do gene *lacZ*, sob controle das regiões promotoras clonadas no vetor pRK/*lacZ*290, foram avaliados para determinar a atividade destas regiões por ensaio de β-galactosidase. Inicialmente, os pré-inóculos foram diluídos para DO<sub>600</sub> 0,01 em 2 mL de M9HC e as culturas incubadas a 37 °C sob 250 rpm de agitação até DO<sub>600</sub> entre 0,6 e 0,8. Após crescimento, as culturas foram tratadas

(nenhum tratamento, 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  ou 100  $\mu\text{M}$  Hm), incubadas por mais 2 horas nas mesmas condições citadas anteriormente e as  $\text{DO}_{600}$  determinadas.

Cem microlitros das culturas foram então adicionados a tubos contendo 800  $\mu\text{L}$  de tampão Z (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH 7,0, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol), 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e 25  $\mu\text{L}$  de 0,1% SDS (p/v). Os tubos foram vortexados e incubados a 30 °C por 5 minutos para a permeabilização das células bacterianas. Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  de 0,4% ONPG (p/v) (*ONPG – ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside*) foram adicionados, os tubos novamente vortexados e incubados nas mesmas condições. As reações foram finalizadas adicionando-se 400  $\mu\text{L}$  de 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , os tubos centrifugados a 15000 x g e as leituras da  $\text{DO}_{420}$  das fases líquidas superiores obtidas. Por fim, as unidades de Miller de cada reação foram determinadas.

$$\text{Unidades de Miller} = 1000 \times \{\text{DO}_{420} \times [\text{tempo (min)} \times \text{cultura (mL)} \times \text{DO}_{600}]^{-1}\}$$

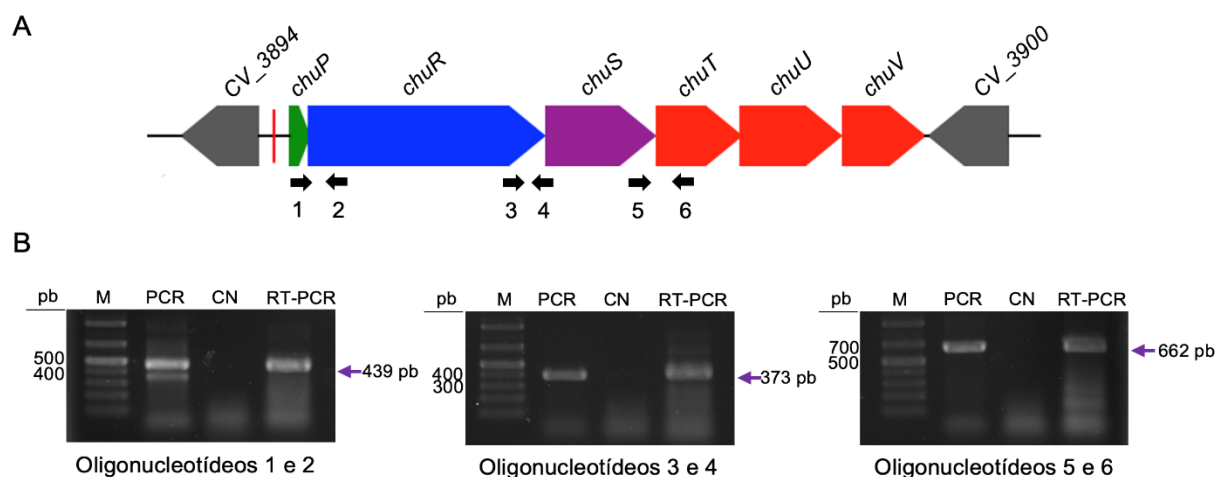
### 3.12.3. Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA)

A capacidade de ligação da proteína ChuP à região promotora de genes específicos foi avaliada por EMSA. Inicialmente, os fragmentos das regiões promotoras de *chuP*, *chuR* e *cilA* (controle negativo) foram amplificados por PCR com a Taq DNA polimerase e oligonucleotídeos promot\_Fw e promot\_Rv específicos (Tabela 2). As interações com o DNA foram realizadas em volumes finais de 20  $\mu\text{L}$  contendo tampão de interação [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 40 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0,1 mM BSA (*BSA – bovine serum albumin*) e 5% de glicerol], 3  $\mu\text{L}$  das sondas de DNA e diferentes concentrações da proteína ChuP (0 a 5000 nM) (DA SILVA NETO *et al.*, 2009). As reações foram mantidas a 25 °C por 25 minutos e então glicerol (7,5%) foi adicionado. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 5%, previamente submetido a pré-corrída de 15 minutos a 25 mA, e submetidas a eletroforese em tampão 0,5 X TB (*TB – Tris-borate*) por aproximadamente 1 hora a 25 mA. Ao final os géis foram corados em brometo de etídio e fotografados.

## 4. RESULTADOS

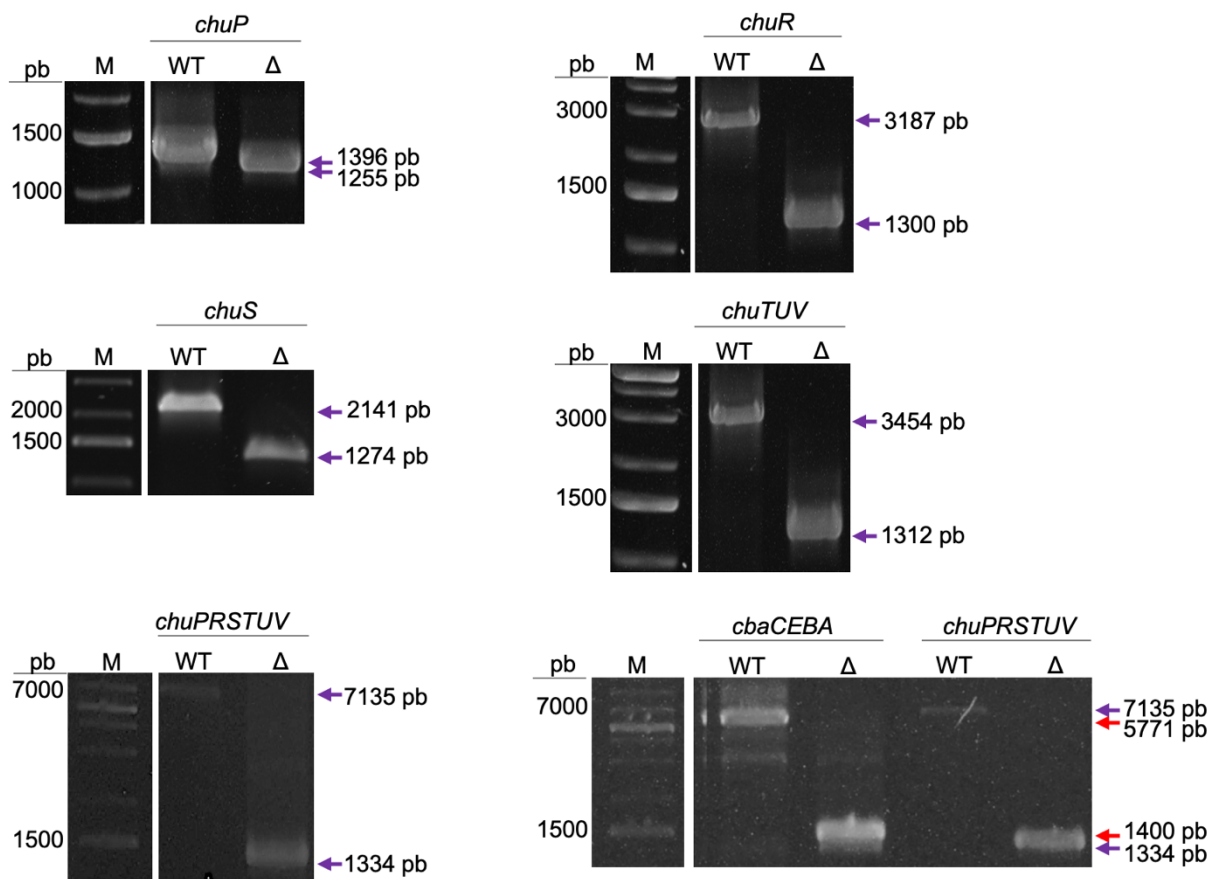
### 4.1. Identificação e análise do operon *chuPRSTUV* e obtenção de linhagens mutantes e complementadas de genes deste operon em *C. violaceum*

Uma busca com a ferramenta Blast usando proteínas de sistemas de captação de heme de outras bactérias contra o genoma completo de *C. violaceum* ATCC 12472 identificou potenciais genes candidatos. Uma análise mais detalhada nos bancos de dados KEGG e NCBI revelou a presença de seis genes organizados em sequência (CV\_3895-96-97-R19290-CV\_3898-99). Tais genes, aqui nomeados *chuPRSTUV* (*chu* – *Chromobacterium heme utilization*), se mostraram candidatos a codificar um sistema de utilização de heme composto por ChuP (CV\_3895), uma proteína da família HemP; ChuR (CV\_3896), um receptor dependente de TonB; ChuS (CV\_3897), uma proteína de degradação ou estocagem de heme; e ChuTUV (RS19290-CV\_3898-99), um transportador do tipo ABC. A presença da sequência ATGATAATGGTTATCATT, semelhante ao Fur *box* de outras bactérias, foi detectada *upstream* ao gene *chuP* (Figura 5A). A disposição e proximidade dos genes sugere uma organização em operon. Por meio de RT-PCR com RNAs de bactérias cultivadas em meio M9HC, demonstramos que ocorre co-transcrição entre vários dos genes *chu*, indicando que em *C. violaceum* temos um operon *chuPRSTUV* (Figura 5B).

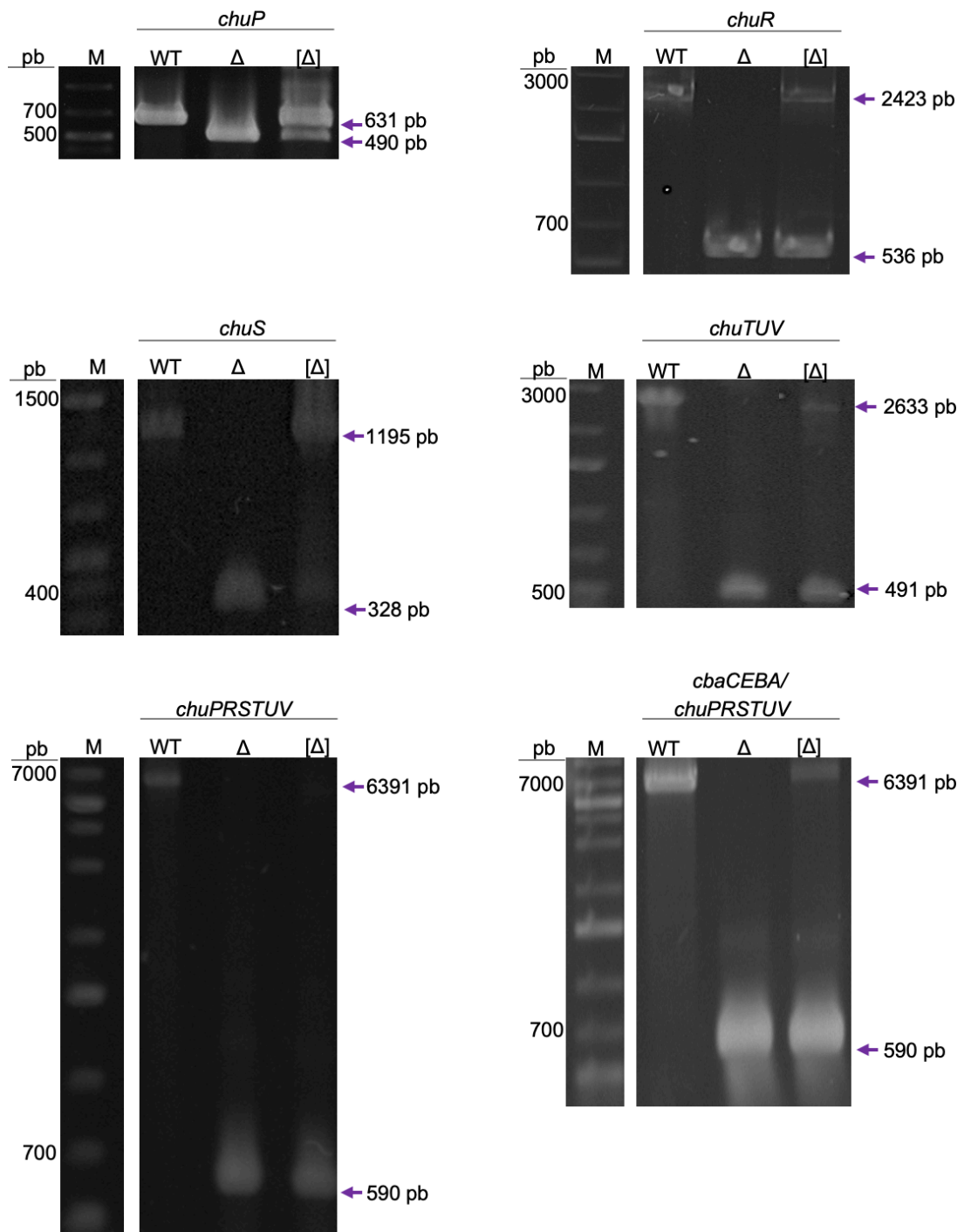


**Figura 5: Organização em operon dos genes *chuPRSTUV*.** **A.** Esquema indicando os seis genes que compõem o sistema de captação de heme em *C. violaceum*. O gene *chuT* (RS19290, anotação NCBI) não havia sido originalmente anotado no genoma de *C. violaceum*. A barra vermelha indica o Fur *box* predito. As setas indicam a posição dos oligonucleotídeos usados no RT-PCR. **B.** Confirmação por RT-PCR do operon *chuPRSTUV*. Detecção de co-transcrição entre os genes usando os oligonucleotídeos indicados. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder. **PCR.** Produtos amplificados com o DNA genômico de *C. violaceum* (controle positivo). **CN.** Reações de PCR usando RNA como molde (controle negativo). **RT-PCR.** Produtos amplificados após RT-PCR com RNA de *C. violaceum*.

Para melhor compreender como ocorrem os mecanismos de regulação, captação e degradação de heme em *C. violaceum*, foram obtidos cinco mutantes nulos de genes do operon de captação de heme ( $\Delta chuP$ ,  $\Delta chuR$ ,  $\Delta chuS$ ,  $\Delta chuTUV$  e  $\Delta chuPRSTUV$ ) e um mutante nulo combinado dos operons de síntese de sideróforos e captação de heme ( $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$ ). A construção das linhagens mutantes foi feita por dupla recombinação homóloga, sendo obtidas deleções das regiões codificadoras destes genes. A confirmação das linhagens mutantes foi feita por PCR de colônia (Figura 6). A complementação das linhagens mutantes foi obtida com os genes sob controle de promotor próprio (*chuP* e *chuPRSTUV*) ou não (*chuR*, *chuS* e *chuTUV*) clonados no plasmídeo de baixa cópia pMR20. As construções foram transferidas aos respectivos mutantes de *C. violaceum* por conjugação e as linhagens complementadas foram confirmadas por PCR de colônia (Figura 7).



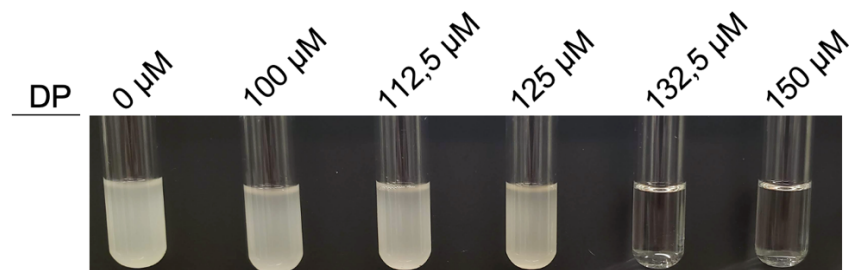
**Figura 6: Confirmação das linhagens mutantes dos genes do operon *chuPRSTUV*.** As linhagens mutantes foram confirmadas por PCR de colônia com oligonucleotídeos del1/del4 (Tabela 2). As setas roxas e vermelhas indicam os fragmentos amplificados por PCR, após eletroforese em gel de agarose, com tamanhos desejados em cada caso. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Thermo Scientific). **WT.** Fragmentos amplificados na reação com DNA genômico de *C. violaceum*. **Δ.** Fragmentos amplificados nas linhagens mutantes após deleção dos genes de interesse.



**Figura 7: Confirmação das linhagens complementadas de mutantes do operon *chuPRSTUV*.** As linhagens complementadas foram confirmadas por PCR de colônia com oligonucleotídeos CompFw e CompRv (Tabela 2). As setas roxas indicam os fragmentos amplificados por PCR, após eletroforese em gel de agarose, com tamanhos desejados. Nas linhagens complementadas ocorreu amplificação a partir do DNA genômico (fragmentos menores) e dos genes clonados no vetor pMR20 (fragmentos maiores). **M.** Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Thermo Scientific). **WT.** Fragmentos amplificados na reação com DNA genômico de *C. violaceum*.  **$\Delta$ .** Fragmentos amplificados nas linhagens mutantes. **[ $\Delta$ ].** Fragmentos amplificados nas linhagens complementadas.

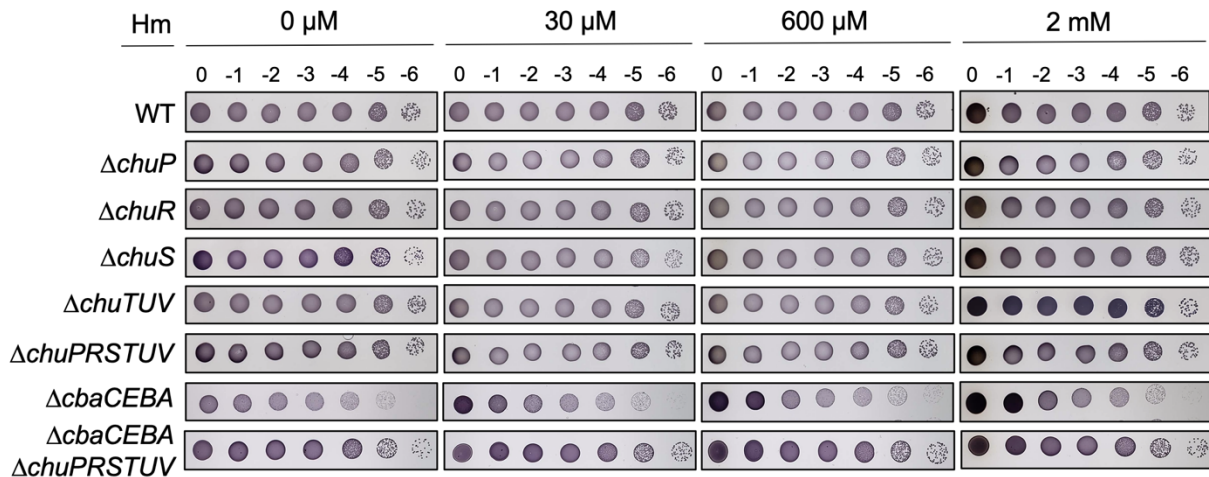
#### 4.2. Determinação das situações de carência de ferro e de suficiência de heme

Pelo fato de sistemas de captação de heme serem expressos em situações de carência de ferro, estas condições foram determinadas para a linhagem selvagem de *C. violaceum* em M9HC. Para isto, o quelante de alta afinidade a ferro DP foi utilizado em diferentes concentrações para obter sua concentração inibitória mínima através da inibição do crescimento bacteriano. A inibição do crescimento de *C. violaceum* em LB já foi previamente descrita, sendo observada a partir de 300  $\mu\text{M}$  de DP (BATISTA *et al.*, 2019). Já em M9HC, o crescimento bacteriano não ocorreu em concentrações a partir de 132,5  $\mu\text{M}$  de DP (Figura 8).



**Figura 8: Padronização de situações de carência de ferro por concentração inibitória mínima de DP.** Crescimento da linhagem selvagem de *C. violaceum*, a partir de  $\text{DO}_{600}$  0,01, após 24 horas da adição de concentrações de 0 a 150  $\mu\text{M}$  de DP em M9HC. A inibição de crescimento foi observada a partir de 132,5  $\mu\text{M}$ . **DP**. Dipiridil.

As condições de suficiência de heme e de possíveis efeitos citotóxicos desta molécula às linhagens de *C. violaceum* foram analisadas por viabilidade celular. Entretanto, ao serem expostas a concentrações crescentes de Hm em M9HC, as linhagens selvagem e mutantes não demonstraram alteração de viabilidade em concentrações de até 2 mM de Hm (Figura 9). O tamanho reduzido observado para as colônias da linhagem  $\Delta\text{cbaCEBA}$  já foi previamente relatado mesmo após crescimento em LB, tratando-se de um fenótipo específico para este mutante. A reversão a tamanhos semelhantes ao da linhagem selvagem foi observada após suplementação com 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  (BATISTA *et al.*, 2019). Entretanto, após suplementação com Hm os tamanhos não foram alterados em M9HC. Interessantemente, a deleção do operon *chuPRSTUV* no  $\Delta\text{cbaCEBA}$  levou à reversão deste fenótipo (Figura 9). A partir destes resultados, as situações de carência de ferro e suficiência de Hm foram estabelecidas para *C. violaceum* em meio mínimo M9HC.

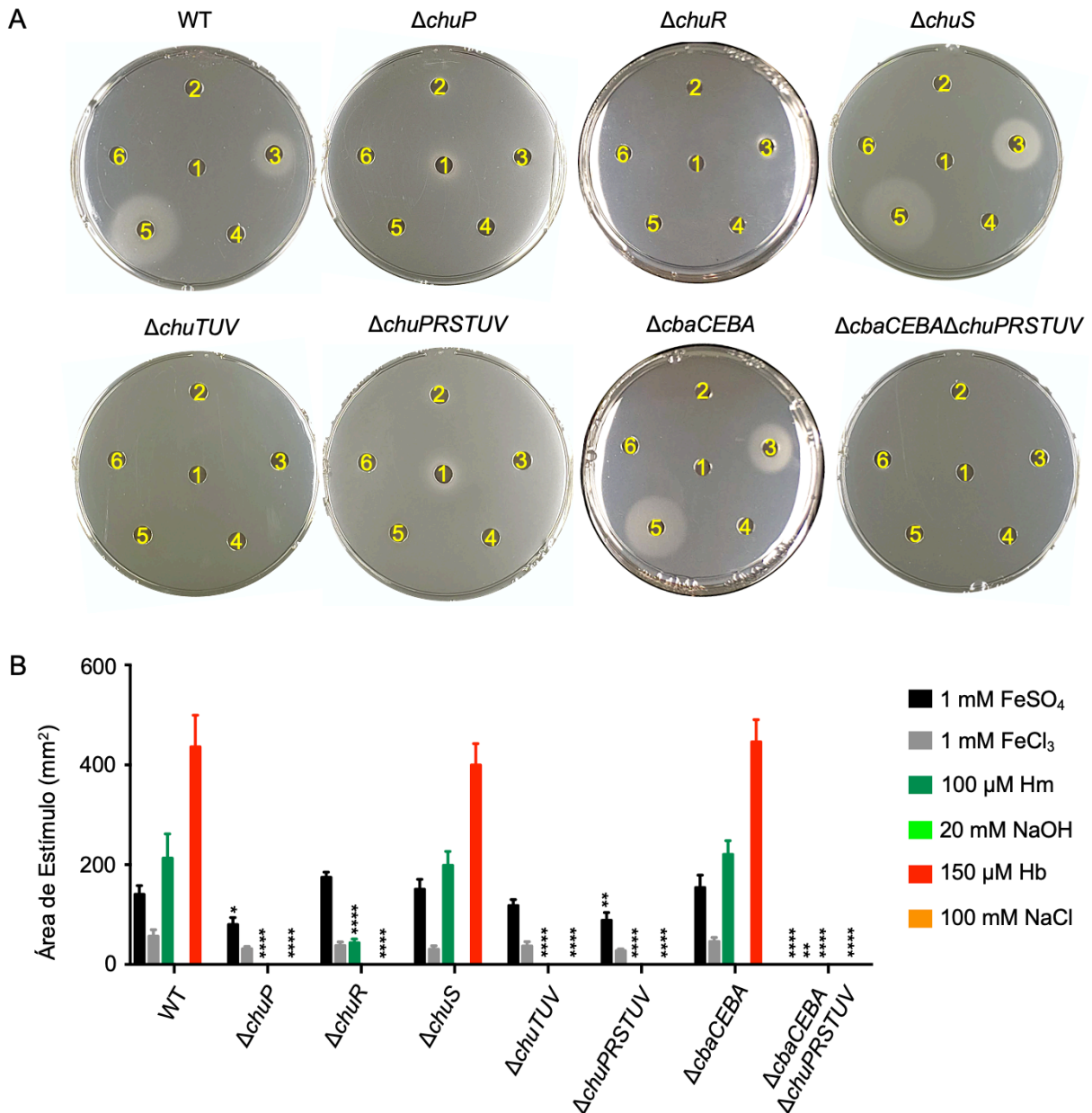


**Figura 9: Análise do efeito citotóxico de Hm por viabilidade celular.** Viabilidade celular das linhagens selvagem e mutantes, a partir de  $DO_{600}$  0,01, após 24 horas da adição de concentrações de 0 a 2 mM de Hm em M9HC. Os cultivos foram diluídos 1:10 em PBS e as diluições plaqueadas em M9HC. Os efeitos da Hm no aspecto das colônias foram avaliados após 24 horas. Não foi observada alteração da viabilidade celular para nenhuma linhagem mutante do operon de captação de heme nas condições avaliadas. **Hm.** Hemina.

#### 4.3. Papel do operon *chuPRSTUV* na captação heme em *C. violaceum*

A capacidade de crescimento das diferentes linhagens de *C. violaceum* com fontes alternativas de heme foi avaliada. O ensaio de estimulação em M9HC 0,8% ágar revelou que 100  $\mu$ M de Hm e 150  $\mu$ M de Hb foram capazes de induzir o crescimento, após 24 horas, da linhagem selvagem em carência de ferro obtida com 125  $\mu$ M de DP (Figura 10). Entretanto, para as linhagens mutantes as concentrações de DP tiveram que ser ajustadas para 50  $\mu$ M ( $\Delta cbaCEBA$ ), 100  $\mu$ M ( $\Delta cbaCEBA \Delta chuPRSTUV$ ), 125  $\mu$ M ( $\Delta chuP$ ,  $\Delta chuR$ ,  $\Delta chuS$  e  $\Delta chuPSTUV$ ) e 150  $\mu$ M ( $\Delta chuTUV$ ). Nestas condições foi observada perda na capacidade de utilização de Hm e Hb em carência de ferro nas linhagens  $\Delta chuP$ ,  $\Delta chuTUV$ ,  $\Delta chuPRSTUV$  e  $\Delta cbaCEBA \Delta chuPRSTUV$  (Figura 10). Para a linhagem  $\Delta chuR$ , Hb também não estimulou este mutante; um pequeno estímulo de crescimento pode ser detectado na presença de Hm, indicando uma redução drástica e significativa na capacidade de utilização também desta fonte de ferro (Figura 10). Interessantemente, Hm e Hb continuaram sendo capazes de estimular o crescimento da linhagem  $\Delta chuS$  nos mesmos níveis da linhagem selvagem, sugerindo que este gene não é necessário para utilização de heme nas condições testadas. A linhagem  $\Delta cbaCEBA$  também foi estimulada por Hm e Hb semelhante à linhagem selvagem, sendo utilizada como controle dos ensaios, o que demonstra que a captação de Hm e Hb independe da

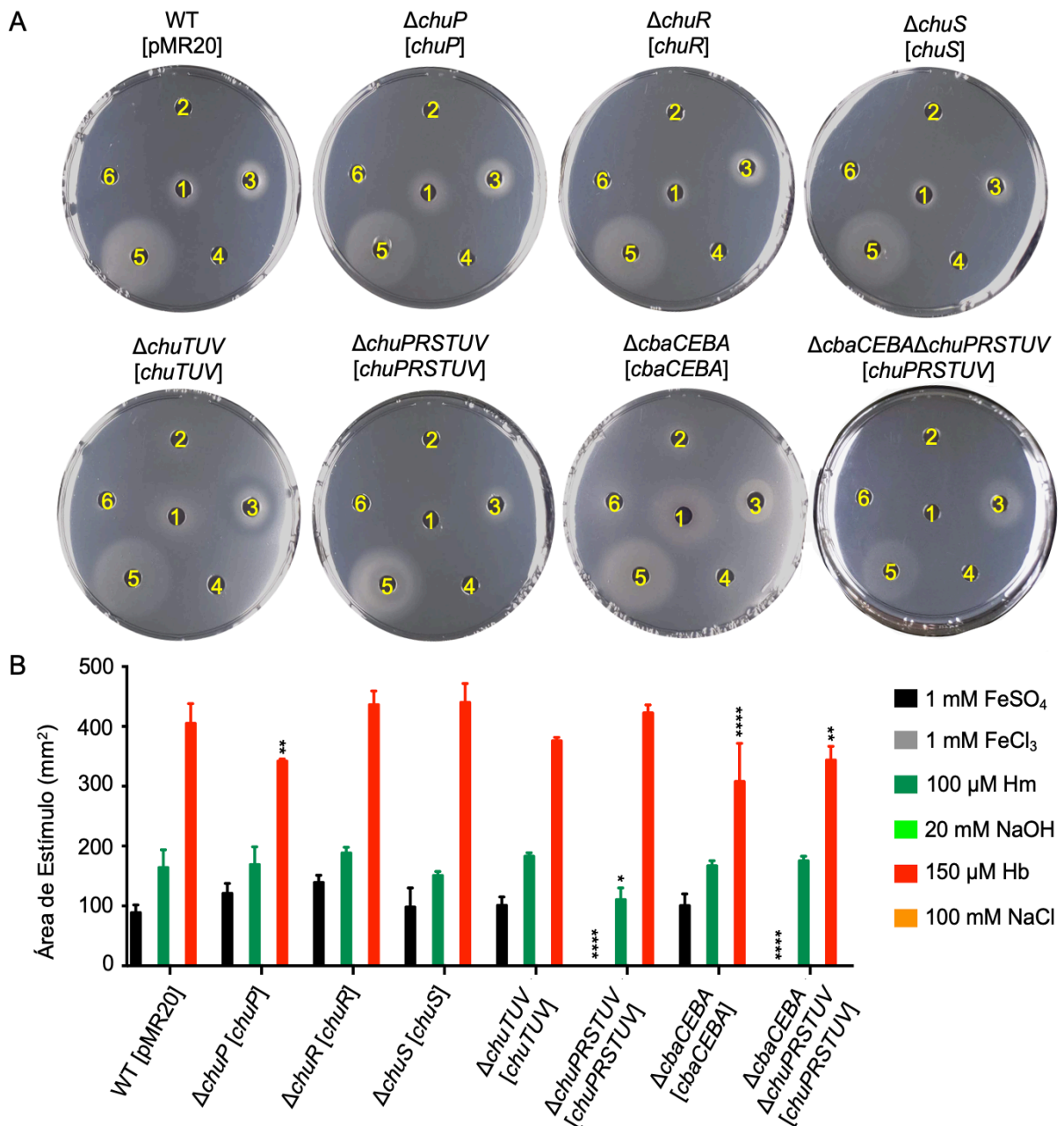
síntese de sideróforos (Figura 10). Quanto às fontes de ferro inorgânicas utilizadas, foi observada uma pequena redução significativa na utilização de  $\text{FeSO}_4$  nas linhagens  $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$  (Figura 10).



**Figura 10: Ensaio de estimulação para avaliar a utilização de heme via operon *chuPRSTUV* nas linhagens selvagem e mutantes de *C. violaceum*.** **A.** A capacidade de diferentes compostos estimularem o crescimento das linhagens selvagem e mutantes foi avaliada por ensaio de estimulação em M9HC 0,8% ágar. Uma relação 0,001% (v/v) bactéria/meio foi obtida em meio carenciado em ferro com DP. Os compostos foram adicionados a filtros de papel e as áreas de estímulo analisadas após 24 horas de crescimento. **B.** Quantificação das áreas estimuladas com o software ImageJ. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica. 1. 1 mM  $\text{FeSO}_4$ . 2. 1 mM  $\text{FeCl}_3$ . 3. 100  $\mu\text{M}$  Hm. 4. 20 mM NaOH (controle negativo Hm). 5. 150  $\mu\text{M}$  Hb. 6. 100 mM NaCl (controle negativo Hb).



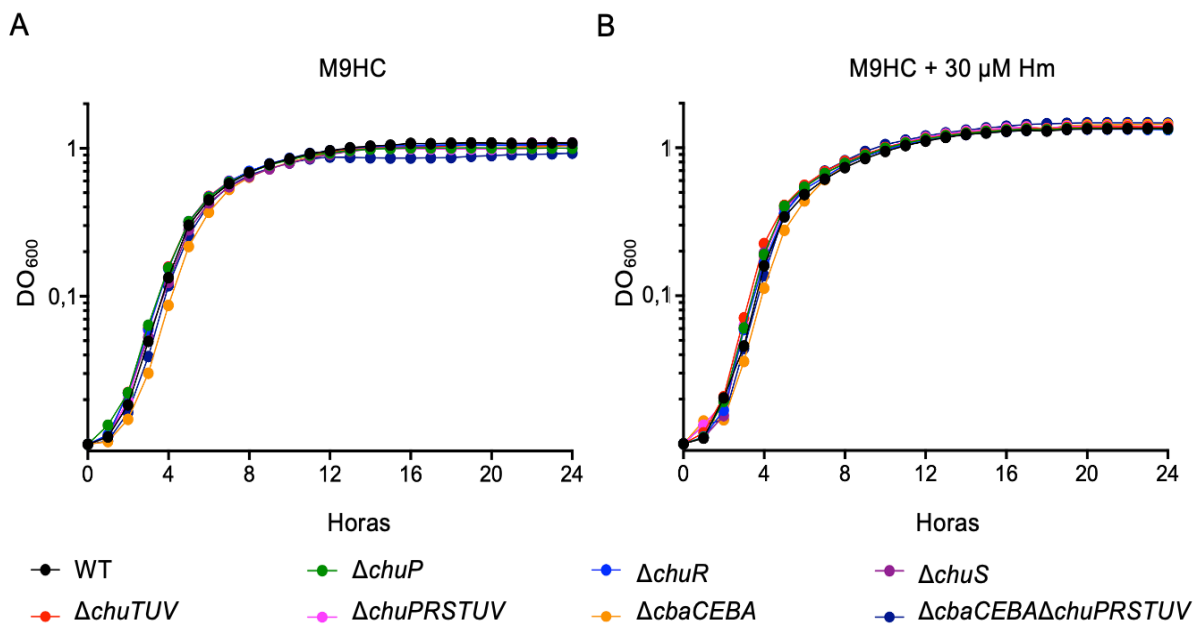
Nas linhagens mutantes complementadas com os respectivos genes foi observada reversão dos fenótipos da capacidade crescimento com Hm e Hb como fontes de ferro, com todas as linhagens complementadas voltando a utilizar Hm e Hb em níveis similares à linhagem selvagem (Figura 11). Em conjunto, estes resultados indicam que o operon *chuPRSTUV* é necessário para utilização de heme e hemoglobina em *C. violaceum* em situações de carência de ferro.



**Figura 11: Ensaio de estimulação para avaliar a utilização de heme via operon *chuPRSTUV* nas linhagens complementadas de *C. violaceum*.** **A.** A capacidade de diferentes compostos estimularem o crescimento das linhagens selvagem e complementadas foi avaliada por ensaio de estimulação em M9HC 0,8% ágar. Uma relação 0,001% (v/v) bactéria/meio foi obtida em meio carenciado em ferro com 125 μM de DP. Os compostos

foram adicionados a filtros de papel e as áreas de estímulo analisadas após 24 horas de crescimento. **B.** Quantificação das áreas estimuladas com o software ImageJ. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica. **1.** 1 mM FeSO<sub>4</sub>. **2.** 1 mM FeCl<sub>3</sub>. **3.** 100 μM Hm. **4.** 20 mM NaOH (controle negativo Hm). **5.** 150 μM Hb. **6.** 100 mM NaCl (controle negativo Hb).

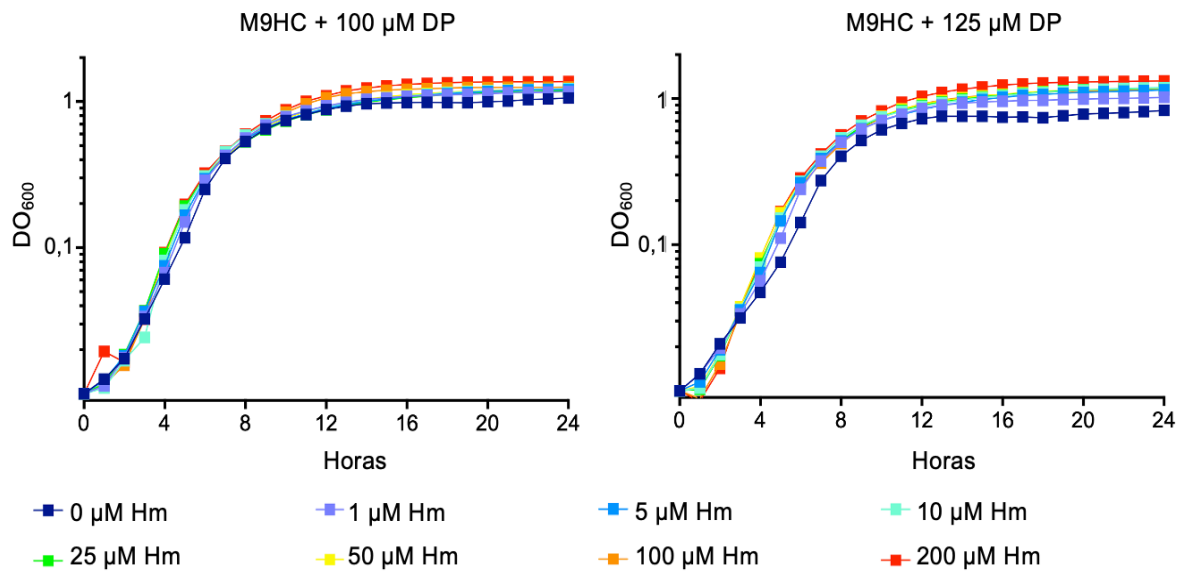
O crescimento das linhagens de *C. violaceum* também foi avaliado ao longo do tempo por curvas de crescimento em diferentes condições. Inicialmente, as linhagens selvagem e mutantes de *C. violaceum* foram avaliadas por curva durante crescimento em M9HC (Figura 12A) e M9HC com suplementação de 30 μM de Hm (Figura 12B). Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada para o crescimento destas linhagens nas condições citadas, indicando que os mutantes do operon *chuPRSTUV* não têm problemas de crescimento em meio mínimo nem em suficiência de heme.



**Figura 12: Curvas de crescimento em meio mínimo e com suplementação de heme.** O crescimento bacteriano das linhagens selvagem e mutantes foi avaliado por leitura da DO<sub>600</sub> durante 24 horas pelo Spectra MiniMax i3. **A.** Crescimento das linhagens em M9HC. **B.** Crescimento das linhagens em suficiência de heme pela adição de 30 μM de Hm. Curva representativa de ensaios realizados em triplicatas biológica e técnica. **Hm.** Hemina.

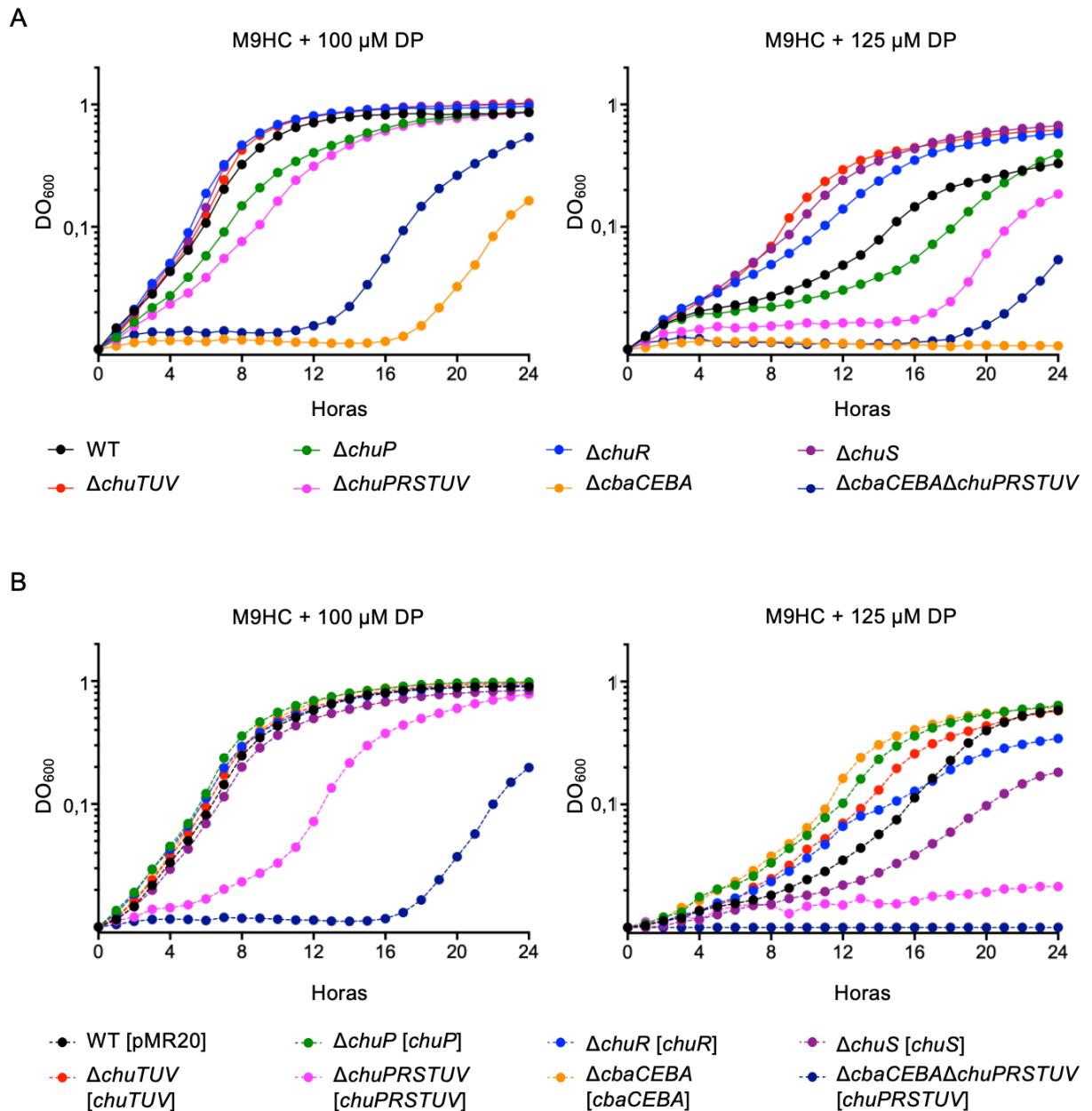
Para padronizar condições e testar o efeito do heme em limitação de ferro, curvas de crescimento em carência de ferro obtida com 100 ou 125 μM de DP foram realizadas com a linhagem selvagem sem ou com suplementação de diferentes níveis de Hm (Figura 13). Em carência de ferro, uma melhora gradativa no crescimento foi observada após suplementação com concentrações de Hm crescentes de 1 a 200 μM.

A concentração mais alta de 200  $\mu\text{M}$  de Hm foi a que levou ao maior crescimento bacteriano final em ambas as condições. Entretanto, o Hm causou uma melhora mais expressiva no crescimento em maior carência de ferro obtida com 125  $\mu\text{M}$  de DP em relação à menor com 100  $\mu\text{M}$  de DP (Figura 13).



**Figura 13: Curvas de crescimento da linhagem selvagem em condições de carência de ferro e suficiência de heme.** O crescimento bacteriano da linhagem selvagem foi avaliado por leitura da DO<sub>600</sub> durante 24 horas pelo Spectra MiniMax i3. As culturas em M9HC foram avaliadas em carência de ferro (100  $\mu\text{M}$  e 125  $\mu\text{M}$  DP) e suficiência de heme (1 a 200  $\mu\text{M}$ ). Curva representativa de ensaios realizados em triplicatas biológica e técnica. **DP.** Dipiridil. **Hm.** Hemina.

Uma vez estabelecida a condição de carência de ferro, curvas de crescimento em M9HC com 100 e 125  $\mu\text{M}$  de DP foram realizadas incluindo as linhagens mutantes (Figura 14). Os resultados obtidos permitem a divisão das linhagens mutantes em três grupos: (i) as linhagens  $\Delta chuR$ ,  $\Delta chuS$  e  $\Delta chuTUV$  que apresentaram crescimento adiantado em relação à linhagem selvagem, sobretudo em 125  $\mu\text{M}$  de DP; (ii) as linhagens  $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$  que foram bastante atrasadas ao longo da curva, mas após 24 horas apresentaram crescimento semelhante à selvagem; (iii) as linhagens  $\Delta cbaCEBA$  e  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  que apresentaram drástica redução de crescimento e estão relacionadas à ausência de síntese de sideróforos (Figura 14A). Interessantemente, a deleção do operon  $chuPRSTUV$  na linhagem  $\Delta cbaCEBA$  parece beneficiar o crescimento em carência de ferro.



**Figura 14: Curvas de crescimento das linhagens em condições de carência de ferro.** O crescimento bacteriano foi avaliado por leitura da  $DO_{600}$  durante 24 horas pelo Spectra MiniMax i3. As culturas foram avaliadas em carência de ferro pela adição de 100 ou 125  $\mu$ M de DP em M9HC. **A.** Crescimento das linhagens selvagem e mutantes em carência de ferro. **B.** Crescimento das linhagens complementadas em carência de ferro. Curva representativa de ensaios realizados em triplicatas biológica e técnica. **DP.** Dipiridil.

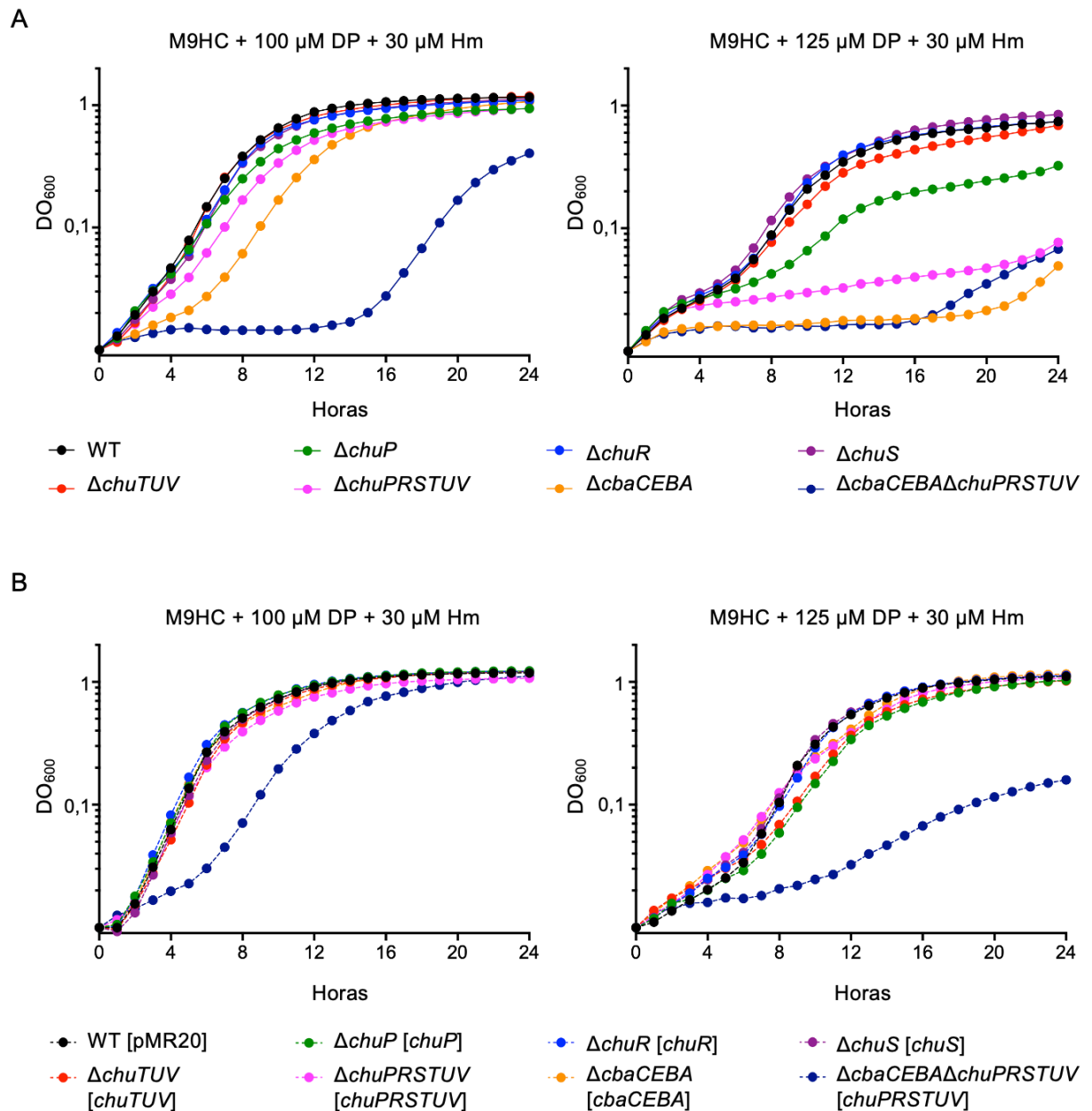
Após complementação dos mutantes nulos simples, com exceção da linhagem  $\Delta chuPRSTUV$  complementada que apresentou atraso no crescimento, foi observada reversão ao crescimento semelhante ao da linhagem selvagem para crescimento em 100  $\mu$ M de DP. Conforme esperado, a complementação da linhagem

$\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  com  $chuPRSTUV$  reverteu o fenótipo ao observado no mutante  $\Delta cbaCEBA$  (Figura 14B). Entretanto, em maior carência com 125  $\mu$ M de DP foram observados os seguintes grupos: (i) as linhagens complementadas com  $chuR$  e  $chuTUV$ , que mantiveram crescimento adiantado, como observado nos mutantes; (ii) as linhagens complementadas com  $chuP$ ,  $chuS$  e  $cbaCEBA$  que apresentaram inversão dos fenótipos observados nos mutantes; (iii) a complementação da linhagem  $\Delta chuPRSTUV$  que piorou o crescimento; (iv) reversão do fenótipo da linhagem  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  previamente relatado (Figura 14B). Essa redução no crescimento observada nas complementações com  $chuPRSTUV$  parece estar relacionada à redução drástica na síntese de sideróforos nesta linhagem (ver Resultados 4.4.). Como na complementação de  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  já é ausente a produção destas moléculas, este efeito não é observado.

Em conjunto estes resultados comprovam que (i) apesar de M9HC ser um meio com pouco ferro, condições mais rígidas de carência obtidas com DP são necessárias para que sejam observadas diferenças no crescimento entre as linhagens selvagem e mutantes; (ii) conforme previamente relatado por Batista e colaboradores (2019), a ausência de sideróforos reduz drasticamente o crescimento de *C. violaceum* em situação de limitação de ferro; (iii) a presença do operon  $chuPRSTUV$  é necessária para o crescimento adequado, uma vez que nas linhagens  $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$  que não o expressam, há atraso de crescimento, embora a ausência de outros genes do operon tenha causado efeito inverso.

Curvas de crescimento também foram realizadas para avaliar o perfil de crescimento das linhagens de *C. violaceum* em condições de carência de ferro e suficiência de heme em M9HC. Para situação de carência com 100  $\mu$ M de DP foram observados atrasos no crescimento das linhagens  $\Delta chuP$ ,  $\Delta chuPRSTUV$  e  $\Delta cbaCEBA$ , sendo mais drástico para  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$ . Os demais mutantes demonstraram crescimento semelhante ao da selvagem (Figura 15A). Em carência obtida com 125  $\mu$ M de DP, foi possível observar: (i) um pequeno atraso da linhagem  $\Delta chuTUV$ ; (ii) atrasos mais expressivos das linhagens  $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$ ; (iii) redução drástica no crescimento das linhagens  $\Delta cbaCEBA$  e  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  (Figura 15A). Conforme esperado, em ambas condições o

mutante  $\Delta cbaCEBA$  foi capaz de iniciar o crescimento antes ao observado em situações de carência de ferro somente, por utilizar heme na falta de sideróforo.



**Figura 15: Curvas de crescimento das linhagens em condições de carência de ferro e suficiência de heme.** O crescimento bacteriano foi avaliado por leitura da  $DO_{600}$  durante 24 horas pelo Spectra MiniMax i3. As culturas foram avaliadas em carência de ferro, pela adição de 100 ou 125  $\mu$ M de DP, e suficiência de heme, pela adição de 30  $\mu$ M de Hm, em M9HC. **A.** Crescimento das linhagens selvagem e mutantes em carência de ferro e suficiência de heme. **B.** Crescimento das linhagens complementadas em carência de ferro e suficiência de heme. Curva representativa de ensaios realizados em triplicatas biológica e técnica. **DP.** Dipiridil. **Hm.** Hemina.

Com exceção da linhagem  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  complementada com  $chuPRSTUV$ , na qual houve reversão de crescimento a níveis do mutante  $\Delta cbaCEBA$

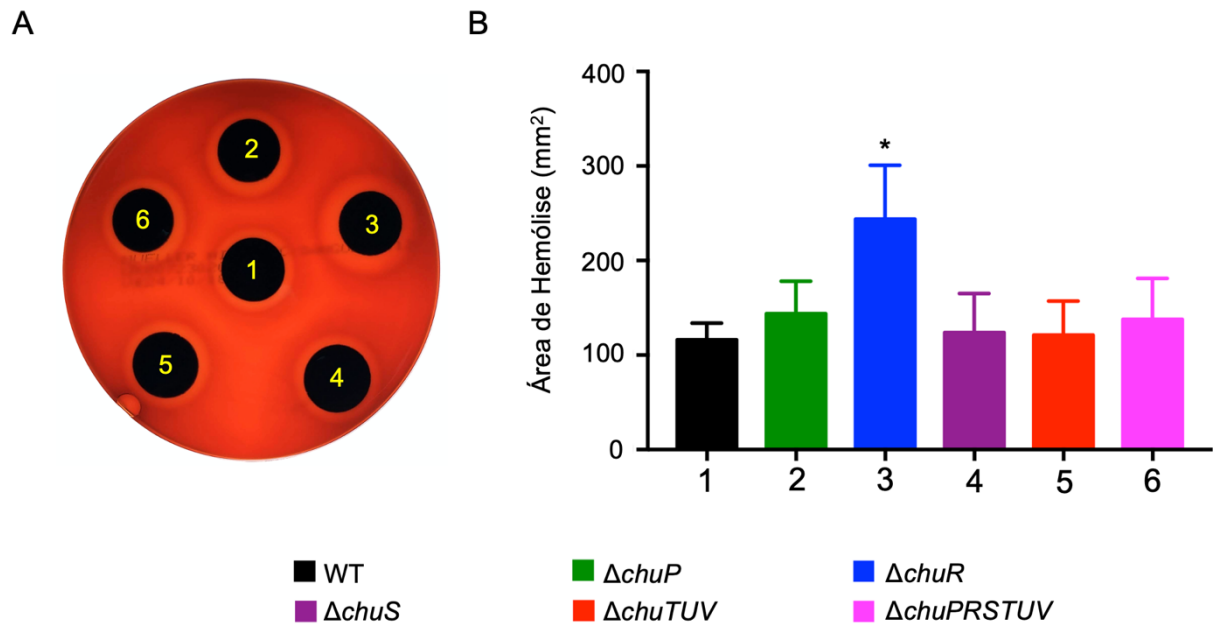
como esperado, houve reversão de fenótipo de crescimento em condições de carência de ferro e suficiência de heme em todas as demais linhagens complementadas (Figura 15B). Em conjunto, os fenótipos observados por ensaio de estimulação corroboram de modo geral com as curvas de crescimento de cada linhagem, embora nas curvas de crescimento a situação pareça mais complexa em função da dinâmica de produção de sideróforos. Logo, o papel do operon *chuPRSTUV* na utilização de fontes alternativas de ferro, como Hm e Hb, foi comprovado.

#### **4.4. Papel do operon *chuPRSTUV* nas atividades hemolítica e de sideróforos em *C. violaceum***

Por ter sido demonstrada a utilização de Hb via operon *chuPRSTUV* em *C. violaceum*, a capacidade da linhagem selvagem e mutantes adquirirem Hb proveniente de eritrócitos foi avaliada por ensaio de hemólise em placas ágar sangue de carneiro 5% (v/v). Após 7 dias de crescimento, o padrão de hemólise das linhagens foi comparado ao da selvagem. Foi possível observar um aumento significativo na área de hemólise causada pelo mutante  $\Delta chuR$  (Figura 16). Para as demais linhagens mutantes a diferença não foi significativa em relação à hemólise da selvagem (Figura 16B). Tais resultados sugerem que o receptor dependente de TonB ChuR poderia estar envolvido no sequestro direto e captação de heme da Hb. Neste caso, o aumento nas áreas de hemólise se daria por *feedback* positivo, onde haveria maior secreção de compostos hemolíticos frente a ausência de captação dos produtos hemolisados.

A atividade de sideróforos nas diferentes linhagens foi analisada por ensaio de CAS, previamente padronizado para *C. violaceum* (BATISTA *et al.*, 2019). Neste ensaio, é possível detectar a presença de sideróforos pela mudança da cor azul para laranja quando há sequestro do ferro pelo sideróforo (Figura 17). Após 24 horas de cultivo em placas CAS, um aumento significativo na atividade de sideróforos foi observado para as linhagens  $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$ , enquanto os demais mutantes do operon apresentaram resultados semelhantes aos da linhagem selvagem (Figura 17A e B). Conforme esperado, nas linhagens  $\Delta cbaCEBA$  e  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  a atividade de sideróforos foi nula (Figura 17A e B), pois as enzimas CbaCEBA sintetizam o precursor dos sideróforos de *C. violaceum* (BATISTA *et al.*, 2019). O fenótipo de atividade aumentada de sideróforos dos mutantes  $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$  foi revertido após complementação com os respectivos genes, assim como houve restauração da produção de sideróforos no mutante  $\Delta cbaCEBA$  complementado com

*cbaCEBA* (Figura 17). Notou-se que nas complementações com *cbaCEBA* e *chuPRSTUV* nos respectivos mutantes parece haver expressão aumentada destes genes, pois o efeito na atividade de sideróforo foi bem além daquele observado na linhagem selvagem (Figura 17C e D). As demais linhagens complementadas não tiveram diferença em relação à linhagem selvagem, assim como já não tinham seus respectivos mutantes (Figura 17).

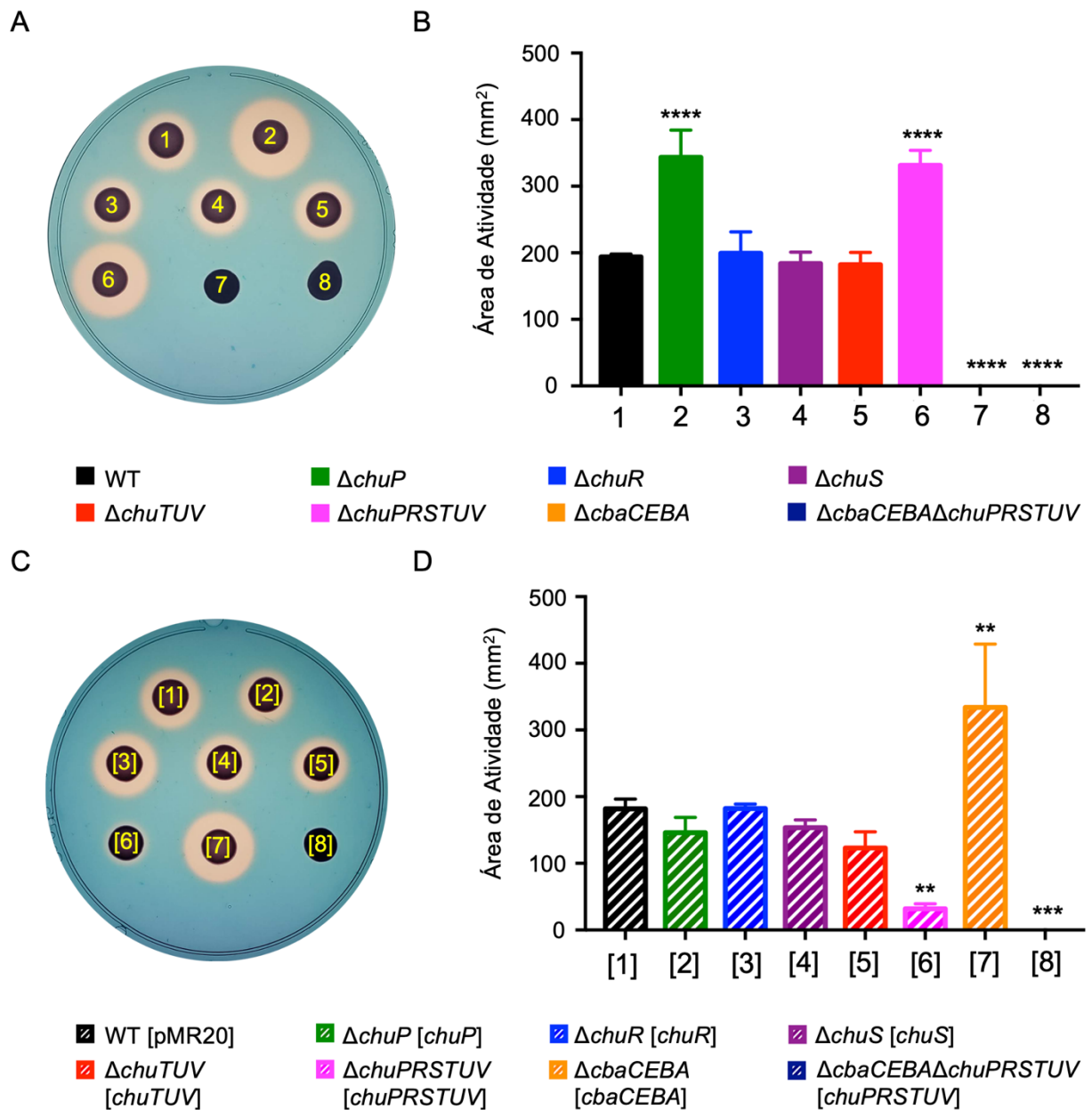


**Figura 16: Atividade hemolítica das linhagens selvagem e mutantes do operon *chuPRSTUV* de *C. violaceum*.** **A.** Ensaio de hemólise das linhagens selvagem e mutantes foi realizado em placas de ágar sangue de carneiro 5% (v/v). Após 7 dias de crescimento, as diferenças nos padrões de hemólise foram analisadas. **B.** Quantificação das áreas de hemólise com o software ImageJ. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica. Note-se que foi mantida correspondência entre os números e as linhagens na placa e no gráfico.

Os resultados dos ensaios de CAS ajudam a explicar os resultados observados nas curvas de crescimento e sugerem algumas hipóteses: (i) o ChuP apresenta papel na regulação da atividade de sideróforos em *C. violaceum*, isto porque nas curvas das linhagens com deleção ou complementação de *chuP* foram observados fenótipos distintos que se relacionam às atividades de sideróforos detectadas por ensaio de CAS; (ii) esta regulação pode atuar na captação, uma vez que as linhagens  $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$  apresentaram atraso de crescimento em carência de ferro (Figura 14A) e maior atividade de sideróforos (Figura 17A e B); ou na síntese de sideróforos, pois a complementação da linhagem  $\Delta chuPRSTUV$  levou a maior atraso de crescimento em carência (Figura 14B) com atividade drasticamente reduzida no ensaio de CAS



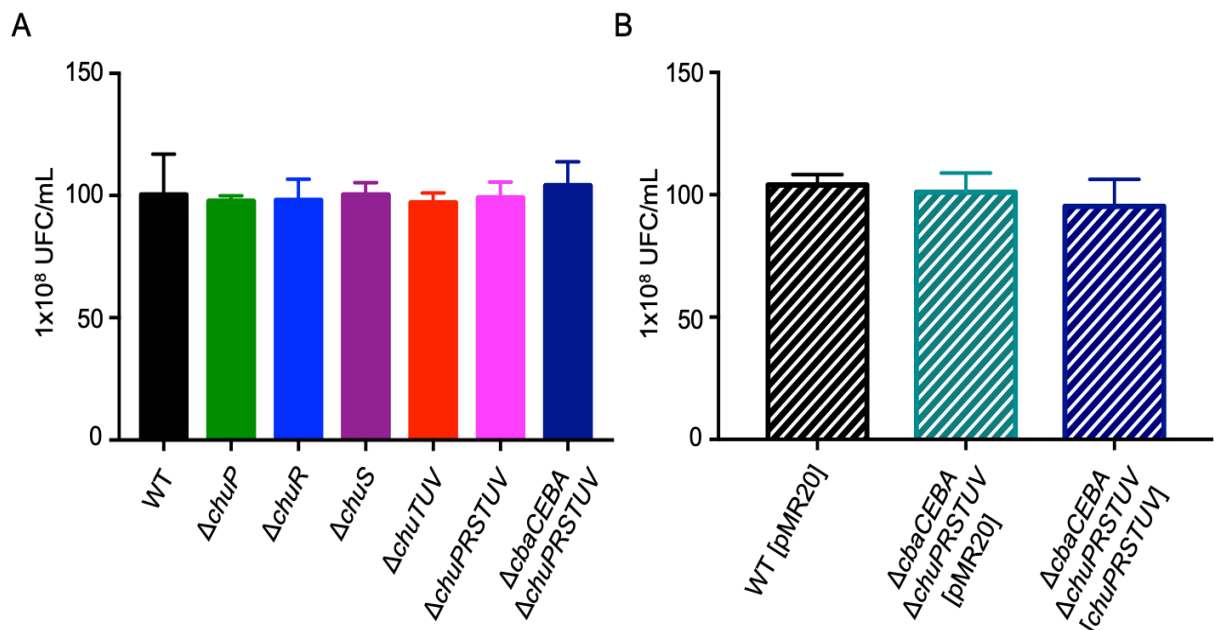
(Figura 17C e D). Além disso, a melhora drástica no crescimento em carência de ferro da linhagem  $\Delta cbaCEBA$  após complementação (Figura 14B) está diretamente relacionada à maior síntese de sideróforos observada por CAS (Figura 17C e D).



**Figura 17: Ensaio de CAS para avaliar atividade de sideróforos nas linhagens selvagem, mutantes e complementadas de *C. violaceum*.** A atividade de sideróforos das linhagens de *C. violaceum* foi determinada em placas CAS. Após 24 horas de cultivo, as diferenças nos padrões de atividade foram analisadas. **A.** Atividade de sideróforos das linhagens selvagem e mutantes. **B.** Quantificação das áreas de atividade de sideróforo das linhagens selvagem e mutantes com o software ImageJ. **C.** Atividade de sideróforos das linhagens complementadas. **D.** Quantificação das áreas de atividade de sideróforo das linhagens complementadas com o software ImageJ. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica. Note-se que foi mantida correspondência entre os números e as linhagens nas placas e nos gráficos de modo sequencial.

#### 4.5. Papel do operon de utilização de heme *chuPRSTUV* na virulência de *C. violaceum*

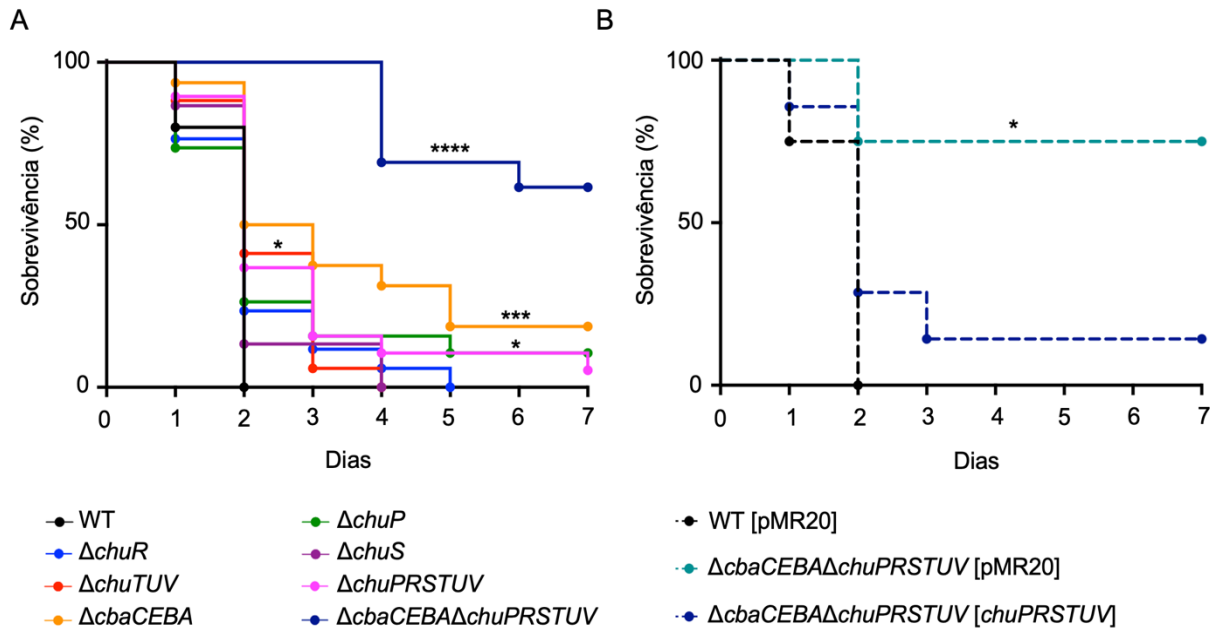
O heme é uma molécula amplamente disponível, sendo uma fonte de ferro abundante no hospedeiro durante infecções bacterianas (CASSAT e SKAAR, 2013; PARROW *et al.*, 2013; SOARES e WEISS, 2015). Infecções realizadas em camundongos com *C. violaceum* já demonstraram sua capacidade de colonização do fígado e do baço dos animais (MIKI *et al.*, 2010), sendo estes órgãos intimamente relacionados com a homeostase de heme. Logo, a importância da captação de heme via operon *chuPRSTUV* para a virulência de *C. violaceum* foi verificada. Inicialmente, a viabilidade das diferentes linhagens utilizadas nos ensaios de sobrevivência e de carga bacteriana em órgãos foi avaliada. Após crescimento por 20 horas em LB, a viabilidade das linhagens foi determinada e nenhuma diferença foi observada entre as linhagens selvagem, mutantes e complementadas nessas condições. Todas as linhagens apresentaram creca de  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL em LB (suficiência de ferro) (Figura 18). A viabilidade da linhagem  $\Delta cbaCEBA$  já foi determinada e é semelhante à da linhagem selvagem nestas condições (BATISTA *et al.*, 2019).



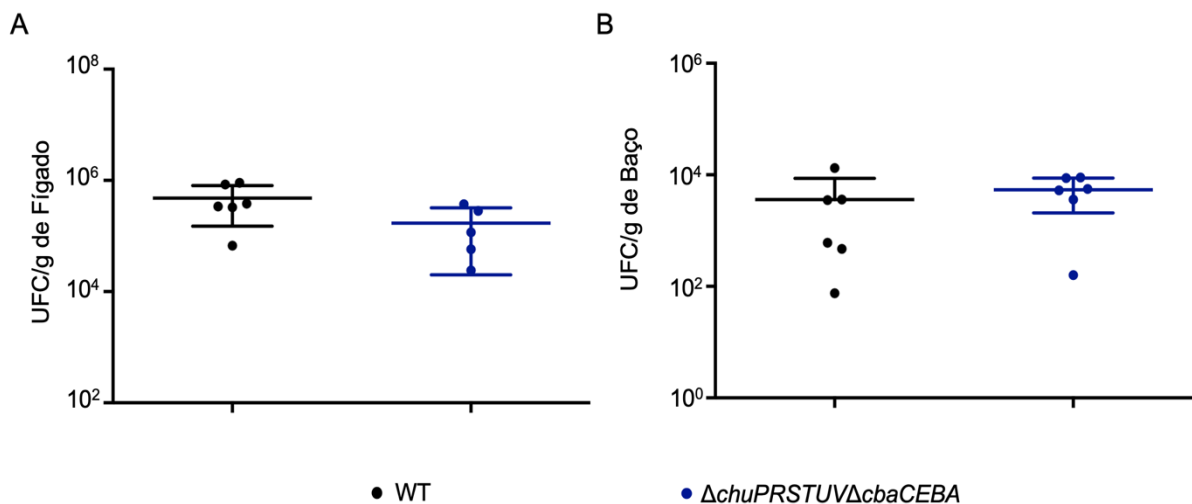
**Figura 18: Ensaio de viabilidade das linhagens de *C. violaceum* em LB (suficiência de ferro).** A viabilidade das linhagens utilizadas nos ensaios foi determinada por UFC/mL, após 20 horas de cultivo em LB. **A.** Viabilidade das linhagens selvagem e mutantes. **B.** Viabilidade das linhagens complementadas. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

Padronizadas as condições de cultivo para infecção, camundongos Balb/c fêmea de 6 semanas foram infectados com cerca de  $1 \times 10^6$  células bacterianas das linhagens de *C. violaceum* para caracterização da virulência. Inicialmente a análise do perfil de sobrevivência dos animais infectados foi realizada, sendo os grupos de camundongos acompanhados diariamente durante uma semana (Figura 19). Os mutantes do operon *chu* tiveram uma atenuação muito pequena na virulência, sendo a diferença significativa em relação à linhagem selvagem apenas para os mutantes  $\Delta chuTUV$  e  $\Delta chuPRSTUV$  (Figura 19A). O mutante  $\Delta cbaCEBA$  foi bastante atenuado, confirmando dados já publicados (BATISTA *et al.*, 2019). Na linhagem mutante  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  a atenuação foi ainda mais drástica do que a observada para o mutante  $\Delta cbaCEBA$ , indicando que a captação de heme torna-se bem mais importante para patogênese de *C. violaceum* na ausência de sideróforos (Figura 19A). Após complementação com o operon *chuPRSTUV*, o padrão de virulência da linhagem  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  ficou semelhante ao do mutante  $\Delta cbaCEBA$ , como esperado (Figura 19B). Este efeito de recuperação de virulência não está relacionado à presença do vetor pMR20, uma vez que a linhagem  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  contendo o vetor vazio permaneceu tão atenuado para virulência quanto este mutante sem vetor algum (Figura 19B).

Já para análise da carga bacteriana nos órgãos dos animais, os camundongos foram infectados conforme padronizado e os órgãos coletados após 20 horas de infecção. Ao serem determinadas as UFC/g nos órgãos dos animais, não foram observadas diferenças nos níveis de colonização no fígado (Figura 20A) ou no baço (Figura 20B) após infecção pela linhagem  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  em relação à linhagem selvagem. Em conjunto, os ensaios de virulência indicam que (i) a captação por sideróforos aparenta ser um dos mecanismos mais importantes para obtenção de ferro na infecção por *C. violaceum*; (ii) a captação de ferro pelo sistema de captação de heme é um mecanismo importante, porém secundário aos sideróforos; (iii) a presença de pelo menos um destes mecanismos de captação é necessária para melhor estabelecimento da infecção; (iv) o combate à infecção causada pela linhagem  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  parece ocorrer em momentos mais avançados da infecção, uma vez que a carga bacteriana no fígado e no baço dos animais foi semelhante à da linhagem selvagem após 20 horas.



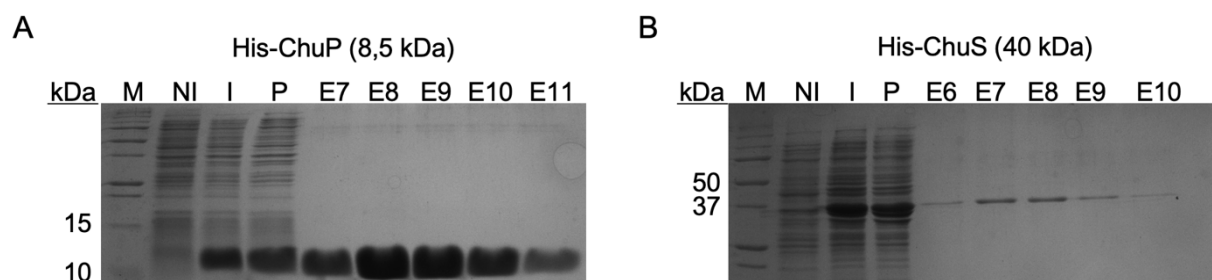
**Figura 19: Ensaio de sobrevivência animal após infecção com linhagens de *C. violaceum*.** A sobrevivência de camundongos Balb/c após infecção com  $1 \times 10^6$  células bacterianas foi avaliada durante 7 dias. **A.** Curvas de sobrevivência após infecção com as linhagens selvagem e mutantes. **B.** Curvas de sobrevivência após infecção com as linhagens complementadas.



**Figura 20: Ensaio de carga bacteriana em órgãos de animais infectados por *C. violaceum*.** A carga bacteriana nos órgãos de camundongos Balb/c infectados  $1 \times 10^6$  células bacterianas, foi avaliada com 20 horas de infecção. **A.** Carga bacteriana no fígado dos animais infectados com as linhagens selvagem e mutante. **B.** Carga bacteriana no baço dos animais infectados com as linhagens selvagem e mutante.

#### 4.6. Caracterização das proteínas ChuP e ChuS de *C. violaceum*

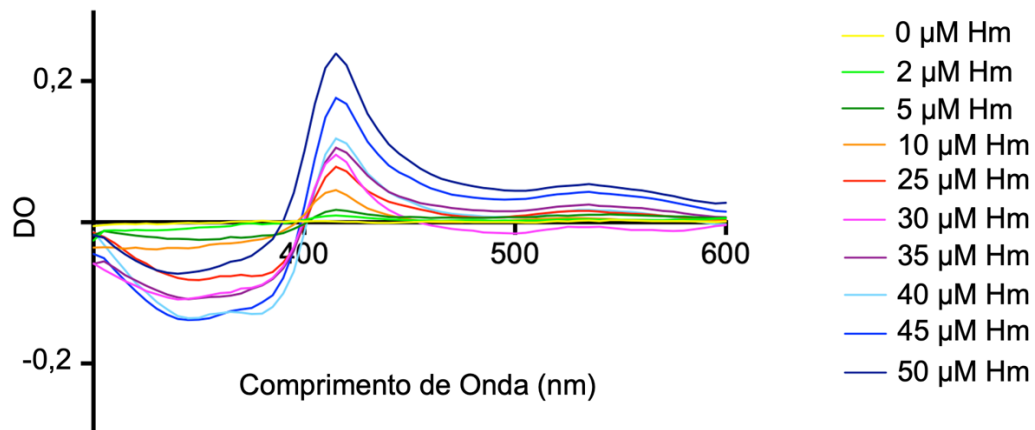
Para melhor compreensão das estratégias de regulação e degradação de heme desempenhadas pelas proteínas ChuP e ChuS do operon *chuPRSTUV*, estas foram expressas de modo heterólogo em *E. coli* BL21(DE3). As regiões codificadoras dos respectivos genes foram clonadas no vetor pET-15b e, após expressão, as proteínas recombinantes com caudas de histidina (His-ChuP e His-ChuS) foram purificadas em coluna de níquel. A eficiência das induções e as purificações foi então avaliada por SDS-PAGE em géis de 18% e 15% poliacrilamida para His-ChuP (8,5 kDa) e His-ChuS (40 kDa), respectivamente (Figura 21). Para a proteína ChuP foi observada alta eficiência na indução e na sua purificação (Figura 21A). Apesar da pouca resolução do gel para uma proteína pequena como ChuP, esta apresentou tamanho próximo ao esperado (Figura 21A) e o sequenciamento confirmou a clonagem correta da região codificadora do gene *chuP* no pET-15b. Para a proteína ChuS, embora a indução tenha sido forte, a maior parte da proteína ficou insolúvel no *pellet* após indução, o que resultou em baixa eficiência na purificação de ChuS a partir da fração solúvel (Figura 21B). As tentativas de uso de protocolos alternativos de indução e purificação da proteína a partir de maiores volumes de cultura, ou a combinação de múltiplas purificações, não permitiram a obtenção de ChuS em níveis suficientes para determinar sua afinidade e potencial capacidade de degradação de heme.



**Figura 21: Análise da indução e purificação das proteínas ChuP e ChuS recombinantes por SDS-PAGE.** A eficiência de indução e purificação das proteínas foi avaliada. **A.** SDS-PAGE em gel 18% poliacrilamida para His-ChuP, sendo observada banda de tamanho desejado. **B.** SDS-PAGE em gel 15% poliacrilamida para His-ChuS, sendo observada banda de tamanho desejado **M.** Marcador Precision Plus Protein (Biorad). **NI.** Culturas não induzidas. **I.** Culturas induzidas por IPTG. **P.** *Pellet* obtido após lise celular. **E6-11.** Frações eluídas com as proteínas purificadas a partir dos sobrenadantes das culturas.

Após purificação, a afinidade da proteína ChuP recombinante a heme foi avaliada. A interação entre proteínas e heme, como no caso das enzimas de degradação, pode ser verificada por espectrofotometria. O aumento na leitura da

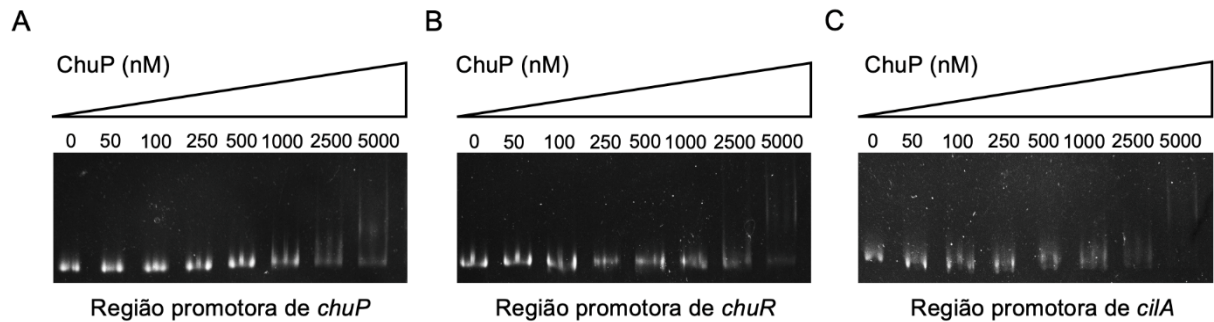
DO<sub>413</sub> quando as proteínas são incubadas em concentrações crescentes de heme indica interação específica proteína-heme (PURI e O'BRIAN, 2006). Ao serem utilizados 10  $\mu\text{M}$  de ChuP, um aumento gradativo na DO<sub>413</sub> foi observado até a maior concentração de 50  $\mu\text{M}$  de Hm testada (Figura 22). Logo, a capacidade de interação da proteína ChuP com heme foi comprovada.



**Figura 22: Ensaio de afinidade da proteína ChuP a heme.** A capacidade de interação entre a proteína ChuP recombinante e heme foi avaliada por ensaio espectrofotométrico. A leitura da DO, entre os comprimentos de 300 a 600 nm, foi coletada em intervalos de 5 nm. Picos observados a 413 nm indicam interação específica proteína-heme. Nestes ensaios foram utilizadas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  de ChuP e concentrações de 0 a 50  $\mu\text{M}$  de Hm. Figura representativa dos ensaios realizados em triplicata. **Hm.** Hemina.

#### 4.7. Análise do papel regulatório de ChuP em *C. violaceum*

Como foi observado que a deleção do gene *chuP* impede a captação de Hm e Hb (Figura 10), além de alterar a atividade de sideróforos (Figura 17), a potencial atividade regulatória de ChuP em *C. violaceum* foi analisada. Inicialmente, foi analisado por EMSA se ocorre interação direta entre a proteína recombinante ChuP e sondas de promotores de DNA (Figura 23). Como sondas de DNA foram utilizadas possíveis regiões de interação específica (regiões promotoras de *chuP* e *chuR*) e inespecífica (região promotora de *cilA*) com ChuP. Ligações entre ChuP e DNA foram detectadas, mas ocorreram de forma inespecífica. Isto porque, somente houve interação a partir de 1  $\mu\text{M}$  de proteína e esta interação ocorreu da mesma forma para os promotores específicos e inespecíficos (Figura 23). Estes dados indicam que caso ChuP regule os genes do operon *chu*, esta regulação parece não ocorrer de modo direto, como se esperaria, caso ChuP atuasse como um fator de transcrição.

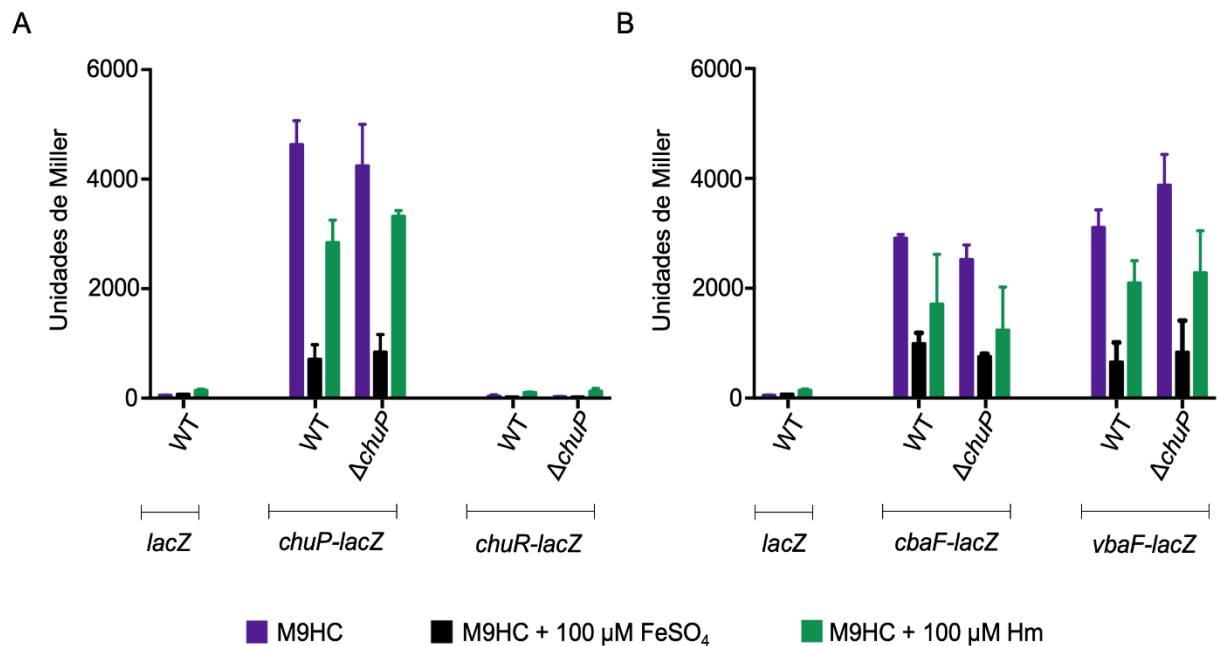


**Figura 23: Ensaio de EMSA para avaliar interação de ChuP com promotores de genes *chu*.** A capacidade de interação da proteína ChuP recombinante com sequências de DNA foi avaliada por EMSA. Concentrações variáveis de 0 a 5000 nM de ChuP foram utilizadas. **A.** EMSA utilizando como sonda de DNA o promotor de *chuP*. **B.** EMSA utilizando como sonda de DNA o promotor de *chuR*. **C.** EMSA utilizando como sonda de DNA o promotor de *cilA*.

Para verificar se ChuP tem atividade regulatória em genes do operon *chu* e em genes envolvidos em síntese de sideróforos, foi utilizado ensaio de  $\beta$ -galactosidase. Para isto, as regiões promotoras dos genes de interesse foram clonadas no vetor pRK/*lacZ*290 e transferidas às linhagens selvagem e  $\Delta$ *chuP*. Então, a expressão do gene *lacZ*, sob controle destes promotores, foi determinada em diferentes condições de carência e suficiência de ferro (Figura 24). A região regulatória do gene *chuP* possui uma sequência de Fur *box* predita e deve conter o promotor de todo o operon *chuPRSTUV* (Figura 5A). Na linhagem selvagem, a expressão deste promotor foi bastante elevada em meio M9HC, diminuiu fortemente na presença de ferro e teve uma pequena diminuição na presença de heme, um padrão característico de genes de captação de ferro (Figura 24A). Porém, a expressão deste promotor não é dependente de ChuP, uma vez que o padrão de atividade observado no mutante  $\Delta$ *chuP* foi o mesmo daquele observado para a linhagem selvagem (Figura 24A). Existe apenas uma pequena região intergênica na frente de *chuR*, e o gene *chuR* é co-transcrito com *chuP* (Figura 5). Consistente com isto, a fusão de *chuR* não mostrou qualquer atividade promotora em nenhuma das condições ou linhagens testadas (Figura 24A).

Com relação à expressão dos genes *cbaF* e *vbaF*, que codificam enzimas envolvidas na síntese dos sideróforos de *C. violaceum* (BATISTA *et al.*, 2019), foi observada atividade promotora similar ao promotor de *chuP*: ambas as fusões apresentaram elevada expressão em meio M9HC, com diminuição em suficiência de ferro e de heme (Figura 23B). Mas, também neste caso, estes promotores não

mostraram regulação dependente de *chuP*, uma vez que no mutante  $\Delta chuP$  o padrão de expressão foi quase idêntico ao visto na linhagem selvagem (Figura 23B).



**Figura 24: Análise do papel regulatório de ChuP em promotores de genes de captação de heme e síntese de sideróforos.** A atividade das regiões promotoras sob possível regulação de ChuP foram avaliadas pelos níveis de expressão do gene *lacZ*. **A.** Ensaio de β-galactosidase com promotores do sistema de captação de heme *chuPRSTUV*. **B.** Ensaio de β-galactosidase com promotores de genes de síntese dos sideróforos. Como controle, foi utilizado o vetor com o gene *lacZ* sem promotor. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

Em conjunto, os dados do EMSA e do ensaio de β-galactosidase analisando o potencial regulatório de ChuP indicam que (i) ChuP não parece atuar como um regulador de transcrição que se liga na região promotora do operon *chuPRSTUV* e nem influencia na atividade do promotor deste operon; (ii) se existe um efeito de ChuP na expressão de *chuR*, não parece ser por regulação transcricional, uma vez que não foi detectado um promotor próprio de *chuR*; (iii) embora ocorra atividade aumentada de sideróforos no mutante  $\Delta chuP$ , ChuP não regula a expressão dos genes *cbaF* e *vbaF*, envolvidos na síntese de sideróforos.



## 5. DISCUSSÃO

O ferro é um micronutriente essencial, sendo o heme uma abundante fonte deste metal encontrada no hospedeiro. A captação de heme é uma das estratégias utilizadas por patógenos durante a infecção para aquisição de ferro. Como uma bactéria oportunista causadora de graves infecções que afetam órgãos envolvidos na homeostase de heme, *Chromobacterium violaceum* desponta como um modelo para estudar os mecanismos de captação de heme. Entretanto, nenhum trabalho identificou previamente as vias de utilização de heme e sua importância na virulência deste patógeno oportunista. Neste trabalho foi identificado um sistema de captação de heme codificado por seis genes encontrados em um *cluster* no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472, os quais nomeamos *chuPRSTUV*. A obtenção e caracterização de mutantes destes genes demonstrou que, com exceção de *chuS*, todos os demais genes são necessários para captação de heme, seja por formar o sistema de transporte (ChuR-ChuTUV) ou por potencialmente ativar o operon (ChuP). A mutação do operon *chu* completo ou do gene *chuP* acarretou em aumentada atividade de sideróforos, indicando que ChuP regula, provavelmente de modo indireto, a produção e/ou captação de sideróforos. De fato, nossos dados de virulência em camundongos demonstraram que em *C. violaceum* há uma hierarquia na importância dos sistemas de captação de ferro durante a infecção, com o sistema de captação de heme assumindo maior relevância na ausência dos sideróforos.

A análise *in silico* do *cluster* CV\_3895-96-97-RS19290-CV\_3898-99 revelou tratar-se de genes de um potencial sistema de utilização de heme, os quais foram então nomeados *chuPRSTUV*, com base nas evidências experimentais obtidas neste trabalho. Estes genes codificam uma proteína da família HemP/HmuP (ChuP), um receptor dependente de TonB de membrana externa (ChuR), uma proteína de degradação e/ou estocagem de heme da família HemS (ChuS) e um sistema de transporte do tipo ABC de membrana interna (ChuTUV). Nossos resultados de RT-PCR e análise de expressão por  $\beta$ -galactosidase demonstraram que estes genes são co-transcritos e mais expressos em carência de ferro, definindo assim uma organização em operon dos genes *chuPRSTUV* em *C. violaceum*. Esta organização gênica do sistema de captação de heme é semelhante àquela das bactérias *B. multivorans*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *P. aeruginosa*, pois nestas bactérias os genes também estão em um *cluster* no genoma e, no caso de *B. multivorans* e *Y.*

*pseudotuberculosis*, estão organizados em operons (SI *et al.*, 2017; SCHWISOW *et al.*, 2018; OTERO-ASMAN *et al.*, 2019). Entretanto, o gene que codifica a proteína da família HemP pode estar presente, como em *B. multivorans*, ou ausente, como em *P. aeruginosa*, no genoma. Quando presente, este gene pode ser encontrado em diferentes regiões do genoma, como em *B. multivorans*, ou próximo ao sistema de captação de heme que regula, como em *Yersinia enterocolitica* (STOJILJKOVIC e HANTKE, 1992; SATO *et al.*, 2017).

Os dados experimentais obtidos por ensaios de estimulação mostraram a necessidade do operon *chuPRSTUV* para captação de heme e hemoglobina, com exceção do gene *chuS*, que codifica uma potencial enzima de degradação de heme. Entretanto, foi detectada uma alta tolerância à citotoxicidade causada pelo heme, pois todas as linhagens mutantes, incluindo o  $\Delta chuS$ , apresentaram crescimento inalterado em concentrações de até 2 mM de heme. Estes resultados apoiam a hipótese da presença em *C. violaceum* de outros mecanismos de degradação e/ou detoxificação de heme, como um possível sistema de exportação. Mecanismos de tolerância a heme foram mais bem descritos em bactéria Gram-positivas. Nestas, sistemas de dois componentes, compostos por uma quinase sensora e um regulador, como HatRT de *Clostridium difficile* e *Streptococcus agalactiae* e HssRS de *Staphylococcus aureus*, regulam a expressão de permeases de efluxo de heme, como a permease HatAB (TORRES *et al.*, 2007; JOUBERT *et al.* 2017; KNIPPEL *et al.*, 2018).

Uma melhor caracterização da proteína ChuS quanto a sua afinidade e capacidade de degradação de heme não pôde ser realizada, pois não foi possível a purificação da proteína em quantidades suficientes, dada a sua pouca solubilidade quando expressa de modo heterólogo. Porém, por análise *in silico* foi possível encontrar os dois domínios de interação com heme nas regiões N- e C-terminais, descritos para a proteína ChuS de *E. coli* (SUITS *et al.*, 2005). A presença de múltiplas enzimas de degradação de heme já foi relatada em bactérias como *P. aeruginosa* (HemO e PhuS), *Ensifer meliloti* (HmuS e HmuQ) e *B. japonicum* (HmuQ e HmuD) (FRIEDMAN *et al.*, 2004; PURI e O'BRIAN, 2006; BARKER *et al.*, 2012; AMARELLE *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2017). Com exceção de PhuS, as demais demonstraram mecanismos de degradação canônica de heme. Para PhuS foi relatado um mecanismo de degradação no qual PhuS atua em conjunto com HemO (LEE *et al.*, 2017). Como em nossas análises *in silico* não encontramos outras potenciais enzimas

de degradação de heme em *C. violaceum* além de ChuS, seria interessante confirmar que ChuS degrada heme, além de identificar outros mecanismos que esta bactéria utiliza para evitar a toxicidade do heme.

Dentre os genes do operon *chu* que codificam o sistema de transporte de heme em si, a deleção dos genes do transportador ABC (*chuTUV*) aboliu totalmente a captação de heme e hemoglobina, enquanto a deleção do gene do TonBdr (*chuR*) aboliu a captação de hemoglobina, mas não impediu completamente a captação de heme (inferência indireta do ensaio de estimulação), sugerindo a presença de outro TonBdr para heme em *C. violaceum*. A presença de múltiplos sistemas de captação de heme já foi demonstrada em *P. aeruginosa* que possui os sistemas Phu, Has e Hxu (OCHSNER *et al.*, 2000; OTERO-ASMAN *et al.*, 2019). Consistente com nossos resultados, em *P. aeruginosa* o mesmo sistema de transporte ABC (PhuTUV) transporta heme captado pelos TonBdr PhuR e HasR (OTERO-ASMAN *et al.*, 2019). Nossos resultados em *C. violaceum* de utilização de heme e hemoglobina dependente de ChuR se assemelham ao observado para *Caulobacter crescentus*, na qual o TonBdr HutA está envolvido na captação tanto de heme como de hemoglobina (BALHESTEROS *et al.*, 2017). Em *Shigella dysenteriae* o mesmo papel para o TonBdr ShuA foi descrito (BURKHARD *et al.* 2007).

Os sistemas de captação de heme podem ser sistemas diretos, com a captação direta de heme por TonBdr, ou indiretos, com captação por hemóforos que sequestram e entregam o complexo heme-hemóforo ao TonBdr. Nos sistemas baseados em hemóforos, como Has e Hxu de *P. aeruginosa*, e Has de *Serratia marcescens*, os TonBdr têm uma extensão N-terminal extra que os torna capazes de atuar em transdução de sinal junto com fatores sigma ECF na ativação de genes do sistema de captação de heme (BIVILLE *et al.*, 2004; WANDERSMAN e DELEPELAIRE, 2012; HUANG e WILKS, 2017; OTERO-ASMAN *et al.*, 2019). Como ChuR e os demais onze TonBdr de *C. violaceum* não possuem extensão N-terminal, nem parece haver genes codificadores de hemóforos nesta bactéria, acreditamos que o sistema ChuPRSTUV atue por captação direta de heme/hemoproteínas. No entanto, devem existir outros mecanismos regulatórios que expliquem, por exemplo, o aumento compensatório na atividade hemolítica observado em ágar sangue, após deleção do TonBdr ChuR.

O comportamento quase uníssono dos mutantes do operon *chu* em não utilizar heme, notado nos ensaios de estimulação, não foi observado nos ensaios de curvas de crescimento em limitação de ferro ou limitação de ferro com suplementação de heme. Nestas curvas podemos claramente dividir as linhagens entre aquelas que não apresentaram dificuldades de crescimento ( $\Delta chuR$ ,  $\Delta chuS$  e  $\Delta chuTUV$ ) e aquelas que foram bastante atrasadas ao longo da curva ( $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$ ), indicando que a deficiência no segundo caso se deve à ausência de ChuP. A ausência de fenótipo para os mutantes do sistema de transporte de heme em si (ChuR-ChuTUV) novamente favorece a hipótese da existência de outro sistema de captação de heme que poderia operar em diferentes concentrações de heme, uma vez que também foram observadas diferenças nas duas situações de carência de ferro/suficiência de heme utilizadas nas curvas de crescimento. Consistente com esta interpretação, foram demonstradas diferenças na atividade de diferentes sistemas de captação de heme presentes concomitantemente em *P. aeruginosa*, cada um apresentando atividades distintas sob diferentes condições de suficiência de heme, ou ainda, diferenças de expressão por efeito compensatório (OTERO-ASMAN *et al.*, 2019).

Dado o fenótipo discutido acima de grande atraso de crescimento em limitação de ferro dos mutantes sem *chuP*, levantamos a hipótese de uma atuação de ChuP sobre a atividade de sideróforos em *C. violaceum*. Isto foi confirmando por ensaio de CAS, sendo observados aumentos nos halos de sideróforos após deleção do gene *chuP* ( $\Delta chuP$  e  $\Delta chuPRSTUV$ ), sugerindo que nestas linhagens estaria ocorrendo um aumento na síntese e/ou uma diminuição na captação de sideróforos. Como ChuP não regulou os genes de síntese de sideróforos *cbaF* e *vbaF* e os mutantes sem *chuP* tiveram severa deficiência no crescimento em carência de ferro, torna-se mais parcimoniosa a hipótese de que nestes mutantes estaria havendo deficiência na captação e, portanto, o acúmulo de sideróforos nas placas CAS. Em *B. multivorans*, uma alteração no fenótipo de atividade de sideróforos também ocorreu com a deleção de HmuP, o ortólogo de ChuP. Porém, ao contrário do que foi observado no nosso trabalho, a deleção de HmuP levou a uma diminuição e não ao aumento nos halos de sideróforos (SATO *et al.*, 2017). Em *P. aeruginosa* foi relatado aumento na produção do sideróforo pioverdina após deleção dos receptores de captação de heme, mas esta bactéria não possui proteínas da família HemP (OTERO-ASMAN *et al.*, 2019).

As proteínas da família HemP/HmuP têm sido descritas como necessárias para utilização de heme por regular a expressão de genes de captação de heme, como relatado para *S. meliloti*, *B. japonicum* e *B. multivorans* (AMARELLE *et al.*, 2010; ESCAMILLA-HERNANDEZ e O'BRIAN, 2012; SATO *et al.*, 2017), embora o mecanismo de regulação ainda seja controverso. Como em *C. violaceum* demonstramos que ChuP é necessária para utilização de heme e afeta a atividade de sideróforos, a proteína ChuP foi mais bem caracterizada *in vitro*. Utilizando um ensaio espectrofotométrico demonstramos que ChuP de *C. violaceum* interage com heme com afinidade semelhante a outras proteínas ligadoras de heme, como as enzimas de degradação de heme HmuS e HmuQ de *Ensifer meliloti* e HmuQ and HmuD de *Bradyrhizobium japonicum* (PURI e O'BRIAN, 2006; AMARELLE *et al.*, 2016). A única proteína da família HemP para a qual já havia sido demonstrada ligação a heme foi HmuP de *B. multivorans* (SATO *et al.*, 2017).

Quanto à regulação exercida por ChuP em genes do operon *chu*, nossos dados indicam que ChuP não regula o promotor do gene *chuP* (ensaio de  $\beta$ -galactosidase) e não se liga *in vitro* nesta região (ensaio de EMSA), assim como não se liga a uma região a frente do gene *chuR*, região esta que não mostrou qualquer atividade promotora. Porém, a atividade do promotor de *chuP*, que contém um Fur *box* predito e parece ser o promotor de todo o operon, foi elevada em limitação de ferro e diminuiu após suplementação com ferro ou heme, apresentando o mesmo padrão de regulação observado para o sistema Phu de *P. aeruginosa* (OTERO-ASMAN *et al.*, 2019). Nossos resultados de ChuP são contrários ao observado em *B. multivorans*, na qual foi observada interação específica entre HmuP e uma sequência palindrômica encontrada *upstream* ao Fur *box* do gene *hmuR* (SATO *et al.*, 2017). Também em *B. japonicum* foi demonstrado que HmuP ativa genes por ligação direta ao DNA (ESCAMILLA-HERNANDEZ e O'BRIAN, 2012), embora proteínas da família HemP/HmuP não apresentem qualquer domínio de ligação ao DNA. Uma proposta alternativa de como HmuP ativa genes de TonBdr de captação de heme foi recentemente publicada (AMARELLE *et al.*, 2019). Foi proposto um possível mecanismo de regulação pós-transcricional em *Ensifer meliloti* por elementos HPRE (HPRE – *HmuP-responsive elements*) presentes na região 5'-UTR do RNA mensageiro de *shmR*, o qual codifica o TonBdr de heme. Tais sequências HPRE foram identificadas *upstream* aos genes dos TonBdr de heme de várias alfa e beta-

proteobactérias, quando presente no genoma o gene que codifica proteínas da família HemP/hmuP, inclusive a frente do gene *chuR* em *C. violaceum* (AMARELLE *et al.*, 2019). Nossos resultados sugerem que ChuP de *C. violaceum* atuaria por um mecanismo de regulação semelhante ao observado em *E. meliloti*. Como nossas fusões promotoras não permitem acessar este mecanismo, outros ensaios de expressão, como qRT-PCR, serão necessários para demonstrar que os níveis de mRNA de *chuR* estão diminuídos no mutante  $\Delta chuP$ , o que explicaria a incapacidade deste mutante utilizar heme por um mecanismo no qual ChuP atua como um ativador pós-transcricional de *chuR*.

Os sistemas de captação de heme estão geralmente relacionados à obtenção de ferro do hospedeiro durante infecções bacterianas (CONTRERAS *et al.*, 2014; HUANG e WILKS, 2017). Em *S. aureus*, uma bactéria que tem preferência por heme como fonte de ferro, mutação nos genes *htsB* e *htsC* do sistema de captação de heme HtsABC causou forte atenuação da virulência em camundongos (SKAAR *et al.*, 2004). Em *Edwardsiella ictaluri*, deleção do gene *hemR* levou a total atenuação de virulência em peixe-bagre (ABDELHAMED *et al.*, 2018). Interessantemente, um duplo papel do receptor de heme HmuR foi identificado em *Burkholderia thailandensis*. Nesta bactéria, HmuR apresenta cisteínas conservadas capazes de alterar a afinidade do receptor entre heme e o complexo formado por zinco e TseZ, uma proteína efetora secretada pelo sistema de secreção do tipo VI. Além disso, a deleção do gene *hmuR* causou atenuação de virulência em *Galleria mellonella* (SI *et al.*, 2017). Tais cisteínas não foram encontradas em ChuR de *C. violaceum*. Os mutantes do operon *chu* de *C. violaceum* tiveram uma atenuação muito pequena na virulência, enquanto o mutante que não produz sideróforos foi bastante atenuado, conforme já descrito (BATISTA *et al.*, 2019). Em *P. aeruginosa*, caracterização de mutantes de diversos sistemas de captação de ferro mostrou clara predominância dos sideróforos em relação ao heme na virulência (MINANDRI *et al.*, 2016). No entanto, em nossa análise de virulência usando um mutante  $\Delta cbaCEBA\Delta chuPRSTUV$  demonstramos que na ausência de ambos os mecanismos de aquisição de ferro (sideróforo e heme) houve drástica atenuação da virulência, evidenciando a importância da atuação em conjunto destes sistemas na patogênese de *C. violaceum*, com o heme tendo um papel crucial na ausência de sideróforos.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho identificamos e caracterizamos o operon *chuPRSTUV* como um sistema de utilização de heme em *Chromobacterium violaceum*, além de determinar que este sistema tem papel na patogenicidade desta bactéria. As principais conclusões do trabalho foram:

- ✓ A bactéria *C. violaceum* utiliza heme e hemoglobina como fontes de ferro via o sistema de utilização de heme codificado por genes do operon *chuPRSTUV*, que além do sistema de transporte de heme (ChuR-ChuTUV) também inclui uma proteína de degradação/estocagem de heme (ChuS) e uma proteína de função regulatória (ChuP);
- ✓ A expressão do operon *chuPRSTUV* é controlada por um promotor a frente do gene *chuP* que responde à presença de ferro e heme, não é influenciado por ChuP e provavelmente é regulado por Fur;
- ✓ A proteína ChuP liga heme *in vitro* e apresenta papel regulatório na atividade de sideróforos e provavelmente na expressão de genes do operon *chu*, possivelmente por um mecanismo de regulação pós-transcricional, já que ChuP não mostrou atividade de ligação ao DNA;
- ✓ A captação de heme em *C. violaceum* se mostrou um mecanismo secundário de captação de ferro em relação aos sideróforos, uma vez que a atenuação de virulência na linhagem  $\Delta chuPRSTUV$  foi bem menor do que na linhagem  $\Delta cbaCEBA$ ;
- ✓ Na ausência de sideróforos o heme passa a ter um papel bastante relevante na infecção por *C. violaceum*, como demonstrado pelo efeito sinérgico de atenuação de virulência no mutante que não produz sideróforo nem utiliza heme.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAMED, H., IBRAHIM, I., BAUMGARTNER, W. *et al.* The virulence and immune protection of *Edwardsiella ictaluri* HemR mutants in catfish. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 72, p. 153-160, 2018.
- AMARELLE, V., KOZIOL, U., ROSCONI, F. *et al.* A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*. **Microbiology**, v. 156, p. 1873-1882, 2010.
- AMARELLE, V., ROSCONI, F., LÁZARO-MARTINEZ, J. M. *et al.* HmuS and HmuQ of *Ensifer/Sinorhizobium meliloti* degrade heme *in vitro* and participate in heme metabolism *in vivo*. **Biometals**, v. 29, p. 333-347, 2016.
- AMARELLE, V., KOZIOL, U., FABIANO, E. Highly conserved nucleotide motifs present in the 5'UTR of the heme-receptor gene *shmR* are required for HmuP-dependent expression of *shmR* in *Ensifer meliloti*. **Biometals**, v. 32, p. 273-291, 2019.
- ARMITAGE, A. E., EDDOWES, L. A., GLIADI, U. *et al.* Heparin regulation by innate immune and infectious stimuli. **Blood**, v. 118, p. 4129-4139, 2011.
- ARULDASS, C. A., MASALAMANY, S. R. L., VENIL, C. K., *et al.* Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 25, p. 5164-5180, 2018.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., *et al.* **Short Protocols in Molecular Biology**. 3<sup>rd</sup> Edition. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, 1992.
- BALHESTEROS, H., SHIPELSKIY, Y., LONG, N. J., *et al.* TonB-dependent heme/hemoglobin utilization in *Caulobacter crescentus* HutA. **J. Bacteriol.**, v. 199, n. 6, p. e00723-16, 2017.
- BALIBAR, C. J., WALSH, C. T. *In vitro* biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. **Biochem.**, v. 45, p. 15444-15447, 2006
- BARKER, K. D., BARKOVITS, K., WILKS, A. Metabolic flux of extracellular heme uptake in *Pseudomonas aeruginosa* is driven by the iron-regulated heme oxygenase (HemO). **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 22, p. 18342-18350, 2012.
- BATISTA, B. B., SANTOS, R. E. R. S., RICCI-AZEVEDO, R. *et al.* Production and uptake of distinct endogenous catecholate-type siderophores are required for iron acquisition and virulence in *Chromobacterium violaceum*. **Infect. Immun.**, v. 87, n. 12, p. e00577-19, 2019.
- BATISTA, J. H., DA SILVA NETO, J. F. *Chromobacterium violaceum* pathogenicity: Updates and insights from genome sequencing of novel *Chromobacterium* species. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 2213, 2017.
- BENEVIDES-MATOS, N., BIVILLE, F. The Hem and Has haem uptake systems in *Serratia marcescens*. **Microbiology**, v. 156, p. 1749-1757, 2010.



- BIVILLE, F., CWERMAN, H., LÉTOFFÉ, S. *et al.* Haemophore-mediated signaling in *Serratia marcescens*: a new mode of regulation for an extra cytoplasmic function (ECF) sigma factor involved in haem acquisition. **Mol. Microbiol.**, v. 53, n. 4, p. 1267-1277, 2004.
- BRAUN, V., HANTKE, K. Recent insights into iron import by bacteria. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 15, p. 328-334, 2011.
- BURKHARD, K. A., WILKS, A. Characterization of the outer membrane receptor ShuA from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae*. Substrate specificity and identification of the heme protein ligands. **J. Biol. Chem.**, v. 18, n. 282, p. 15126-15136, 2007.
- CASSAT, J. E., SKAAR, E. P. Iron in Infection and Immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 13, p. 509-519, 2013.
- CHOBY, J. E., SKAAR, E. P. Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens. **J. Mol. Biol.**, v. 428, p. 3408-3428, 2016.
- CONTRERAS, H., CHIM, N., CREDALI, A., *et al.* Heme uptake in bacterial pathogens. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 19, p. 34-41, 2014.
- CUSSIOL, J. R. R., ALEGRIA, T. G. P., SZWEDA, L. I. *et al.* Ohr (organic hydroperoxide resistance protein) possesses a previously undescribed activity, lipoly-dependent peroxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 29, p. 21943-21950, 2010.
- DA SILVA NETO, J. F., BRAZ, V. S., ITALIANI, V. C. S. *et al.* Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 14, p. 4812-1825, 2009.
- DA SILVA NETO, J. F., LOURENÇO, R. F., MARQUES, M. V. Global transcriptional response of *Caulobacter crescentus* to iron availability. **BMC Genomics**, v. 14, p. 1-16, 2013.
- DA SILVA NETO, J. F., NEGRETTO, C. C., NETTO, L. E. S. Analysis of the organic hydroperoxide response of *Chromobacterium violaceum* reveals that OhrR is a Cys-based redox sensor regulated by thioredoxin. **PLoS One**, v. 7, e47090, 2012.
- DURÁN, N., MENCK, C. F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 201-222, 2001.
- EAKANUNKUL, S., LUKAT-RODGERS, G. S., SUMITHRAN, S., *et al.* Characterization of the periplasmic heme-binding protein ShuT from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae*. **Biochem.**, v. 44, p. 13179-13191, 2005.
- ESCAMILLA-HERNANDEZ, R., O' BRIAN, M. R. HmuP is a coactivator of Irr-dependent expression of heme utilization genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.**, v. 194, p. 3137-3143, 2012.

- FOURNIER, C., SMITH, A., DELEPELAIRE, P. Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. **Mol. Microbiol.**, v. 80, p. 133-148, 2011.
- FRIEDMAN, J., LAD, L., LI, H. *et al.* Structural basis for novel d-regioselective heme oxygenation in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemistry**. v. 43, p. 5239-5245, 2004.
- GANZ, T., NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 500-510, 2015.
- GOBERT, J. W., SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3'enhancer and IHF binding elements. **Mol. Biol. Cell.**, v. 3, n.8, p. 913-926, 1992.
- HASHIMI, S. M., XU, T., WEI, M. Q. Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. **Oncol. Rep.**, v. 33, p. 1731-1736, 2015.
- HANAHAN, D. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.
- HOOD, M. I., SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 10, p. 525-537, 2012.
- HUANG, W., WILKS, A. Extracellular heme uptake and the challenge of bacterial cell membranes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 86, p. 799-823, 2017.
- IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 11, p. 443-454, 2013.
- IMMANUEL, S. R. C., BANERJEE, D., RAJANKAR, M. P., *et al.* Integrated constraints based analysis of an engineered violacein pathway in *Escherichia coli*. **Biosystems**, v. 171, p. 10-19, 2018 .
- JOUBERT, L., DAGIEU, J., FERNANDEZ, A. *et al.* Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. **Sci. Rep.** v. 7, p. 40435, 2017.
- JUSTO, G. Z., DURÁN, N. Action and function of *Chromobacterium violaceum* in health and disease: Violacein as a promising metabolite to counteract gastroenterological diseases. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 31, p. 649-656, 2017.
- KHALIFA, S. M. A., KHALDI, T. A., ALQAHTANI, M. M., *et al.* Two siblings with fatal *Chromobacterium violaceum* sepsis linked to drinking water. **BMJ Case Rep.**, bcr2015210987, p. 1-6, 2015.
- KNIPPEL, R. J., ZACKULAR, J. P., MOORE, J. L. *et al.* Heme sensing and detoxification by HatRT contributes to pathogenesis during *Clostridium difficile* infection. **PLOS Pathog.**, v. 14, n. 12, p. e1007486, 2018.

- KRIEG, S., HUCHÉ, F., DIEDERICHS, K., *et al.* Heme uptake across the outer membrane revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, p. 1045-1050, 2009.
- KUMAR, M. R. *Chromobacterium violaceum*: A rare bacterium isolated from a wound over the scalp. **Int. J. Appl. Basic Med. Res.**, v. 2, p. 70-72, 2012.
- LAMATTINA, J. W., NIX, D. B., LANZILOTTA, W. N. Radical new paradigm for heme degradation in *Escherichia coli* O157:H7. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 113, p. 12138-12143, 2016.
- LEE, J., KIM, J. S., NAHM, C. H., *et al.* Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2068-2070, 1999.
- LEE, M. J. Y., WANG, Y., JIANG, Y. *et al.* Function coupling mechanism of PhuS and HemO in heme degradation. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 11273, p. 1-9, 2017.
- LÉTOFFÉ, S., REDEKER, V., WANDERSMAN, C. Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 1223-1234, 1998.
- LYLES, K. V., EICHENBAUM, Z. From host heme to iron: The expanding spectrum of heme degrading enzymes used by pathogenic bacteria. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 8, p. 198, 2018.
- MARTINEZ, R., VELUDO, M. A. S. L., SANTOS, V. R., *et al.* *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case report. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 42, p. 111-113, 2000.
- MALTEZ, V. I., TUBBS, A. L., COOK, K. D., *et al.* Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium. **Immunity**, v. 43, p. 987-997, 2015.
- MATSUI, T., NAMBU, S., ONO, Y., *et al.* Heme degradation by *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than carbon monoxide. **Biochem.**, v. 52, p. 3025-3027, 2013.
- MATSUURA, N., MIYOSHI, M., DOI, N., *et al.* Multiple liver abscesses with a skin pustule due to *Chromobacterium violaceum*. **Inter. Med.**, v. 56, p. 2519-2522, 2017.
- MCCLEAN, K. H., WINSON, M. K., FISH, L., *et al.* Quorum-sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, p. 3703-3711, 1997.
- MEHER-HOMJI, Z., MANGALORE, R. P., JOHNSON, P. D. R., *et al.* *Chromobacterium violaceum* infection in chronic granulomatous diseases: a case report and review of the literature. **JMM Case Rep.**, v. 4, p. 1-5, 2017.

- MEY, A. R., WYCKOFF, E. E., KANUKURTHY, V., *et al.* Iron and *fur* regulation in *Vibrio cholerae* and the role of *fur* in virulence. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 8167-8178, 2005.
- MIAO, E. A., LEAF, I. A., TREUTING, P. M., *et al.* Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nat. Immunol.**, v. 11, p. 1136-1142, 2010.
- MIKI, T., IGUCHI, M., AKIBA, K., *et al.* *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. **Mol. Microbiol.**, v. 77, p. 855-872, 2010.
- MINANDRI, F., IMPERI, F., FRANGIPANI, E., *et al.* Role of iron uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence and airway infection. **Infect. Immun.**, v. 84, n. 8, p. 2324-2335, 2016.
- NAMBU, S., MATSUI, T., GOULDING, C.W. *et al.* A new way to degrade heme: the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO. **J. Biol. Chem.**, v. 288, p. 10101-10109, 2012.
- NELSON, D., COX, M. **Lehninger principles of biochemistry (4th ed.)**. W.H. Freeman and Company, New York, 1216 pp, 2005.
- NOINAJ, N., GUILLIER, M., BARNARD, T. J., *et al.* TonB-dependent transporters: regulation, structure and function. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 64, p. 43-60, 2010.
- OCHSNER, U. A., JOHNSON, Z., VASIL, M. L. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 146, p. 185-198, 2000.
- OTTERO-ASMAN, J.R., GARCÍA-GARCÍA, A.I., CIVANTOS, C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. **Environ. Microbiol.**, v. 12, p. 4629-4647, 2019.
- PALMER, L. D., SKAAR, E. P. Transition metals and virulence in bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, v. 50, p. 67-91. 2016.
- PANT, N. D., SHARMA, M. Urinary tract infection caused by *Chromobacterium violaceum*. **Int. J. Gen. Med.**, v. 8, p. 293-295. 2015.
- PARROW, N. L., FLEMMING, R. E., MINNICK, M. F. Sequestration and scavenging of iron in infection. **Infect. Immun.**, v. 81, p. 3503-3514, 2013.
- PURI, S., O'BRIAN, M. R. The *hmuQ* and *hmuD* genes from *Bradyrhizobium japonicum* encode heme-degrading enzymes. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 18, p. 6476-6482, 2006.
- RATLIFF, M., ZHU, W., DESHMUKH, R., *et al.* Homologues of neisserial heme oxygenase in Gram-negative bacteria: Degradation of heme by the product of the *pigA* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 6394-6403, 2001.

- RICHARD, K. R., LOVVORN, J. J., OLIVER, S. E., *et al.* *Chromobacterium violaceum* sepsis: Rethinking conventional therapy to improve outcome. **Am. J. Case Rep.**, v. 16, p. 740-744, 2015.
- ROBERTS, R. C., TOOCHINDA, C., AVEDISSIAN, M. *et al.* Identification of *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 7, p. 1829-1841, 1996.
- ROSSI, E. Hepcidin - the iron regulatory hormone. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 26, p. 47-49, 2005.
- RUNYEN-JANECKY, L. J. Role and regulation of heme iron acquisition in Gram-negative pathogens. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 3, p. 55, 2013.
- SARVAN, S., BUTCHER, J., STINTZI, A., *et al.* Variation on a theme: investigating the structural repertoires used by ferric uptake regulator to control gene expression. **Biometals**, v. 31, n. 5, p. 681-704, 2018.
- SATO, T., NONOYAMA, S., KIMURA, A., *et al.* The small protein HemP is a transcriptional activator of the heme uptake operon in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. **App. Environm. Microbiol.**, v. 83, e00479-17, 2017.
- SCHWIESOW, L., METTERET, E., WEI, Y. *et al.* Control of *hmu* heme uptake genes in *Yersinia pseudotuberculosis* in response to iron sources. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 8, n. 47, p. 1-13, 2018.
- SHELDON, J. R., LAAKSO, H. A., Heinrichs, D. E. Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. **Microbiol. Spectr.**, v. 4, p. 1-32, 2016.
- SI, M., WANG, Y., ZHANG, B. *et al.* The type VI secretion system engages a redox-regulated dual-function heme transporter for zinc acquisition. **Cell Rep.**, v. 20, p. 949-959, 2017.
- SIMON, R., PRIEFER, U., PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.
- SIQUEIRA, I. C., DIAS, J., RUF, H., *et al.* *Chromobacterium violaceum* in siblings, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 1443-1445, 2005.
- SKAAR, E. P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. **PLoS Pathog**, v. 6, e1000949, 2010.
- SKAAR, E. P., HUMAYUN, M., BAE, T., DEBORD, K. L., SCHNEEWIND, O. Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1626-1628, 2004.
- SOARES, M. P., WEISS, G. The Iron age of host-microbe interactions. **EMBO Rep.**, v. 16, p. 1482-1500, 2015.

- STOJILJKOVIC, I., HANTKE, K. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. **EMBO Journal**, v. 11, n. 12, p. 4359-4367, 1992.
- SUITS, M. D., PAL, G. P., NAKATSU, K., *et al.* Identification of an *Escherichia coli* O157:H7 heme oxygenase with tandem functional repeats. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 102, p. 16955-16960, 2005.
- TIWARI, S., PATTANAIK, S., BERIHA, S. S., *et al.* Nonpigmented strain of *Chromobacterium violaceum* causing neonatal septicemia: A rare case report. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v. 60, p. 427-429, 2017.
- TORRES, V. J., STAUFF, D. L., PISHCHANY, G. *et al.* A *Staphylococcus aureus* regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. **Cell Host Microbe**, v. 1, n. 2, p. 109-110, 2007.
- VASCONCELOS, A. T. R., ALMEIDA, D. F., HUNGRIA, M., *et al.* The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 11660-11665, 2003.
- WANDERSMAN, C., DELEPELAIRE, P. Haemophore functions revisited. **Mol. Microbiol.**, v. 85, p. 618-631, 2012.
- WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1790, p. 600-605, 2009.
- WILKS, A., HEINZL, G. Heme oxygenation and the widening paradigm of heme degradation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 544, p. 87-95, 2014.
- WILKS, A., IKEDA-SATO, M. Heme utilization by pathogenic bacteria: Not all pathways lead to biliverdin. **Acc. Chem. Res.**, v. 47, p. 2291-2298, 2014.
- YANG, C. H., LI, Y. H. *Chromobacterium violaceum* infection: a clinical review of an important but neglected infection. **J. Clin. Med. Assoc.**, v. 74, p. 435-441, 2011.
- ZHU, W., WILKS, A., STOJILJKOVIC, I. Degradation of heme in Gram-negative bacteria: The product of the *hemO* gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6783-6790, 2000.