

NAARA MARCONDES DOS SANTOS

ESTUDO DO TRANSPORTE DE FERRO
EM *CAULOBACTER CRESCENTUS*

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

São Paulo

2019



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

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

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

São Paulo, 22 de novembro de 2016.

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

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

Declaro, para os devidos fins, que

Naara Marcondes dos Santos

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

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



Helayne Freitas
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos



Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt
Diretor do ICB

Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos"

1ª aula:

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

2ª aula:

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

3ª aula:

Resíduos Químicos
Produtos Químicos Controlados
Tarefas dos Laboratórios do ICB

RESUMO

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

Caulobacter crescentus é uma α -proteobacteria oligotrófica que vive em ambientes aquáticos e pode colonizar ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes, sofrendo constantemente com a carência nutricional. Os transportadores dependentes de TonB (TBDT) realizam o transporte de ferro ligado a sideróforos através da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Quando *C. crescentus* se encontra em carência de ferro, quatro TBDTs são altamente expressos, sendo eles codificados por CCNA_00138, CCNA_00028, CCNA_03023 e CCNA_02277 (*HutA*). *C. crescentus* NA1000 apresenta ainda em seu genoma dois genes que codificam proteínas TonB (CCNA_02419 e CCNA_02412), que são os componentes energizadores do transporte. Este trabalho buscou elucidar qual fonte de ferro é transportada por cada um destes quatro receptores e o papel de cada uma das proteínas TonB. Uma análise de sequências de aminoácidos entre os TBDTs mostrou que essas proteínas apresentam sequências pouco conservadas entre elas, diferentemente das proteínas TonB, que apresentam uma alta conservação. Uma análise estrutural foi efetuada por modelagem para todas as proteínas estudadas a fim de se caracterizar essas proteínas em *C. crescentus*, e foi possível identificar algumas regiões conservadas nos TBDTs, como o TonB Box e *plug*. Foram construídas linhagens mutantes para os seis genes codificando os TBDT e as proteínas TonB de *C. crescentus*. Para a análise fenotípica desses mutantes realizamos ensaios de crescimento e de viabilidade em diferentes fontes de ferro, onde somente o Δ 00028 apresentou um crescimento diferente quando comparado a linhagem selvagem NA1000, e pode estar envolvido com transporte de íons férricos. As linhagens Δ *tonB* não apresentaram nenhuma diferença de crescimento perante as fontes de ferro testadas, mas ensaios de crescimento em placas na presença de diferentes fontes de carbono mostraram crescimento diferente entre as linhagens mutantes e selvagens, em algumas dessas fontes. Mutações sitio-dirigidas no gene *hutA* foram realizadas alterando alguns aminoácidos para cisteína, para futuramente verificar quais seriam os aminoácidos nos *loops* importantes para o reconhecimento e transporte do sideróforo.

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

ABSTRACT

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

Caulobacter crescentus is an oligotrophic α -proteobacterium that lives in aquatic environments and can colonize environments with little availability of nutrients constantly suffering from nutritional deficiency. TonB dependent transporters (TBDT) transport iron bound to siderophores through the outer membrane of Gram-negative bacteria. When *C. crescentus* is in iron deficiency, four TBDT are highly expressed, encoded by CCNA_00138, CCNA_00028, CCNA_03023, and CCNA_02277 (*HutA*). *C. crescentus* NA1000 presents in its genome two genes encoding TonB proteins (CCNA_02419 and CCNA_02412), which are the energizing components of the transport. This work aimed to elucidate which iron source is transported by each of these four receptors and the role of each of the TonB proteins. Amino acid sequence analyses of the TBDTs showed that these proteins present little conservation among them, unlike the TonB proteins that present high conservation. A structural analysis was carried out by modeling all studied proteins in order to characterize these proteins in *C. crescentus*, and it was possible to identify some conserved regions in the TBDTs, such as the TonB box and the plug. Mutant strains were constructed for the six *C. crescentus* genes encoding TBDT and TonB proteins. In the phenotypic analysis of these mutants, growth and viability assays were carried out in different iron sources, and only Δ 00028 presented a different growth pattern when compared to the NA1000 wild type strain, and could have a role in transporting ferric ions. The Δ *tonB* strains did not show any difference in growth with the iron sources tested, but growth assays in plates with different carbon sources, showed differences in growth between mutant and wild type strains, for some of the sources. Site-directed mutagenesis in *hutA* we carried out substituting some residues for Cysteine, in order to verify which amino acids in the loops are important for siderophore recognition and transport.

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

1. INTRODUÇÃO

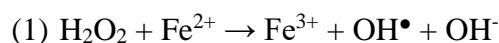
1.1 Homeostase de ferro em bactérias

Muitos nutrientes e minerais são necessários para a sobrevivência e manutenção das funções celulares, sejam elas em condições normais ou de estresse, como fósforo, enxofre, zinco e ferro. Esses nutrientes são importantes pois desempenham funções celulares tais como, por exemplo, o fósforo, que pode ser encontrado no íon fosfato (PO_4^{3-}) e é essencial para a síntese dos ácidos nucleicos e de fosfolipídios que compõem a membrana celular; já o enxofre pode ser obtido através de fontes naturais que incluem o íon sulfato (SO_4^{2-}), e é utilizado para sintetizar aminoácidos e vitaminas, como a tiamina e biotina.

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

Por ser um micronutriente essencial o ferro normalmente é utilizado como grupo prostético ou cofator de proteínas envolvidas em funções como fixação de nitrogênio, síntese de aminoácidos, ciclo do ácido cítrico e outros processos importantes como a biossíntese de DNA, respiração, transporte de oxigênio e produção de H_2 (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; CHU et al., 2010). A incorporação do ferro em proteínas pode ser realizada de forma simples ou na forma de grupos heme e complexos ferro-enxofre (BEINERT; HOLM; MÜNCK;, 2007).

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



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

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

1.2 Captação e armazenamento de ferro

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

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

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

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

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

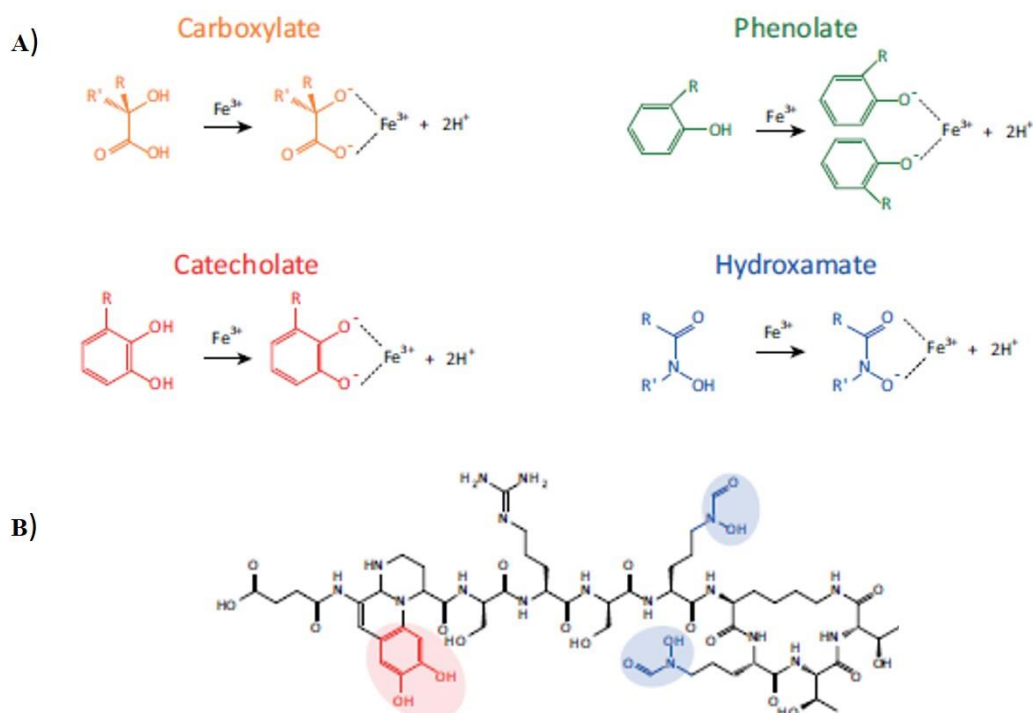


Figura 1 – Exemplo representativo dos diferentes grupos de sideróforos. (A) Demonstração das quatro regiões que atribuem a capacidade de ligação do ferro aos sideróforos: Carboxilato (laranja), Fenolatos (verde), Catecolato (vermelho) e Hidroxamato (azul). (B) Demonstração dos sideróforos de tipo misto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

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

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

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

Após sintetizados, os sideróforos são liberados no meio extracelular e se ligam aos íons de ferro originando assim um complexo sideróforo-Fe³⁺. Em bactérias Gram-negativas, o transporte de sideróforos para o interior da célula não é possível por difusão, devido ao tamanho do complexo formado que impossibilita sua passagem pelas porinas presentes na membrana externa. Assim, foi necessário o desenvolvimento de um mecanismo de transporte eficiente por proteínas específicas localizadas na membrana externa para que o complexo consiga chegar ao periplasma e logo após ao citoplasma da célula. Esse transporte é caracterizado por ser um transporte dependente de energia, a qual é obtida pelas proteínas presentes na membrana citoplasmática, compondo assim o sistema TonB-ExbB-ExbD (FERGUSON; DEISENHOFER, 2004; JOHNSTONE; NOLAN, 2015; WINKELMANN, 2002).

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

1.3 Transportadores dependentes de TonB (TDTB)

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

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

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

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

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

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

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

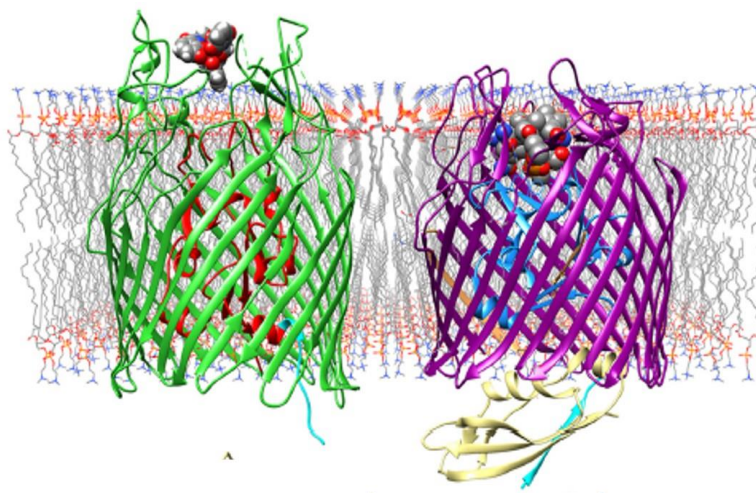


Figura 2 – Representação dos transportadores dependentes de TonB (TBDT). Os transportadores dependentes de TonB, estão localizados na membrana externada das células Gram-Negativas, situados entre a bicamada lipídica. São formados por um barril composto por 22 fitas β antiparalelas (verde e roxo) ao topo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

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

1.4 Sistema TonB-ExbB-ExbD

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

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

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

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

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

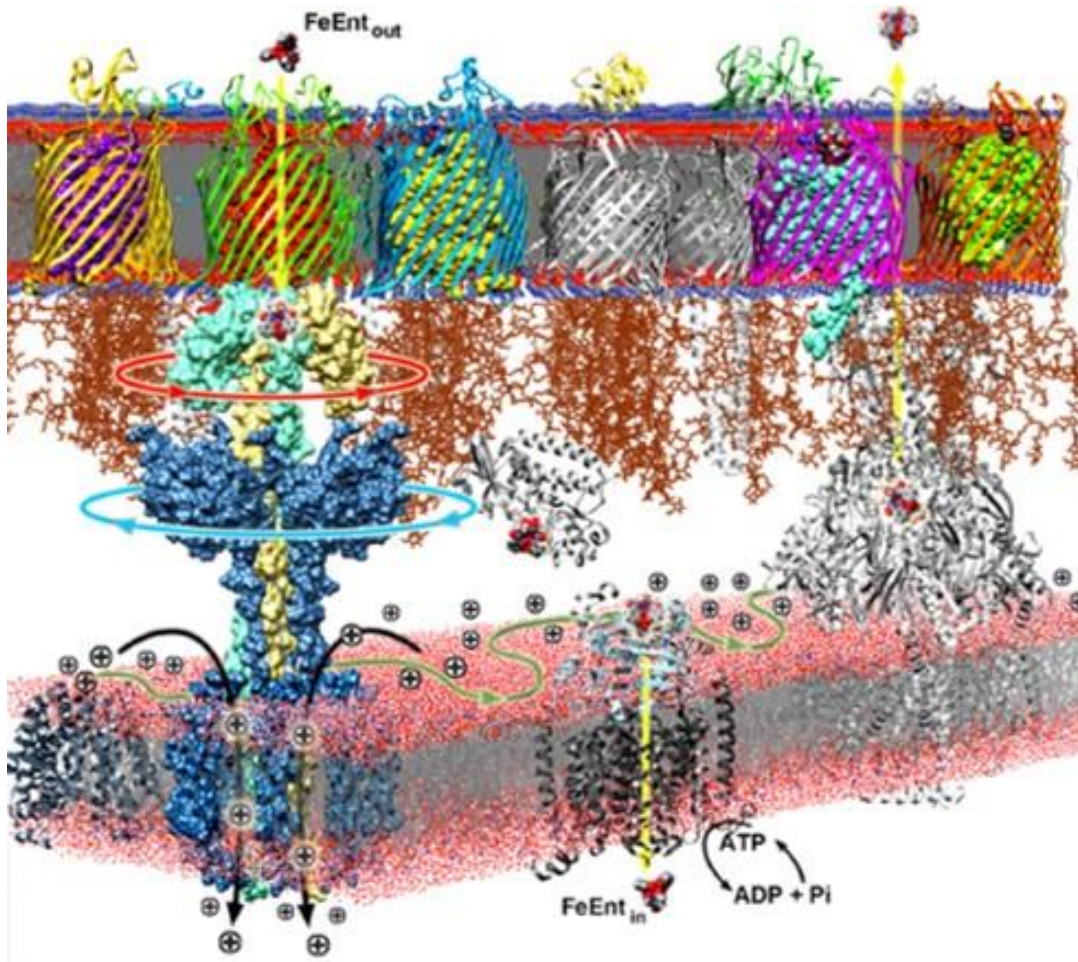


Figura 3 – Esquema do modelo do sistema TonB-ExbB-ExbD. Representação de todas as etapas do transporte de ferro em bactérias Gram-Negativas mediado por sideróforos. Na membrana externa é possível ver os β -barris, que é por onde os sideróforos passam, logo em seguida, no periplasma, é possível ver a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

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

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

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

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

1.5 Regulação gênica dependente de ferro

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

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

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

1.6 *Caulobacter crescentus*

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

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

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

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

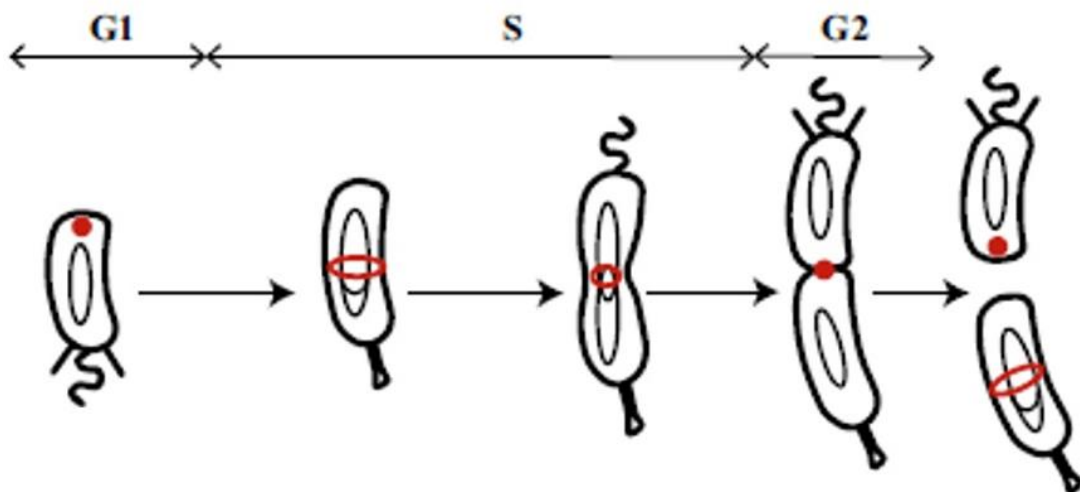


Figura 4 – Representação do ciclo celular de *C. crescentus*. Aparecem indicados os estágios morfológicos e os estágios divisão celular (G1, S e G2). A fase G1 ocorre na célula flagelada, a qual antecede a replicação do DNA (fase S). No decorrer da fase S, a célula móvel perde o flagelo e no mesmo local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

Todo o ciclo celular de *C. crescentus* é regulado por reguladores globais: CtrA, GcrA, DnaA e CcrM, onde a estabilidade dessas proteínas são controladas durante o ciclo. A proteína

CtrA é um fator de transcrição além de ser o regulador central, ele basicamente atua impedindo que a DnaA realize a sua função impedindo a replicação da célula (BEROUAL; BRILLI; BIONDI, 2018).

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

Em *C. crescentus* foram identificados 62 genes que codificam proteínas de membrana externa que são transportadores dependentes de TonB (TBDT) (LOCHER et al., 1998; MARKS et al., 2010; NIERMAN et al., 2001). Estes genes são responsáveis pelo transporte de nutrientes essenciais a célula, como por exemplo açúcares, vitamina B12, ferro e outros metais (NEUGEBAUER et al., 2005). Entretanto, dentre esses 62 genes, em condições limitantes de ferro foram identificados quatro transportadores dependentes de TonB (TBDT) sendo eles: CCNA_00138, CCNA_00028, CCNA_03023, CCNA_02277 estritamente regulados por Fur, ou seja, na presença de ferro na célula esses genes são reprimidos (SILVA NETO; LOURENÇO; MARQUES, 2013).

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

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

SIDERÓFOROS
Aspercromo B1
Aspercromo B2
Aspercromo C
Aspercromo D1
Ferricromo A
Ferricromo C
Ferricrisina
Ferricrocina
Ferrirrodina
Ferrirrubina
Malonicromo
Ferricromo tetraglicina

Através desta varredura, observou que *C. crescentus* não utiliza sideróforos de outras categorias, não apresentando crescimento em sideróforos catecóis e nem de função mista. Porém com o início deste trabalho, constatamos que o transportador (TBDT) codificado pelo gene CCNA_02277 é capaz de transportar o sideróforo hemina/hemoglobina, algo não esperado, dado que *C. crescentus* não é uma bactéria patogênica. Como a utilização desse tipo de sideróforo é observado em patógenos, a utilização de hemina ou hemoglobina por *C. crescentus* provavelmente pode estar relacionada à presença destes componentes oriundos da decomposição de matéria orgânica, nos ambientes aquáticos na qual a mesma vive. O transportador de heme foi identificado como *hutA* (BALHESTEROS et al., 2017; CONTRERAS et al., 2014; KREWULAK; VOGEL, 2008).

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

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

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

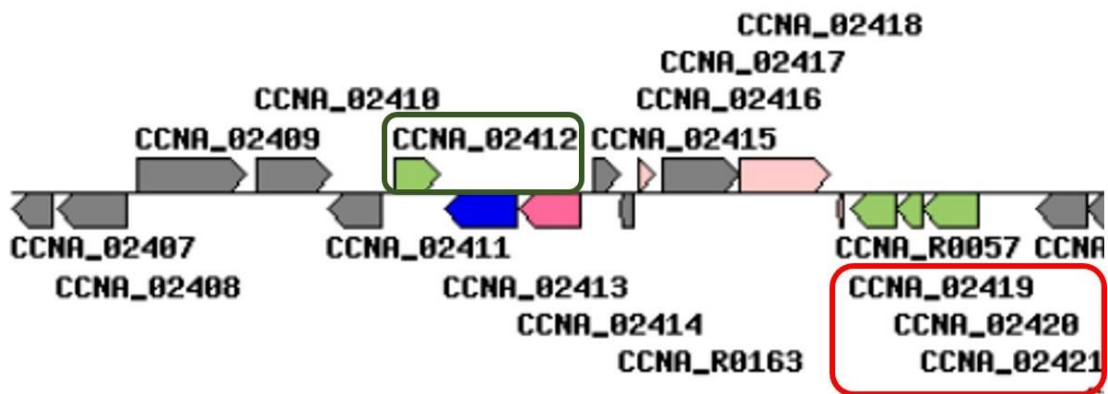


Figura 5 – Localização dos genes *tonB* de *C. crescentus*. Mapa do cromossomo de *C. crescentus* NA1000 mostrando na caixa vermelha o operon contendo *tonB1* e a caixa verde o gene *tonB2*. Imagem retirada do KEGG (www.genome.jp/kegg/).

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

2. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHIMENTO, D. P.; KADNER, R. J.; WIENER, M. C. Comparative Structural Analysis of TonB-Dependent Outer Membrane Transporters: Implications for the Transport Cycle. v. 251, n. November 2004, p. 240–251, 2005b.

CHU, B. C. et al. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. **BioMetals**, v. 23, n. 4, p. 601–611, 2010.

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

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

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

CURTIS, P. D.; BRUN, Y. V. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 1, p. 13–41, mar. 2010.

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

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

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

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

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

FERGUSON, A. D. et al. Siderophore-Mediated Iron Transport: Crystal Structure of FhuA with Bound Lipopolysaccharide. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2215–2220, 1998b.

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

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

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

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

GONZÁLEZ, A. et al. Expanding the role of FurA as essential global regulator in cyanobacteria. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–22, 2016.

GOTTESMAN, S.; MASSE, E. A small RNA regulates the expression of genes

involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. v. 99, n. 7, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis , nature and utility of universal iron chelator – Siderophore : A review. **Microbiological Research**, n. October, p. 0–1, 2017.

KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. **Microbiological Research**, v. 212–213, n. August, p. 103–111, 2018.

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

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

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

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

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. TonB or not TonB: is that the question? This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled CSBMCB 53rd Annual Meeting — Membrane Proteins in Health and Disease, and has undergone the Journal's usual

peer review process. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 89, n. 2, p. 87–97, 2011.

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

LOCHER, K. P. et al. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: Crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. **Cell**, v. 95, n. 6, p. 771–778, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

NOINAJ, N. et al. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. 2010.

OGIERMAN, M.; BRAUN, V. Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: Studies of the FecA TonB box. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1870–1885, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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