

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Campus de Bragança Paulista

LEONARDO PRADO STUCHI

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DO
SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE FERRO REGULADOS
PELO REPRESSOR FUR EM *Klebsiella pneumoniae*

Bragança Paulista

2012

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Campus de Bragança Paulista

LEONARDO PRADO STUCHI

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DO
SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE FERRO REGULADOS
PELO REPRESSOR FUR EM *Klebsiella pneumoniae*

ORIENTADOR

PROF. DR. LÚCIO FÁBIO CALDAS FERRAZ

Dissertação a ser apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2012

QW 138.5 K5
S921i

Stuchi, Leonardo Prado.

Identificação e caracterização de genes do sistema de captação de ferro regulados pelo repressor FUR em *Klebsiella pneumoniae* / Leonardo Prado Stuchi. -- Bragança Paulista, 2012. 67 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Lúcio Fábio Caldas Ferraz.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Regulador FUR.
3. Captação de ferro. I. Ferraz, Lúcio Fábio Caldas.
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Membros Titulares:

1. Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz (orientador).
2. Profa. Dra. Fabiana Alexandrino.
3. Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini.

Membros Suplentes:

1. Profa. Dra. Natália Reiko Sato Miyasaka.
2. Profa. Dra. Giovana Tofoli.

**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.**

Data: 31/07/2012.



STUCHI, Leonardo Prado, “Identificação e caracterização de genes do sistema de captação de ferro regulados pelo repressor Fur em *Klebsiella pneumoniae*”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em trinta e um de Julho de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Professor Doutor Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco

Professora Doutora Fabiana Alexandrino
Universidade Estadual de Campinas

Professora Doutora Michelle Darrieux Sampaio Bertoini
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambuí
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis.

Ao Prof.Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz pela oportunidade oferecida e por estar sempre pronto para atender minhas dúvidas.

Meus agradecimentos aos professores do programa de pos-graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, principalmente as professoras Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini e Dra. Giovana Tofoli.

À Vilma Tescke e à Rita da secretaria de pós-graduação.

Meu reconhecimento aos colegas do laboratório da Universidade São Francisco, bem como todos seus funcionários e colegas de sala que conheci durante estes dois anos.

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, e à Universidade São Francisco em Bragança Paulista onde realizei todo este trabalho.

E finalmente o meu eterno agradecimento ao meu pai Roberto, à minha mãe Elizabeth, à minha irmã Ana Paula, à minha sobrinha Beatriz, à minha namorada Nathália e aos meus Avós, por dividirem as alegrias e tristezas durante essa jornada.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria patogênica gram-negativa que causa uma variedade de infecções, tais como pneumonia, meningite, septicemia, entre outras. O ferro é um nutriente-chave para a maioria dos organismos, tendo papel importante no metabolismo celular e na expressão de inúmeros fatores de virulência em bactérias patogênicas. Por outro lado, níveis excessivos de ferro no ambiente intracelular podem causar um estresse oxidativo às células. Por esta razão, as bactérias têm desenvolvido um sistema homeostático que mantém os níveis intracelulares de ferro em um limite tolerável. O sistema de homeostase de ferro envolve uma série de genes cuja expressão é controlada principalmente pelo regulador Fur (do inglês, *ferric uptake regulator*). Em ambientes ricos em ferro, o regulador Fur forma um complexo com o íon ferroso e este complexo se liga a sequências específicas, chamadas boxes Fur, localizadas na região promotora dos genes alvos, levando à repressão da transcrição destes genes. Assim, Fur controla a homeostase de ferro ao regular os sistemas de captação e de estocagem de ferro. Neste trabalho foram identificados, por análises de bioinformática, prováveis boxes Fur na região promotora de genes do sistema de captação de ferro em *Klebsiella pneumoniae*. Estes prováveis boxes Fur foram validados pelo ensaio FURTA e por EMSA, e os genes tiveram o padrão de expressão investigado em condição repleta e de privação de ferro. Todos os genes investigados apresentaram a expressão induzida em condições de privação de ferro, e reprimida na condição repleta de ferro. Considerando que o ferro é um importante elemento de regulação de diversos fatores de virulência, torna-se importante o estudo dos sistemas de captação de ferro e sua regulação, para um melhor entendimento da patogenicidade de *Klebsiella pneumoniae*.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*; Regulador Fur; Captação de ferro.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative pathogenic bacterium that causes a variety of infections such as pneumonia, meningitis, septicemia, among others. Iron is a key nutrient for most organisms, having an important role in cell metabolism and expression of many virulence factors of pathogenic bacteria. In addition, excessive levels of intracellular iron on the environment can cause oxidative stress to cells. For this reason, bacteria have developed a homeostatic system which maintains the level of intracellular iron on a tolerable limit. The system of iron homeostasis involves a number of genes whose expression is mainly controlled by Fur regulator (*ferric uptake regulator*). In environments rich in iron the Fur regulator forms a complex with ferrous ion and the complex binds to specific sequences, called boxes Fur, these located in the promoter region of target genes, leading to transcriptional repression of genes. Thus, Fur controls iron homeostasis by regulating the mechanism responsible for capture and storage of iron. In this work box Fur-like sequences were identified, by bioinformatic analysis, in the promoter region of genes of iron uptake system in *Klebsiella pneumoniae*. These box-Fur-like assays were validated by EMSA and FURTA assays, and gene expression was investigated in conditions of excess and deprivation of iron. All genes exhibited an increased expression during iron deprivation, and were repressed in iron saturated conditions. Whereas the iron is an important element for regulating several virulence factors, so it is important to study the systems responsible for iron uptake and their regulation, for a better understanding of the pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; regulator Fur, iron uptake.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistemas de captação de ferro mediados por sideróforos.....Página 22.
- Figura 2.** *Clusters* gênicos nos quais foram identificados boxes Fur.....Página 38.
- Figura 3.** Validação dos boxes Fur pelo ensaio FURTA.....Página 41.
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose mostrando o gene *fur* amplificado por PCR.....Página 43.
- Figura 5.** Gel de agarose mostrando o gene *fur* amplificado por PCR a partir de DNA plasmidial.....Página 44.
- Figura 6.** Gel de poliacrilamida mostrando as proteínas totais e a proteína Fur purificada.....Página 45.
- Figura 7.** EMSA em gel de poliacrilamida dos boxes Fur identificados nos genes *iroN* e *tonB*.....Página 46.
- Figura 8.** Amplificação por PCR das regiões entre os genes *fepD* e *entS* e entre *fepA* e *fes*.....Página 47.
- Figura 9.** EMSA em gel de agarose dos boxes Fur identificados nas regiões intergênicas.....Página 47.
- Figura 10.** Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes *exbB* e *exbD*.....Página 52.
- Figura 11.** Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes da via de síntese de enterobactina.....Página 53.
- Figura 12.** Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes do operon *sit*.....Página 54.
- Figura 13.** Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes do operon *fhu*.....Página 55.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Par de <i>primers</i> utilizado para a amplificação do gene <i>fur</i> por PCR.....	28.
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas reações de amplificação das regiões intergênicas.....	32.
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	35.
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados nas análises de transcrição policistrônica.....	37.
Tabela 5. Boxes Fur encontrados na região promotora de genes do sistema de captação de ferro.....	39.
Tabela 6. Sequência nucleotídica consenso dos boxes Fur identificados.....	40.
Tabela 7. Padrão de expressão dos genes investigados no PCR em tempo real.....	49.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
C_T	do inglês <i>threshold cycle</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	do inglês <i>deoxyribonuclease</i>
dNTPs	do inglês <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMSA	do inglês <i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FUR	do inglês <i>ferric uptake regulator</i>
FURTA	do inglês <i>Fur Titration Assay</i>
IPTG	do inglês <i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Luria-Bertani, meio de cultura bacteriano
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNase	do inglês <i>ribonuclease</i>
r.p.m.	Rotações por minuto
TBE	Tris-Borato-EDTA
UDG	do inglês <i>uracil-DNA glycosylase</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13.
1.1. Captação e homeostase de ferro controlado pelo regulador Fur.....	13.
1.2. Fatores de virulência influenciados por ferro.....	15.
1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> e a expressão de fatores de virulência.....	19.
1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> e os sistemas de captação de ferro.....	20.
2. OBJETIVOS	25.
2.1. Objetivo geral.....	25.
2.2. Objetivos específicos.....	25.
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26.
3.1. Condições de cultivo de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26.
3.2. Identificação de prováveis boxes Fur.....	26.
3.3. Validação dos prováveis boxes Fur pelo ensaio FURTA.....	26.
3.4. Validação dos prováveis boxes Fur pela técnica de EMSA.....	27.
3.4.1. Amplificação do gene <i>fur</i> de <i>K. pneumoniae</i> e clonagem no vetor de expressão pET-28a.....	27.
3.4.2. Expressão e purificação da proteína Fur.....	29.
3.4.3. Análise do EMSA em gel de poliacrilamida.....	31.
3.4.4. Análise do EMSA em gel de agarose.....	32.

3.5. Caracterização do padrão de expressão dos genes com box Fur.....	33.
3.5.1. <i>Cultivo de Klebsiella pneumoniae e obtenção de massa celular</i>	33.
3.5.2. <i>Isolamento de RNA total e síntese de cDNA</i>	34.
3.5.3. <i>PCR em Tempo Real</i>	34.
3.6. Análise da transcrição policistrônica dos genes em operons.....	36.
3.7. Técnicas básicas de biologia molecular.....	37.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38.
4.1. Identificação de prováveis boxes Fur.....	38.
4.2. Validação dos boxes Fur pelo ensaio FURTA.....	41.
4.3. Validação dos boxes Fur pela técnica do EMSA.....	43.
4.3.1. <i>Amplificação do gene fur e clonagem no vetor de expressão pET-28a</i>	43.
4.3.2. <i>Expressão e purificação da proteína Fur</i>	44.
4.3.3. <i>Análise de EMSA em gel de poliacrilamida e em gel de agarose</i>	45.
4.4. Caracterização do padrão de expressão dos genes investigados.....	48.
4.5. Unidade transcricional dos genes organizados em operons.....	51.
5. CONCLUSÃO	56.
6. REFERÊNCIAS	57.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Captação e homeostase de ferro controlado pelo regulador Fur.

A proliferação de bactérias no tecido do hospedeiro é limitada não só por mecanismos de defesa, mas também pela disponibilidade de ferro, já que o ferro é fator de crescimento bacteriano (ESCOLAR *et al.*, 1999). Em ambientes anaeróbios, o íon ferroso (Fe^{2+}) é prevalente, e este por sua vez é importado para o citoplasma bacteriano através de porinas e um sistema de transporte ABC (KAMMLER *et al.*, 1993). No entanto, em condições aeróbicas e nos tecidos de mamíferos (*in vivo*), a maior parte do ferro encontrado é íon férrico (Fe^{3+}) (WANDERSMAN & DELEPELAIRE, 2004). Embora o ferro seja o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre, a disponibilidade de ferro no hospedeiro é bastante reduzida, uma vez que este elemento é ligado intracelularmente com proteínas tais como a hemoglobina, a ferritina, hemosiderina e mioglobina, e extracelularmente com proteínas de alta afinidade por ferro como a lactoferrina e transferrina. A disponibilidade de ferro também é afetada por conta de sua insolubilidade em pH fisiológico (BRAUN, 1997; CAZA *et al.*, 2008). Apesar do ferro ser um micronutriente essencial para a maioria dos microorganismos, tendo importante papel no metabolismo celular, altos níveis deste elemento no meio intracelular podem causar um estresse oxidativo para as células, uma vez que o ferro catalisa a produção de espécies reativas de oxigênio que causam danos celulares (WOODMANSEE & IMLAY, 2002). Por esta razão, as bactérias têm desenvolvido um sistema homeostático que mantém os níveis intracelulares de ferro em um limite suficiente para as funções essenciais da célula (ESCOLAR *et al.*, 1999).

As bactérias possuem diversos mecanismos para captação de ferro, sobretudo quando estão em ambientes onde este nutriente é escasso. Uma das estratégias utilizadas é a síntese e secreção para o meio externo de uma variedade de moléculas de baixo peso molecular chamadas de sideróforos (do grego *sideros*= ferro, *foros*= transportador). Os sideróforos possuem alta afinidade a íons férricos (Fe^{3+}), sendo que essa afinidade é 10 vezes maior que aquela exibida pelas transferrina ou lactoferrina (WANDERSMAN & DELEPELAIRE, 2004). Os sideróforos são essenciais à sobrevivência, ao crescimento e para a virulência de muitas bactérias patogênicas,

sendo que já foram caracterizados quimicamente cerca de 500 tipos de sideróforos (SCHALK *et al.*, 2004).

Os complexos sideróforo-Fe³⁺ são demasiado grandes para entrar diretamente na célula e, portanto, as bactérias dependem de sistemas de proteínas específicas para absorção de ferro. O transporte deste complexo para dentro das células depende da energia próton-motora fornecida pelo sistema TonB, que é formado pelas proteínas TonB, ExbB e ExbD ancoradas na membrana citoplasmática. A interação de TonB com proteínas de membrana externa TonB-dependentes provoca uma alteração conformacional que permite a passagem do complexo sideróforo-Fe³⁺ do meio externo para o periplasma (KIM *et al.*, 1997; GARCIA-HERRERO *et al.*, 2007). Uma vez no periplasma, o complexo sideróforo-Fe³⁺ é associado à proteína de ligação periplásmica e transportado ativamente para dentro do citoplasma através da membrana interna por um transportador ABC (BRAUN, 1997; FERGUSON *et al.*, 2004). No citoplasma, o íon férrico é reduzido pela ação de esterases a íon ferroso. Como este apresenta baixa afinidade pelo sideróforo, o complexo é dissociado e o íon ferroso é então utilizado no metabolismo celular (CLARKE *et al.*, 2001).

A manutenção da homeostase de ferro envolve uma série de genes cuja expressão é controlada por vários reguladores de transcrição, sendo o mais conhecido o regulador Fur (do inglês, *ferric uptake regulator*). Na presença do íon ferroso, o regulador Fur forma um complexo que aumenta em cerca de mil vezes sua afinidade às sequências específicas presentes na região promotora de genes alvos. Estas sequências são chamadas de boxes Fur e possuem 19 nucleotídeos de extensão. A sequência nucleotídica consenso de ligação do Fur foi definida como sendo GATAATGATAATCATTATC (ESCOLAR *et al.*, 1999), e as proteínas Fur de bactérias diferentes também se ligam a essa sequência consenso. Ao se ligar na região promotora dos genes alvos, o complexo Fur + íon ferroso bloqueia a ligação da RNA polimerase (RNAP), levando à repressão da transcrição desses genes. Na ausência do íon ferroso, como ocorre em condições de escassez de ferro, não há a formação do complexo Fur + íon ferroso, libertando a região promotora para a ligação da RNA polimerase (RNAP) e a transcrição dos genes envolvidos na captação de ferro. Desta

forma a homeostase de ferro é regulada pela proteína Fur, pois quando há uma deficiência de ferro, o sistema de captação é ativado, e quando há uma sobrecarga de ferro este sistema é reprimido (ESCOLAR *et al.*, 1999).

Dados experimentais mostram que a família de proteínas Fur tem diferentes funções: no controle da homeostase do ferro (HALL & FOSTER, 1996; POHL *et al.*, 2003), no controle da expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (BSAT *et al.*, 1998; COOKSLEY *et al.*, 2003), no metabolismo energético (QUATRINI *et al.*, 2005), na tolerância à acidez (HALL & FOSTER, 1996), e na regulação da produção de cápsula polissacarídica em *Klebsiella pneumoniae* (Lin *et al.*, 2011). Há ainda uma subclasse chamada Zur (do inglês, *zinc uptake regulator*), que controla a absorção de zinco em *E. coli* (PATZER & HANTKE, 2000) e *Bacillus subtilis* (GABALLA *et al.*, 1998).

O Fur, associado ao corepressor Fe^{2+} , pode atuar como ativador ou repressor da transcrição de mais de 90 genes em *E. coli* (HANTKE, 2001). Assim, esse metal torna-se um importante elemento de regulação de diversos fatores de virulência, estabelecendo a infecção e colonização das células do hospedeiro.

1.2. Fatores de virulência influenciados por ferro

Em bactérias patogênicas, um dos sinais que desencadeia a infecção e colonização é a privação de ferro que o patógeno enfrenta quando em contato com o hospedeiro, onde a quantidade de o ferro livre é estritamente limitada, e este está normalmente ligado a proteínas, tais como a transferrina e lactoferrina. De fato, o ferro desempenha um papel crucial na regulação da expressão de inúmeros fatores de virulência, como formação de biofilme mediado por *quorum-sensing*, expressão de genes de virulência, toxinas, proteases, e sistemas de assimilação de ferro (LITWIN *et al.*, 1993; HANCOCK *et al.*, 2010). O ferro regula a expressão dos fatores de virulência por intermédio do regulador Fur.

Um fator de virulência bacteriana regulado pelos níveis de ferro é a formação de biofilme (SINGH *et al.*, 2004). O biofilme pode ser definido como aglomerados de células que se organizam em comunidades microbianas compostas de uma única

espécie ou de múltiplas espécies. Nestas comunidades organizadas, as células encontram-se encapsuladas em uma matriz de exopolissacarídeos, podendo se desenvolver em superfícies bióticas e abióticas (O'TOOLE *et al.*, 2000). Estima-se que biofilmes contribuem para mais de 80% das infecções humanas (DAVIES, 2003). Os biofilmes estão presentes na placa dentária, em abscessos hepáticos, nas infecções pulmonares e infecções relacionadas à utilização de dispositivos médicos, como cateteres urinários. Virtualmente todos os implantes médicos são propensos à colonização e formação de biofilmes por bactérias patogênicas, e estes biofilmes muitas vezes servem como uma fonte de infecções (HANCOCK *et al.*, 2010).

No caso de bactérias patogênicas a formação de biofilme apresenta uma relevância clínica. Em função da estrutura encapsulada, o biofilme tem sido associado a um aumento na resistência a agentes antimicrobianos em bactérias patogênicas (MAH & O'TOOLE, 2001). Nestas condições, a formação do biofilme protege as bactérias de ataques por fagocitose e moléculas tóxicas; essa proteção dificulta a penetração dos antimicrobianos e também favorece a transferência por conjugação de plasmídeos contendo agentes de resistência (COSTERTON *et al.*, 1999; DONLAN & COSTERTON, 2002). As falhas do sistema imunológico para a eliminação das bactérias tornam o biofilme uma infecção recalcitrante ao tratamento e uma experiência comum e frustrante, uma vez que, após o tratamento, a sobrevivência das bactérias associadas ao biofilme irá perpetuar a infecção (COSTERTON *et al.*, 1999; HANCOCK *et al.*, 2010).

A formação do biofilme envolve uma série de eventos que se inicia com a aderência das bactérias, em seguida há formação de microcolônias e desenvolvimento de estruturas uniformes ou agregados celulares, sendo que o ferro desempenha um papel crítico neste processo (BANIN *et al.*, 2005). O'Toole e Kolter (1998) demonstraram que o ferro restabelece a capacidade de aderência em bactérias que são deficientes nesta capacidade. Singh e co-autores (2004) mostraram que níveis baixos de ferro estimulam a motilidade das bactérias e bloqueiam a formação de microcolônias. Já Hancock e colaboradores (2010) demonstraram que a formação de biofilme pode ser prejudicada pela adição de íons metálicos bivalentes, tais como Zn (II) e Co (II), que inibem a absorção de ferro em virtude de sua maior afinidade para o Fur

(proteína de captação de ferro). A formação de biofilme foi reduzida nas estripes de *E. coli* de infecção urinária na presença de Zn (II), e essa redução foi observada em placas de microtitulação, em câmaras de fluxo e sobre os cateteres urinários. Abbas e colegas (2007) mostraram que *Pseudomonas aeruginosa* mutantes para TonB, o transdutor de energia envolvido com a captação de ferro, são incapazes de formar biofilme maduro.

Além da influência do ferro na formação do biofilme, outro processo parece estar associado ao mecanismo de sinalização denominado *quorum-sensing*. O *quorum-sensing* é um mecanismo pelo qual as bactérias se comunicam entre si por meio da secreção e detecção de pequenas moléculas sinalizadoras denominadas auto-indutores (AI). Em resposta às moléculas sinalizadoras do *quorum-sensing*, as bactérias migram e aderem a superfícies, expandindo-se em múltiplas camadas celulares que formarão o biofilme (COLE *et al.*, 2004). A influência do *quorum-sensing* na formação de biofilme tem sido descrita em muitas bactérias, tais como *Vibrio cholerae* (HAMMLER & BASSLER, 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (DAVIES *et al.*, 1998), *Klebsiella pneumoniae* (BALESTRINO *et al.*, 2005) e *Streptococcus pneumoniae* (SUNTHARALINGAM & CVITKOVITCH, 2005). Este fenômeno, que tem sido observado tanto em interações simbióticas quanto patogênicas, permite que as bactérias monitorem mudanças na densidade celular ao regular a expressão de genes específicos. O mecanismo de *quorum-sensing* regula outros processos celulares relacionados à patogenicidade, incluindo motilidade, expressão de genes de virulência, regulação dos sistemas de secreção, de assimilação de ferro e síntese de lipopolissacarídeo (LPS) em células de *K. pneumoniae*. (FERDELE & BASSLER, 2002; DE ARAUJO *et al.*, 2010).

Uma das estratégias utilizadas pelas bactérias patogênicas para a obtenção de ferro é ativar os sistemas de captação de ferro, como a produção de sideróforos e receptores específicos. A produção de sideróforos mediada pelo sistema de *quorum-sensing* tem sido descrita em *P. aeruginosa* (STINTZI *et al.*, 1998), *Burkholderia cepacia* (LEWENZA *et al.*, 1999) e bactérias marinhas (GUAM *et al.*, 2000). Em *P. aeruginosa*, ambos o ferro e o mecanismo de *quorum-sensing* desempenham importante papel na formação de biofilme e na motilidade (PATRIQUIN *et al.*, 2008).

McKenney *et al.* (1995) demonstraram que houve um significativo aumento de síntese de sideróforos por *Burkholderia cepacia* quando estas foram inoculadas em meio de cultura (apenas o sobrenadante) no qual foi cultivada *Pseudomonas aeruginosa*. Este aumento na síntese de sideróforos foi atribuído ao estímulo de moléculas sinalizadoras produzidas por *P. aeruginosa*, presentes no sobrenadante, sobre *B. cepacia*. Além de demonstrar que o sistema de assimilação de ferro está intimamente relacionado ao mecanismo de *quorum-sensing*, estes resultados mostraram a comunicação entre espécies diferentes, mediada por *quorum-sensing* tipo AI-2, na produção de fatores de virulência por *B. cepacia*.

É notório que colônias de biofilme têm um papel importante na patogênese de infecções devido a sua resistência a concentrações de antibióticos. Numerosos estudos têm mostrado que as concentrações inibitórias submínima sub-MIC (do inglês, *subminimal inhibitory concentrations*) de alguns antibióticos podem atuar como agonistas de formação de biofilme bacteriano *in vitro*, um processo que pode ter relevância clínica (KAPLAN *et al.*, 2011). O uso difundido de antibióticos pode promover a exposição de bactérias a níveis baixos dos fármacos (SMITH *et al.*, 2002). Além disso, células localizadas na base de uma colônia de biofilme podem ser expostas a concentrações sub-MIC de antibióticos por conta dos gradientes de difusão (SINGH *et al.*, 2010).

Kaplan e colaboradores (2011) demonstraram que concentrações sub-MIC de antibióticos podem induzir a formação de biofilme. Neste trabalho foram utilizadas três cepas de *Staphylococcus aureus*: as cepas *S. aureus* 383 e 9897, resistentes à metilina e com um MIC de 16 mg/mL, e a cepa *S. aureus* Mu50, sensível à metilina e com um MIC de 8 µg/mL. As cepas foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de concentrações crescentes do antibiótico metilina. Após 18 horas de incubação a 37°C, os poços da placa foram lavados com água e os biofilmes foram corados com cristal violeta. Em concentrações sub-MIC de metilina, houve um aumento na formação de biofilme em todas as três cepas de uma maneira dose-dependente, conforme evidenciado pela quantidade de corante ligado ao biofilme. A formação de biofilmes induzida por metilina na estirpe Mu50 foi máxima em cerca de

1/2 MIC (4-5 µg/mL). Além do ensaio com o corante cristal violeta, a indução da formação de biofilmes por sub-MIC também foi demonstrada utilizando microscopia eletrônica de varredura, por enumeração de unidades formadoras de colônia (UFC) e medições de produção de exopolissacarídeo. Ainda não está claro se a formação do biofilme induzida por antibiótico contribui para o constante insucesso na terapia antimicrobiana (KAPLAN *et al.*, 2011).

Considerando que a absorção de ferro é essencial para a formação do biofilme, a manipulação dos sistemas de captação deste nutriente nas bactérias pode ser uma forma eficaz de erradicar a formação de biofilme em cepas infecciosas.

1.3. *Klebsiella pneumoniae* e a expressão de fatores de virulência

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram-negativa da família Enterobacteriaceae que causa uma variedade de infecções, tais como pneumonia, meningite, septicemia, entre outras (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). *K. pneumoniae* é o segundo agente mais comum em septicemia causada por bactérias patogênicas gram-negativas (WILLIAMS & TOMAS, 1990; STRUVE *et al.*, 2003) e representa a segunda maior causa de infecções do trato urinário causadas por gram-negativas (ROSEN *et al.*, 2008) e a terceira causa de pneumonia adquirida em hospitais (JONES, 2010). Sendo um patógeno oportunista, acomete particularmente doentes imunologicamente deprimidos e apresenta-se como uma das principais causas de infecções hospitalares nosocomiais, tendo como principais sítios de infecção as feridas cirúrgicas nos tratos gastro-intestinal, respiratório e genito-urinário (KOCZURA & KAZNOWSKI, 2003).

A resistência de isolados de *K. pneumoniae* aos antibióticos fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenêmicos tem aumentado rapidamente em uma taxa de até 1% ao ano (ROSEN *et al.*, 2008). Além disso, casos de infecções com *K. pneumoniae* em indivíduos saudáveis tem sido frequentes no sudeste da Ásia, especialmente em Taiwan e Coréia (KEYNAN & RUBINSTEIN, 2007). Nestes países, *K. pneumoniae* tem sido identificada como o patógeno predominante em abscesso hepático piogênico nos

pacientes diabéticos (HAN, 1995; LAU *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2009), e responsável aproximadamente por 5% das infecções no trato intestinal (JOHNSON *et al.*, 1993). Relatos no Brasil, entre 1997 e 1998, revelaram que *K. pneumoniae* foi o quarto patógeno mais frequente em neonatos (PESSOA-SILVA *et al.*, 2004). Em Israel, as infecções por *K. pneumoniae* são as mais frequentes em isolados de ambiente hospitalar (LEVY *et al.*, 1996). Nos Estados Unidos e em outras regiões do mundo, cepas de *Klebsiella pneumoniae* que codificam carbapenemases (KPCs) estão associadas com a resistência quase completa aos antibióticos, com uma taxa de 25 a 60% de falha do tratamento, resultando em infecções fatais (HIRSCH & TAM, 2010).

1.4. *Klebsiella pneumoniae* e os sistemas de captação de ferro

Assim como na maioria das bactérias patogênicas, a capacidade de *K. pneumoniae* de captar ferro constitui um importante fator na patogenicidade desta bactéria. No entanto, em comparação com outras enterobactérias, poucos estudos têm focado a importância dos sistemas de aquisição de ferro durante infecção por *K. pneumoniae*, e nos mecanismos que regulam esta aquisição de ferro. *K. pneumoniae* possui três sistemas de aquisição de ferro, cada qual mediado pelos sideróforos enterobactina, aerobactina e yersiniabactina.

As aerobactinas são sideróforos do tipo hidroxamato que apresentam baixa afinidade por íon férrico e são produzidos por uma pequena fração de enterobactérias. O sistema de captação de ferro mediado por aerobactinas é codificado pelo *cluster* gênico *iucA-B-C-D-iutA*, também localizado no plasmídio de virulência pLVPK (CHEN *et al.*, 2004). Já o sistema de captação mediado por yersiniabactina, inicialmente descrito em *Yersinia* spp. é encontrado em um número ainda mais reduzido nas enterobactérias. Este sistema é codificado por um *cluster* gênico organizado em *K. pneumoniae* que é chamado de “ilha de alta patogenicidade” ou HPI (do inglês *high-patogenicity island*) (KOCZURA & KAZNOWSKI, 2003; LAWLOR *et al.*, 2007).

O sideróforo enterobactina é o principal e mais abundante em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Dois *clusters* gênicos codificam para o sistema de captação de

ferro mediado por enterobactinas: o *cluster iroB-C-D-N*, localizado no plasmídeo de virulência pLVPK (CHEN *et al.*, 2004), e um *cluster* gênico composto por 14 genes com origem no DNA cromossômico de *K. pneumoniae* (LAWLOR *et al.*, 2007). Os genes deste *cluster* estão envolvidos com a biossíntese de enteroquelina (*ent*), transporte (*fep*), e liberação do ferro (*fes*). *E. coli* possui um *cluster* gênico de captação de ferro mediado por enterobactina similar, e a transcrição dos genes é regulada por um box Fur bidirecional (Lavrrar *et al.*, 2002). Em *K. pneumoniae*, este tipo de regulação ainda não foi descrito.

As enterobactinas são sideróforos do tipo catecolato e sua afinidade ao ferro é maior do que a exibida pela lactoferrina ou transferrina (WOOLDRIDGE & WILLIAMS, 1993). Em condições de privação de ferro, as enterobactinas são os sideróforos preponderantes na captação de ferro.

O sistema Fep, que transporta sideróforo enterobactina, é um sistema de transporte de ferro de alta afinidade encontrado em bactérias gram-negativas. O sideróforo enterobactina se liga com elevada afinidade a proteínas receptoras de membrana externa como FepA, proteína essa dependente do sistema TonB para o transporte e transdução de energia para a passagem do sideróforo enterobactina do meio externo para o periplasma (BUCHANAN *et al.*, 1999; SCHALK *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2007). No periplasma, o sideróforo enterobactina é transportado através da membrana interna por uma proteína de ligação periplásmica através do sistema de transporte (ABC) dependente de ATP (FERGUSON *et al.*, 2004). Neste sistema, o sideróforo se liga especificamente à sua proteína de ligação periplasmática, por exemplo, FepB, que em seguida, envia o complexo através da permease de membrana interna correspondente para o citoplasma. Esta permease geralmente consiste de duas proteínas integrais de membrana, FepD e FepG, que formam o complexo permease de membrana interna. Cada uma das proteínas integrais de membrana interna está ligada a uma proteína adicional FepC, que tem uma atividade ATPase que hidrolisa ATP para gerar a energia para o transporte do sideróforo através da membrana interna. Na sequência do transporte sideróforo-enterobactina, uma proteína de esterase férrica

citoplasmática, Fes, catalisa a remoção do ferro a partir do complexo (SHEA, *et al.*, 1991; GARÉNAUX, *et al.*, 2011).

A Figura 1 resume os principais sistemas de captação de ferro mediados por sideróforos encontrados em *E. coli* e homólogos aos encontrados em *Klebsiella pneumoniae*.

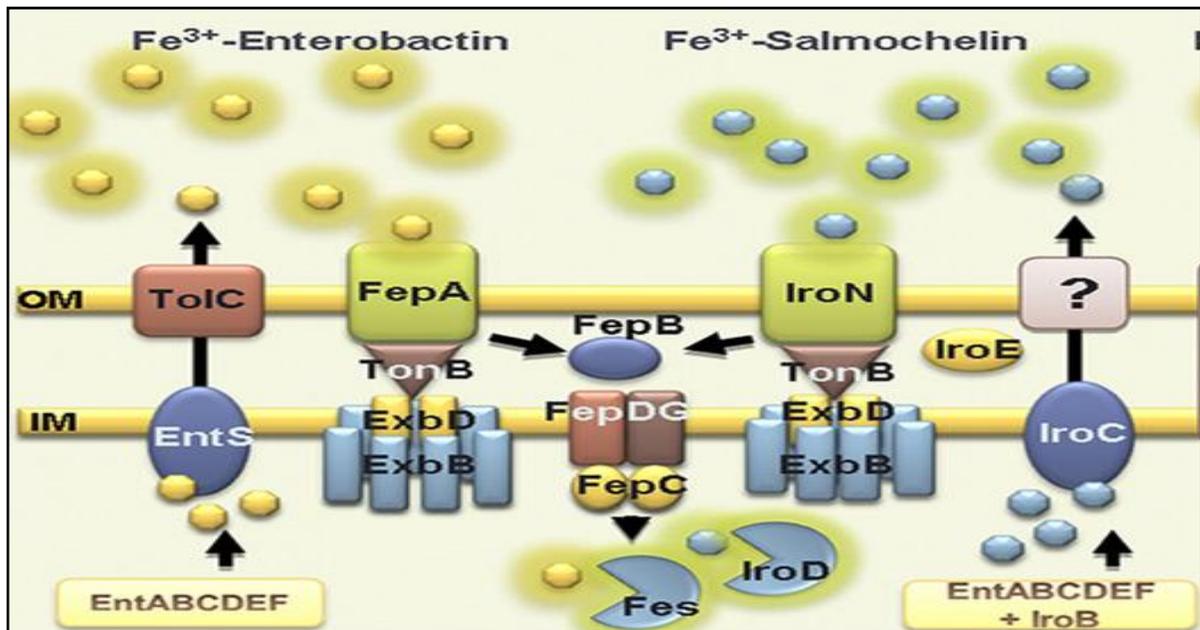


Figura 1: Sistemas de captação de ferro mediados por sideróforos em *E. coli*. São indicados os genes envolvidos na síntese, exportação, recepção, internalização e processamento de sideróforos. Proteínas envolvidas na síntese dos sideróforos enterobactina e salmoquelina são indicadas em retângulos amarelos. Exportadores de membrana são indicados em azul escuro. Os receptores de membrana externa são indicados em verde claro e estão associados com o complexo TonB-ExbD-B. Transportadores são mostrados na membrana interna como proteínas periplasmáticas de ligação adjacentes aos sistemas correspondentes. Esterases envolvidas na degradação de catecolatos para a liberação de ferro a partir enterobactina/salmoquelina são mostrados como enzimas citoplasmáticas no espaço citoplasmático. Pontos de interrogação indicam passos preditos onde os mecanismos permanecem a ser determinados (adaptado de GARÉNAUX *et al.*, 2011).

A expressão de sideróforos e sua relação com a virulência de *K. pneumoniae* têm sido descrita em inúmeros trabalhos. Estudos têm mostrado que quase todos os isolados clínicos de *K. pneumoniae* produzem enterobactina, e que uma porcentagem muito menor produz aerobactina ou yersiniabactina (SCHUBERT *et al.*, 2000; KOCZURA & KAZNOWSKI, 2003). Lawlor e co-autores (2007) demonstraram que, em adição às enterobactinas comumente expressas por *K. pneumoniae*, a expressão de outros sistemas de captação, tais como aqueles mediados por aerobactinas e yersiniabactina, contribuem para um fenótipo ainda mais virulento em *K. pneumoniae* e representa um importante passo no processo de infecção pulmonar. Bachman e colaboradores (2011) mostraram a contribuição dos sideróforos na proteção contra a proteína de imunidade inata lipocalina 2 (Lcn2). Para combater as enterobactinas, os neutrófilos (KJELDSEN *et al.*, 1993) e as mucosas (NELSON *et al.*, 2005) produzem a proteína Lcn2 que compete com o sideróforo enterobactina (GOETZ *et al.*, 2002). Alguns isolados de *K. pneumoniae* produzem sideróforos que evitam essa ligação, como é o caso da enterobactina salmoquelina sintetizada e codificada pelos genes do *cluster iroBCDN* (FISCHBACH *et al.*, 2006; HSIEH *et al.*, 2008) onde a enterobactina é convertida em salmoquelina pela glicosil-transferase codificada pelo gene *iroB* (HANTKE *et al.*, 2003; FISCHBACH *et al.*, 2005). Já o gene *iroN* codifica a proteína necessária para a absorção e os genes *iroC*, *iroD* e *iroE* um transportador ABC necessário para o transporte de salmoquelinas, uma esterase citoplasmática e uma hidrolase periplasmática respectivamente, que agem no complexo salmoquelina-férrico (BISTER *et al.*, 2004; CAZA *et al.*, 2008).

Inúmeras metodologias têm sido empregadas para a identificação de genes do sistema de captação de ferro e sua relação com a virulência em *K. pneumoniae*. Lai e colegas (2001) empregaram a tecnologia de expressão *in vivo* (IVET, do inglês *in vivo expression technology*) para identificar genes que são induzidos durante a infecção. Dentre os genes induzidos estavam um gene da via de síntese de aerobactina e um gene que codifica um receptor de enterobactina. Lawlor e co-autores (2005) empregaram a técnica de STM (do inglês *signature-tagged mutagenesis*) para identificar novos genes de virulência em *K. pneumoniae* a partir de um modelo de infecção intranasal. Dentre os inúmeros genes identificados, os autores identificaram o

gene *ybtQ* que codifica uma ATPase necessária para o transporte de yersiniabactina. Mais recentemente, Lau e colaboradores (2007), utilizando técnica de SSH (do inglês *suppressive subtractive hybridization*), identificaram genes que contribuem para a patogenicidade de linhagens específicas de *K. pneumoniae*. Os autores identificaram em *K. pneumoniae* dois genes homólogos ao gene *iroN* de *E. coli*, que codifica um receptor do sideróforo enterobactina.

A geração de linhagens mutantes para determinados genes do sistema de captação de ferro e a sua aplicação como vacinas vivas tem-se revelado bastante promissora, conforme atestam alguns trabalhos. Ao servirem como vacinas vivas, estas linhagens mutantes vivas e atenuadas, isto é, avirulentas, desencadeiam uma resposta imune protetora com, preferencialmente, mínimos efeitos colaterais. Hsieh e co-autores (2008) relataram o desenvolvimento de linhagens de *K. pneumoniae* mutantes para alguns destes genes, linhagens estas que apresentavam diminuição na virulência. Segundo estes autores, ao imunizar modelos animais com linhagens de *K. pneumoniae* mutantes para o gene *tonB*, uma resposta imune protetora é desencadeada quando estes mesmos animais modelos eram, em seguida, desafiados com a linhagem virulenta selvagem. Williams e colegas (2006) descreveram a construção de linhagens de *Salmonella* entérica mutantes para os três principais receptores de sideróforos catecolatos: *iroN*, *fepA* e *cir*. Os autores demonstraram que estas linhagens triplo mutantes eram capazes de proteger camundongos contra um subsequente desafio com linhagens parentais virulentas, e concluíram ser esta linhagem atenuada uma promissora candidata a vacina. Estes resultados ressaltam a importância de se caracterizar o papel dos genes do sistema de captação de ferro na patogenicidade de *K. pneumoniae*, visando o desenvolvimento de linhagens mutantes avirulentas que podem potencialmente servir como vacinas vivas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização de genes do sistema de captação e de homeostasia de ferro que são regulados pelo repressor Fur em *Klebsiella pneumoniae*, e suas implicações na patogenicidade desta bactéria.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar, por análises de bioinformática, prováveis boxes Fur na região promotora de genes do sistema de captação e homeostase de ferro em *Klebsiella pneumoniae*;
2. Validar os boxes Fur identificados pelo ensaio FURTA e pela técnica de EMSA (do inglês *Electrophoresis Mobility Shift Assay*);
3. Investigar o padrão de expressão dos genes do sistema de captação de ferro que apresentam box Fur na região promotora, a partir de células de *K. pneumoniae* cultivadas em meio LB (condição controle), e a partir de células isoladas após 30 minutos de incubação após a adição de ferro (FeSO_4) ou de quelante de ferro (2,2'-dipiridil);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Condições de cultivo de *Klebsiella pneumoniae*

Para este estudo foi utilizada a linhagem *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. A bactéria foi cultivada a 37°C em meio LB sólido ou líquido. Nos meios foram adicionados 100 µM de sulfato ferroso (FeSO₄), no caso de condição repleta de ferro, ou 100 µM do quelante de ferro 2,2'-dipiridil, no caso de condição de escassez de ferro.

3.2. Identificação de prováveis boxes Fur

Análises de bioinformática foram empregadas na identificação de prováveis boxes Fur na região promotora de genes do sistema de captação e de homeostasia de ferro em *Klebsiella pneumoniae*, utilizando-se a metodologia empregada por Quatrini *et al.* (2007) e Schneider (1997), com algumas modificações. Esta etapa do trabalho contou com a colaboração do Prof. Dr. Renato Vicentini (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, da Unicamp).

Para esta análise, boxes Fur de outras *Enterobacteriaceae* foram utilizados para a construção de uma sequência consenso e esta sequência foi utilizada como matriz para a identificação de prováveis boxes Fur na região promotora dos genes de captação e de homeostasia de ferro em *K. pneumoniae*. Foram consideradas as seqüências que cumpriram os seguintes parâmetros: 1) tamanho de 19 pares de bases; 2) *score* de similaridade maior que 9 *bits*; 3) distância máxima de até 600 pares de bases do códon iniciador do gene alvo, e 4) seqüências com os nucleotídeos mais conservados entre boxes Fur de outras bactérias.

3.3. Validação dos prováveis boxes Fur pelo ensaio FURTA

O ensaio FURTA foi conduzido conforme descrito por Stojiljkovic *et al.* (1994). As células de *E. coli* linhagem H1717 utilizadas neste ensaio foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Klaus Hantke (Universidade de Tübingen, Alemanha). Inicialmente foram desenhados oligonucleotídeos, fitas *sense* e *antisense* complementares, contendo a

sequência nucleotídica dos prováveis boxes Fur identificados. Por meio do anelamento das fitas *sense* e *antisense* foram obtidos oligonucleotídeos em dupla fita, os quais foram clonados no vetor *pGEM[®]-T Easy* (Promega). Celulas de *E. coli* H1717 foram transformadas com os vetores contendo os prováveis boxes Fur, plaqueadas em meio de cultura MacConkey contendo ferro (100 µM de FeSO₄) e ampicilina e, em seguida, incubadas a 37°C por 12 horas.

A validação dos boxes é confirmada de acordo com o padrão de coloração das colônias. A linhagem de *E. coli* H1717 utilizada neste ensaio possui inserido em seu cromossomo, uma construção composta do box Fur do gene *fhuF* mais o gene repórter *lacZ* que codifica a β-galactosidase. Quando estas linhagens são transformadas com vetores contendo boxes Fur funcionais, a proteína Fur se dissocia da construção *fhuF-lacZ* para então se ligar aos prováveis boxes. Ao se desligar da construção, o gene da β-galactosidase é transcrito e resulta em colônias vermelhas no meio MacConkey, indicando que o vetor contém um box Fur funcional. A ausência de coloração avermelhada indica que o Fur permaneceu ligado à construção *fhuF-lacZ* e reprimiu a expressão da β-galactosidase, indicando que o vetor não possui um box Fur funcional. O ensaio FURTA foi realizado em duplicata, com pelo menos dois cultivos independentes realizados para cada box investigado.

Para auxiliar na identificação das colônias, o ensaio FURTA foi conduzido utilizando-se dois clones diferentes como controles: 1) vetor *pGEM[®]-T Easy* contendo box Fur previamente validado (controle positivo), e 2) vetor *pGEM[®]-T Easy* apenas (controle negativo).

3.4. Validação dos prováveis boxes Fur pela técnica de EMSA

3.4.1. Amplificação do gene fur de *K. pneumoniae* e clonagem no vetor de expressão pET-28a

O gene *fur* de *Klebsiella pneumoniae* foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico extraído de células de *K. pneumoniae* cultivadas em meio LB líquido a 250 r.p.m. de agitação a 37°C. A extração foi realizada com o kit *Wizard[®] Genomic DNA*

purification Kit (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A reação PCR foi realizada com os primers descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Par de *primers* utilizado para a amplificação do gene *fur* por PCR.

<i>Primers</i>	Sequencia (5' > 3') ¹	Amplicon
ex_Fur-S	GTCGC <u>CATATG</u> ATGACTGACAACAATACC	472 pares de bases
ex_Fur-AS	TATCTCGAGTTATTTTTCCACCGCG	

1. Seqüências sublinhadas representam os sítios de restrição das enzimas *NdeI* (*primer sense*, S) e *XhoI* (*primer anti-sense*, AS).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL e continha os seguintes reagentes (em concentração final): tampão de PCR 1x, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer*, 0,5 µg de DNA genômico de *K. pneumoniae*, 2,5 unidades de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e quantidade suficiente de água autoclavada para o volume final de 25 µL. As condições da reação de PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os ciclos, as amostras foram submetidas a uma etapa adicional de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os *primers* utilizados na reação de amplificação do gene *fur* foram desenhados de maneira que possuíssem os sítios de restrição das enzimas *XhoI* e *NdeI* (Tabela 1), uma vez que estes sítios também estão presentes na região de múltipla clonagem do vetor de expressão pET-28a (Novagen). Desta forma, tanto o gene *fur* de *K. pneumoniae* quanto o vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI*, de acordo com as instruções do fabricante (Fermentas). A reação de digestão dupla foi realizada em um volume final de 20 µL e consistiu de: 2 µL de tampão *Buffer R* 10x, 1 µg do vetor pET-28a ou 0,5 µg do gene *fur* amplificado, 0,5 µL da enzima *XhoI*, 1 µL da enzima *NdeI*, e água autoclavada em quantidade suficiente para o volume final de 20 µL. A reação de digestão foi incubada a 37°C por 1 hora e, após isso, tanto o gene *fur* quanto o vetor pET-28a digeridos foram purificados por meio da excisão de bandas em

gel de agarose, utilizando-se o kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Após a purificação o gene *fur* foi clonado no vetor pET-28a por meio de reação de ligação com a enzima T₄ DNA ligase, conforme instruções do fabricante (Fermentas). A reação de ligação foi realizada na proporção 1:3 de vetor (pET-28a) e inserto (gene *fur*) e consistiu de: aproximadamente 0,3 µg do vetor pET-28a, 1 µg do gene *fur*, 2 µL do tampão de ligação 10X, 2,5 unidades da enzima T₄ DNA ligase e água autoclavada em quantidade suficiente para o volume final de 20 µL. A reação de ligação foi incubada por 2 horas a 8°C.

O vetor de expressão pET-28a clonado com o gene *fur* (pET-28a+*fur*) foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* DH5α, e clones recombinantes foram obtidos por meio de minipreparações (*minipreps*) com o kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps* (Promega). Os clones obtidos na *miniprep* foram submetidos a uma nova reação de PCR com os mesmos *primers* utilizados na reação de amplificação do gene *fur*, para se confirmar se os mesmos foram realmente clonados com o gene *fur*. A reação foi realizada conforme já descrito, com a exceção de que foi utilizado 0,2 µg de DNA plasmidial extraído nas *minipreps*.

3.4.2. Expressão e purificação da proteína Fur

Para a expressão da proteína Fur de *K. pneumoniae* em larga escala foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o vetor de expressão *pET28a* contendo o gene *fur*.

Células de BL21(DE3) transformadas foram cultivadas em 50 ml de meio LB contendo kanamicina a 37°C e 250 r.p.m., e o crescimento celular foi monitorado por espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm (D.O._{600nm}). Após atingirem D.O._{600nm} de 0.6 foi realizada a indução da expressão do gene *fur* por meio da adição de 1 mM de IPTG (concentração final). Após a adição de IPTG, as células foram incubadas por mais 4 horas a 37°C e 250 r.p.m. Após este período, as células foram isoladas por centrifugação (3.000 r.p.m., 4°C por 15 minutos) e o *pellet* de células foi ressuspensionado com 10 mM de Tris-HCl. A esta ressuspensão foi adicionado *Cellytic*

Express Tablets (Sigma-Aldrich) e a mistura foi incubada por 20 minutos a 37°C e 180 r.p.m. para promover a lise celular. Após a incubação adicionou-se 2 mL de *His-Select Nickel Affinity Gel* (Sigma-Aldrich) previamente lavada e equilibrada e incubou-se a mistura por 15 minutos a 115 r.p.m. Após este período a amostra foi centrifugada a 5000 r.p.m. por 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante. Foi adicionado tampão de lavagem (50 mM de Fosfato de Sódio e 300 mM de Cloreto de Sódio) e incubou-se a amostra por 4 minutos e a 175 r.p.m. Após este período a amostra foi centrifugada a 5000 r.p.m. por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Esta lavagem foi repetida por mais duas vezes. Após as lavagens foi adicionado o tampão de eluição (50 mM de Fosfato de Sódio, 300 mM de Cloreto de Sódio e 250 mM de imidazol) e incubou-se a amostra por 10 minutos a 175 r.p.m. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 5000 r.p.m. e, ao final, coletou-se o sobrenadante contendo a proteína Fur purificada. Ao longo do protocolo de purificação foram coletadas frações para análise no gel de poliacrilamida. Estas frações referem-se às etapas de lise celular, lavagens e eluições.

As frações contendo a proteína Fur purificada foram agrupadas e dialisadas em membrana *SnakeSkin™ Dialysis Tubing 3,5K MWCO* (Thermo Scientific), em tampão de diálise composto por 20 mM de Tris-HCl, 1 mM de DTT, 10% de glicerol e 0,1 mM de $MnSO_4$ durante uma noite a 4°C e sob agitação lenta. Após diálise, as proteínas foram concentradas com o *kit Pierce® Concentrator* (Thermo Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (Sambrook *et al.*, 1989).

As amostras obtidas nas extrações foram analisadas em gel de poliacrilamida composto por duas partes: gel de empacotamento a 5% na porção superior e um gel de separação a 15% na porção inferior. O aparato do gel de poliacrilamida foi montado com espaçadores de 0,75 mm de espessura. Inicialmente foi depositado no aparato o gel de separação em concentração final de 15%. Este gel consistiu de 1,3 mL de Tris-HCl 1,5 M em pH 8,8, 2,5 mL de bis-acrilamida na proporção 1:29 e a 30% de concentração, 50 µL de SDS 10%, 85 µL de persulfato de amônia (0,1 µg/ml), 15 µL de Temed e água autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 5 mL.

Após depositar o gel de separação foi adicionado aproximadamente 1 mL de propanol para evitar que o gel secasse e se enrugasse enquanto ocorresse a polimerização do gel, o que levou entre 30 a 60 minutos. Após a polimerização do gel de separação foi descartado o propanol e foi depositado o gel de empacotamento em concentração final de 5%. Este consistiu de 0,375 mL de Tris-HCL 1,0 M em pH 6,8, 0,5 mL de bis:acrilamida na proporção 1:29 e a 30% de concentração, 30 µL de 10% de SDS, 50 µL de persulfato de amônia (0,1 µg/ml), 10 µL de Temed e água autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 3 mL.

As amostras foram aplicadas no gel, na seguinte proporção: 20 µL das frações foram misturadas a 10 µL de tampão de amostra 3x (50 mM de Tris-HCl em pH 6,8, 45% de glicerol e 2% de SDS). Esta mistura foi fervida por 5 minutos a 95°C, aplicadas no gel e submetidas a eletroforese por 1 hora a 120 Volts. Após a corrida as proteínas totais presentes nas frações foram visualizadas após coloração do gel em solução contendo o corante *Coomassie Blue* (0,25% de *Coomassie Blue* R-250, 10% de ácido acético e 50% de etanol) por 1 hora e, em seguida, descorado em solução descorante (10% de etanol e 5% de ácido acético).

3.4.3. Análise de EMSA em gel de poliacrilamida

Para a análise de EMSA em gel de poliacrilamida, foram utilizados como sondas os mesmos oligonucleotídeos dupla fita gerados para o ensaio FURTA. Para que não houvesse redução no rendimento de proteína Fur purificada, não foi realizada a etapa de remoção da cauda de poli-histidina por proteases específicas. Segundo Gao *et al.* (2008), a proteína Fur com cauda poli-histidina não perde sua capacidade de se ligar ao DNA, podendo ser utilizada em experimentos de EMSA e DNase I *footprinting*.

As sondas dupla fita foram marcadas com o auxílio do *Biotin 3' End DNA Labeling Kit* (Pierce Protein), e o EMSA realizado utilizando-se os kits *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit* e *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module* (Pierce Protein), seguindo as recomendações do fabricante porém com algumas modificações como se segue. Inicialmente a proteína Fur (5 µg) foi mantida por 10 minutos no gelo em 20 µL de uma reação composta por um tampão de ligação (10 mM

de Tris-HCL, 50 mM de KCl, 1 mM de DTT, em pH 7.5), 100 μ M de $MnCl_2$, 50 μ g/mL de poli dl-dC, 2,5% de glicerol, 5 mM de $MgCl_2$ e 0,05% de NP-40. A esta mistura foi acrescentado 25 fmoles de sonda marcada com biotina, e as amostras foram incubadas novamente por 20 minutos em gelo. As amostras (sondas livres e os complexos DNA-proteína) foram então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 4% não desnaturante (pré-corrído a 100 Volts por 30 minutos) por 1 hora a 100 Volts em tampão Tris-borato (sem EDTA). Após a corrida, as amostras contidas no gel foram transferidas para membranas de *nylon* por 1 hora a 380 mA em tampão TBE 1x. Para a fixação das amostras à membrana esta foi submetida à irradiação com luz ultravioleta por 10 minutos. Os resultados foram visualizados após detecção das amostras contidas nas membranas com o kit *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module*, exposição destas membranas em filme raio-X seguido de revelação dos filmes.

3.4.4. Análise de EMSA em gel de agarose

A técnica de EMSA foi realizada em gel de agarose para os boxes Fur encontrados nas regiões intergênicas entre os genes *fepA* e *fes* e entre os genes *fepD* e *entS*. Para isso, as regiões intergênicas foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico de *K. pneumoniae* e com os pares de *primers* descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reações de amplificação das regiões intergênicas entre *fepD-entS* e *fepA-fes*. Tamanho dos amplicons em pares de bases.

Região intergênica	Sense (5' > 3')	Anti-sense (5' > 3')	Amplicon
<i>fepD-entS</i>	GCTGAAGGCGGTGAATACC	GAATGGGTCATCATCTGGATCT	396
<i>fepA-fes</i>	TTCCCAGATTGACCAGCAA	CGCCACCAGAACGTTACC	400

A reação de PCR continha os seguintes reagentes: tampão de reação 1x, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada *primer*, 0,5 μ g de DNA genômico de *K. pneumoniae*, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase e quantidade suficiente de água

autoclavada para o volume final de 25 μ l. As reações foram submetidas aos seguintes ciclos: etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos. O resultado obtido na reação de PCR foi checado após aplicação das amostras em gel de agarose 1% e corrida de eletroforese em 5 mM de tampão de corrida borax (tetraborato de sódio). Em seguida, as regiões intergênicas foram purificadas por meio da excisão de bandas em gel de agarose com o kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Para o EMSA em gel de agarose a proteína Fur (5 μ g) foi mantida por 10 minutos no gelo em 20 μ L de uma reação composta por tampão de ligação (10 mM de Tris, 50 mM de KCl, 1 mM de DTT, em pH 7.5), 100 μ M de MnCl₂, 50 μ g/ml de poli dI-dC, 2,5% de glicerol, 5 mM de MgCl₂ e 0,05% de NP-40. Após a incubação foi acrescentado 500 ng da região intergênica amplificada, e a mistura foi incubada por 30 minutos no gelo. Após isso, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio e submetidas à eletroforese em tampão de corrida borax a 5 mM.

3.5. Caracterização do padrão de expressão dos genes com box Fur

3.5.1. Cultivo de *Klebsiella pneumoniae* e obtenção de massa celular

Para os experimentos de PCR em tempo real foram utilizadas células de *K. pneumoniae* cultivadas a 37°C e 200 r.p.m. de agitação. Após as células atingirem uma D.O._{600nm} de 0.4, 100 μ M (concentração final) de FeSO₄ foi adicionado em um dos frascos e 100 μ M (concentração final) de 2,2'-dipiridil foi adicionado em outro frasco. No terceiro frasco nada foi adicionado, constituindo-se assim em condição controle. Após a adição dos suplementos, as células foram incubadas por 30 minutos e em seguida as células foram isoladas por centrifugações para a extração de RNA total.

3.5.2. Isolamento de RNA total e síntese de cDNA

RNA total foi extraído das células de *K. pneumoniae* cultivadas nas condições descritas acima. Para a estabilização e preservação do RNA, as células foram isoladas e armazenadas em *RNAprotect[®] Bacteria Reagent* (Qiagen) a -80°C até o momento da extração do RNA. A extração foi realizada utilizando-se o kit *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com *DNase* (Qiagen) para a remoção de DNA, quantificado em espectrofotômetro e guardado a -80°C até o momento de sua utilização na síntese de cDNA.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com o RNA total extraído na seção anterior e a partir do kit *ThermoScript[™] RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para tal, a 3 µg de RNA total foram acrescentados 2 µL de um mix de dNTPs (10 mM), 1 µL de *primer* hexâmero randômico (50 ng/µL) e quantidade suficiente de água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) para um volume final de 12 µL. Esta mistura foi submetida à desnaturação por 5 minutos a 65°C. Após este período de incubação, foram acrescentados à mistura 4 µL de tampão de reação (5x), 1 µL de DTT (100 mM), 1 µL de *RNaseOUT[™]* (40U/µl), 1 µL de água tratada com DEPC e 1 µL da enzima *ThermoScript[™] RT* (15 U/µL). A reação de síntese de cDNA foi realizada após incubação da mistura a 25°C por 10 minutos seguida de incubação a 50°C por 50 minutos. A reação foi finalizada após incubação a 80°C por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1µl de RNase H (2 U/µL) e a reação foi incubada a 37°C por 20 minutos. Após a incubação, o cDNA sintetizado foi então quantificado em espectrofotômetro e utilizado nas reações de PCR em tempo real.

3.5.3. PCR em Tempo Real

O padrão de expressão dos genes com box Fur validado foi investigado por PCR em tempo real, a partir dos cDNAs sintetizados conforme descrito na seção 3.5.2. Os pares de *primers* específicos para cada gene foram previamente testados por PCR convencional a partir de DNA genômico de *K. pneumoniae*, para se averiguar a eficiência de amplificação dos genes. Os *primers* foram desenhados com o programa

Primer3 v. 0.4.0 (Rozen e Skaletsky, 2000) de maneira que tivessem temperatura de anelamento de 60°C e que rendessem *amplicons* com tamanhos entre 90 a 105 pares de bases (Tabela 3).

Tabela 3. Seqüência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real. O tamanho dos amplicons está representado em pares de bases.

Gene	Primer Sense (5' > 3')	Primer Anti-sense (5' > 3')	Amplicon
<i>fhuA</i>	CCTTCCTGAGCAACTTCCAG	CTTACCGTTGGCGTCGTAAT	98
<i>sitA</i>	ATCTTCAGCGAAAGCACCAT	GCTCAGCGAATCGACATACA	99
<i>exbB</i>	GCCTCACCACCCAGCTTAT	AAAACCGGTTTCGTTTCCTTG	95
<i>tonB</i>	ACGCAGCCGATAGAGATCA	CTCAGGTTCCGGTTCAACA	99
<i>cirA</i>	CGACGGCAAGTATGTCCTG	GCTCAGGTTGACCGGATCT	100
KPN_3087	CGGAAAATCTGTCCGACCT	GACGGCAGAACCTGGGTAT	100
<i>iron</i>	ATCGGGATATTCGCCTGAA	GGCCAGGCTCATTGTAGGT	96
<i>ybiL</i>	AGTATGCCGCACTCAACTCC	GGGTACCGCTGTCCGGTAGTA	96
<i>fes</i>	CACCACAACACAGCAGACG	GGCTGCCAGAGCTGGATA	105
<i>fepD</i>	AGCTGATCGGCCTAATCGT	CCATATGCGGCATCATCA	96
<i>fepB</i>	TGACGATAAAAAGCTGGCAAA	CTGTTTATTGAAGTCGGCAATG	97
<i>entC</i>	TTGCTGAACTGGAACCCTTC	CGGATAGTCACCACCCACTC	94
<i>recA</i>	TTAAACAGGCCGAATTCCAG	CCGCTTTCTCAATCAGCTTC	99
<i>rho</i>	AACTACGACAAGCCGAAAA	ACCGTTACCACGCTCCATAC	99

As reações foram realizadas em triplicatas no equipamento *Real-Time PCR System 7500* (Applied Biosystems) e com o kit *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada com o intuito de se verificar a especificidade da reação, ou seja, a possível presença de bandas inespecíficas e/ou dímeros de *primers*.

A análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do *Sequence Detection Software v1.3.1* (Applied Biosystems). Como controles internos foram utilizados os genes endógenos *rho* e *recA* que codificam respectivamente um fator envolvido com a terminação da transcrição e uma enzima envolvida com o processo de recombinação do DNA. Para o cálculo da expressão relativa dos genes foi utilizado o método $\Delta\Delta C_T$, como descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os dados obtidos nos experimentos de PCR em tempo real foram analisados estatisticamente com o teste t de *Student*.

3.6. Análise da transcrição policistrônica dos genes em operons

Alguns genes nos quais foram identificados prováveis boxes Fur estão organizados em operons ou *clusters* gênicos. Assim, reações de PCR foram feitas para se investigar se os genes que compõem cada um desses operons são transcritos numa mesma unidade transcricional; ou seja, se são transcritos num único RNA policistrônico. Para tal, foram utilizados DNA genômico isolado de *K. pneumoniae* e cDNAs sintetizados para os experimentos de PCR em tempo real. As reações foram realizadas com pares de *primers* (Tabela 4) que anelam em cada uma das extremidades dos genes.

A reação de PCR continha os seguintes reagentes: tampão de reação 1x, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 μM de cada *primer*, 0,5 μg de DNA genômico ou 100 ηg de cDNA de *K. pneumoniae*, 2,5 unidades de *SuperTaq DNA polimerase* (Ambion) e quantidade suficiente de água autoclavada para o volume final de 25 μL . As reações foram submetidas aos seguintes ciclos: etapa inicial de desnaturação a 93°C por 5 minutos, 40 ciclos de 93°C por 1 minuto, 60°C por 45 segundos e 68°C por 5 minutos, e uma etapa final de extensão a 68°C por 10 minutos. O resultado obtido na reação de PCR foi checado após aplicação das amostras em gel de agarose 0.8% e corrida de eletroforese em tampão de corrida TBE 1x.

Tabela 4. Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas análises de transcrição policistrônica dos genes organizados em operons.

Operon	Entre os genes	Primers ¹	Sequência (5' > 3')	Amplicon ²
<i>fhu</i>	<i>fhuA</i> e <i>fhuD</i>	<i>fhuA</i> -S	CCTTCCTGAGCAACTTCCAG	2331
		<i>fhuD</i> -AS	GTTCAAGGTTGGGTTCCGGTA	
	<i>fhuD</i> e <i>fhuB</i>	<i>fhuD</i> -S	GTGGCCGATATTCCCAACTA	2267
		<i>fhuB</i> -AS	GCTATATGTCGACCCCGAGA	
<i>sit</i>	<i>sitA</i> e <i>sitD</i>	<i>sitA</i> -S	ATCTTCAGCGAAAGCACCAT	2709
		<i>sitD</i> -AS	CCGAACAGGATATGGTTCGAG	
<i>exbB-exbD</i>	<i>exbB</i> e <i>exbD</i>	<i>exbB</i> -S	GCCTCACCACCCAGCTTAT	770
		<i>exbD</i> -AS	GCTATCCAGGGCGTTAATCA	
<i>enterobactina</i>	<i>fes</i> e <i>ychP</i>	<i>fes</i> -S	CACCACAACACAGCAGACG	255
		<i>ychP</i> -AS	GCAGGCAGGTCGCAGT	
	<i>ychP</i> e <i>entF</i>	<i>ychP</i> -S	CTTCGACAATCCGCAAGG	3644
		<i>entF</i> -AS	CCTTCGATAGCGCTGAACA	
	<i>fepC</i> e <i>fepD</i>	<i>fepC</i> -S	CGATATCACGGTGCAGGAG	1659
		<i>fepD</i> -AS	CCATATGCGGCATCATCA	
	<i>entC</i> e <i>entH</i>	<i>entC</i> -S	TTGCTGAACTGGAACCCTTC	3700
		<i>entH</i> -AS	TGCCCTTCTTCGGTCATC	

1. S, primer sense; AS, primer anti-sense.

2. Tamanho dos amplicons em pares de bases.

3.7. Técnicas básicas de biologia molecular

As técnicas básicas de biologia molecular como extração de DNA, eletroforese de ácidos nucleicos, digestão enzimática do DNA, clonagens, foram realizadas conforme Sambrook *et al.* (1989).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de prováveis boxes Fur

As análises de bioinformática permitiram a identificação de prováveis boxes Fur na região promotora de 12 genes envolvidos na captação de ferro e transdução de energia. Na Tabela 5 estão representadas as sequências nucleotídicas dos prováveis boxes Fur identificados, as localizações e os respectivos scores.

Alguns dos genes nos quais foram identificados boxes Fur estão organizados em *clusters* gênicos ou operons, conforme esquematizado na Figura 2. Dentre esses genes estão *fes*, *fepD* e *entC*, do cluster gênico da via de síntese e captação de sideróforo enterobactina (Figura 2A), o gene *fhuA* do operon *fhu*, composto dos genes *fhuA*, *fhuC*, *fhuD* e *fhuB* (Figura 2B), o gene *sitA* do operon *sit*, composto dos genes *sitA*, *sitB*, *sitC* e *sitD* (Figura 2C), e o gene *exbB* adjacente ao gene *exbD* (Figura 2D).

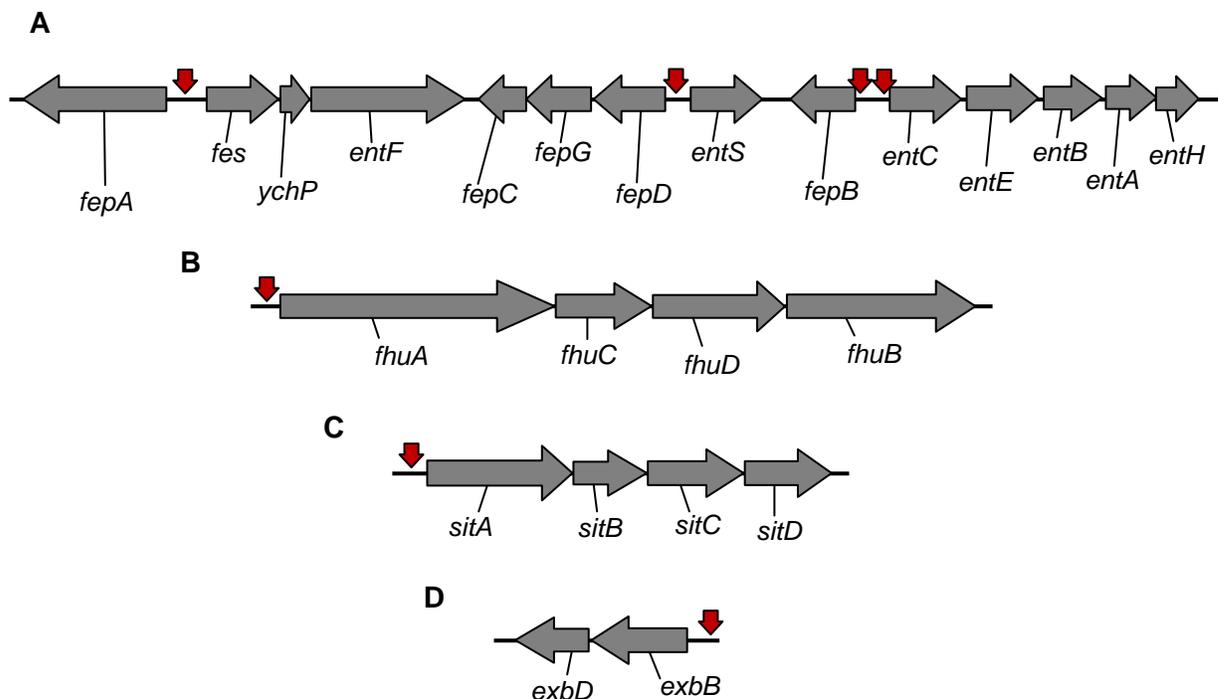


Figura 2. Genes organizados em *clusters* gênicos nos quais foram identificados boxes Fur (setas vermelhas) na região promotora.

Tabela 5. Prováveis boxes Fur encontrados na região promotora de genes do sistema de captação de ferro.

Categoria Funcional	Gene/Locus	Função da proteína	BOX FUR		
			Localização	Seqüência	Score
Captação de Ferro					
Íon Férrico	<i>fhuA</i>	Receptor de ferricromo (membrana externa).	51pb <i>upstream</i>	AATAATAATTCTCGTTTAC	15.75
	<i>iroN</i>	Receptor de sideróforos (membrana externa).	48 pb <i>upstream</i>	GATAACAATTATCATTACA	17.98
	<i>fes</i>	Via de síntese do sideróforo enterobactina.	142 pb <i>upstream</i>	GCAAATAGTTATCAATAAT	13.07
	<i>entC</i>	Via de síntese do sideróforo enterobactina.	42pb <i>upstream</i>	GATAATTATTCTTAATATC	18.83
	<i>fepD</i>	Receptor de enterobactina (membrana interna).	18pb <i>upstream</i>	GATAATGATAGTAATTATC	21.31
	<i>fepB</i>	Receptor de enterobactina (membrana interna).	26 pb <i>upstream</i>	ATAAATGCGTCTCATTTC	14.13
	KPN_03087	Receptor de enterobactina férrica e colicinas.	134 pb <i>upstream</i>	GATAATACCTATCATTACC	16.07
	<i>cirA</i>	Receptor de enterobactina e colicinas (membrana externa).	242 pb <i>upstream</i>	GATAATGATTACGATTATC	21.80
	<i>ybiL</i>	Receptor Fiu (sideróforo catecolato).	107pb <i>upstream</i>	AAGAATAGTTATCATTTC	16.17
Íon Ferroso	<i>sitA</i>	Captação de ferro e manganês. Resistência a estresse oxidativo.	100pb <i>upstream</i>	GCAAATAAGAATTATTTTC	18.94
Transdução de Energia					
	<i>tonB</i>	Sistema de transdução de energia próton motora.	38 pb <i>upstream</i>	GCAAATAGCAATCATATTC	11.38
	<i>exbB</i>	Sistema de transdução de energia próton motora.	78 pb <i>upstream</i>	GATAGTGGTTCTCATTAGT	12.73

A partir dos 12 prováveis boxes Fur identificados foi possível construir uma sequência nucleotídica consenso (Tabela 6). Como os boxes foram identificados em genes que pertencem ao sistema de captação de ferro, é possível inferir que esta é provavelmente a sequência nucleotídica consenso da proteína Fur em genes que pertencem àquela categoria funcional. De fato, comparando a sequência consenso dos genes de captação e homeostase de ferro com a sequência consenso clássica descrita por Escolar *et al.* (1999) verifica-se uma identidade bastante elevada, com apenas 2 nucleotídeos divergentes dentre os 19 que compõe o box Fur (Tabela 6).

Tabela 6. Sequência nucleotídica consenso dos boxes Fur identificados na região promotora de genes do sistema de captação de ferro.

Genes/locus	Box Fur identificado¹	Escore²
<i>cirA</i>	GATAATGATTACGATTATC	21.80
<i>fepD</i>	GATAATGATAGTAATTATC	21.31
<i>sitA</i>	GCAAATAAGAATTATTTTC	18.94
<i>entC</i>	GATAATTATTCTTAATATC	18.83
<i>iroN</i>	GATAACAATTATCATTACA	17.98
<i>ybiL</i>	AAGAATAGTTATCATTTC	16.17
KPN_03087	GATAATACCTATCATTACC	16.07
<i>fhuA</i>	AATAATAATTCTCGTTTAC	15.75
<i>fepB</i>	ATAAATGCGTCTCATTTC	14.13
<i>fes</i>	GCAAATAGTTATCAATAAT	13.07
<i>exbB</i>	ACTAATGAGAACCCTATC	12.73
<i>tonB</i>	GCAAATAGCAATCATATTC	11.38
CONSENSO³	GATAATaATtATCATTATC	-
CLÁSSICA³	GATAATgATaATCATTATC	-

1. Nucleotídeos mais prevalentes dentre as sequências estão realçados.

2. Genes organizados a partir do maior escore, obtido nas análises de bioinformática.

3. Sequência CONSENSO baseada nos boxes Fur identificados neste trabalho. Sequência consenso CLÁSSICA de acordo com Escolar *et al.* (1999). Nucleotídeos divergentes em minúsculo.

4.2. Validação dos boxes Fur pelo ensaio FURTA

Inicialmente os boxes Fur identificados nas análises de bioinformática foram validados pelo ensaio FURTA. Na Figura 3 pode-se observar um controle positivo de cor avermelhada (presença de box Fur funcional), controle negativo incolor (ausência de box Fur), e a confirmação funcional dos boxes Fur identificados.

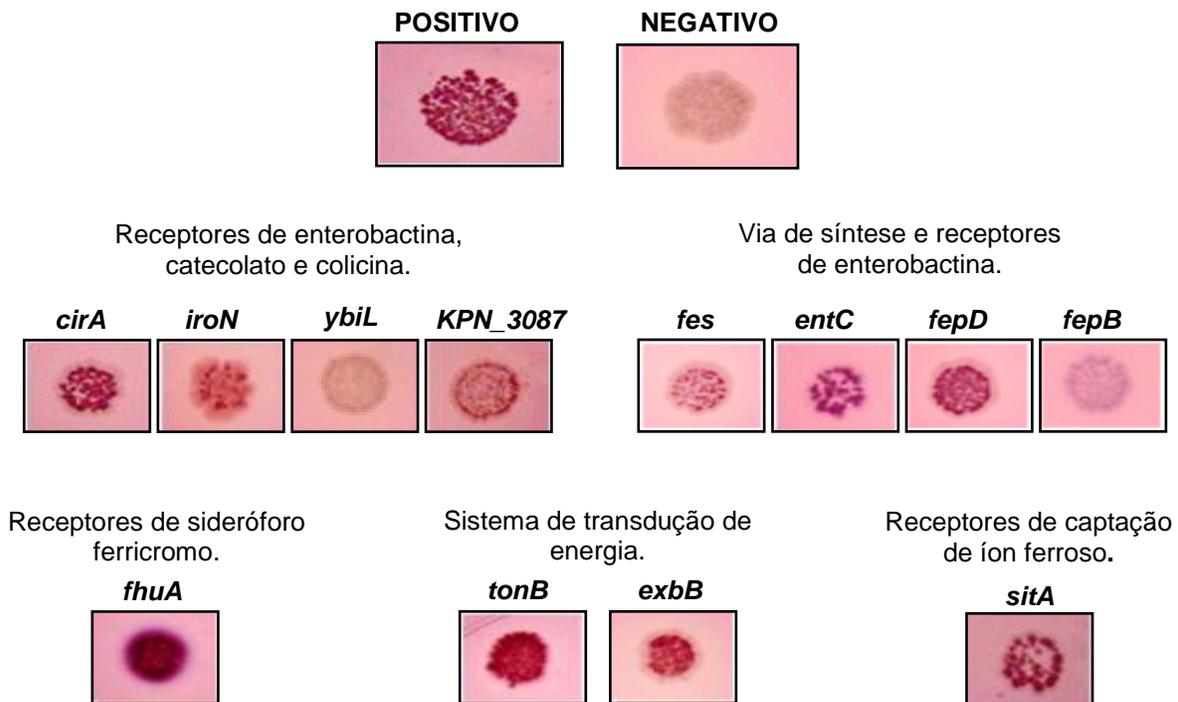


Figura 3. Validação dos boxes Fur nos genes (colônias avermelhadas) analisados pelo ensaio FURTA e presença de dois controles, positivo (+) e negativo (-).

Pode-se notar que a maioria dos genes apresentam boxes Fur funcionais (válidos), como é o caso dos boxes Fur nos genes *cirA*, *entC*, *fepD*, *fhuA*, *tonB*, *exbB* e *sitA* conforme pode ser constatado pelo padrão de coloração intensamente vermelho das colônias. Por outro lado, o ensaio FURTA mostra que os boxes Fur dos genes *ybiL* e *fepB* não são funcionais, como pode ser notado pelas colônias incolores. O resultado pode ser explicado considerando que no ensaio FURTA é utilizada uma linhagem de

Escherichia coli (H1717) nas quais são inseridos boxes Fur de uma outra bactéria, no caso a *Klebsiella pneumoniae*. Apesar do gene *fur* de *K. pneumoniae* e de *E. coli* apresentarem uma elevada homologia na sequência nucleotídica (85% de identidade, *E-value* de 2e-143), é possível que a proteína Fur de *E. coli* H1717 não tenha afinidade aos boxes Fur dos genes *ybiL* e *fepB* de *K. pneumoniae*. Outra metodologia, como o EMSA, seria necessária para confirmar se os boxes Fur dos genes *ybiL* e *fepB* são realmente não funcionais.

Similarmente ao descrito neste trabalho, Tsolis e colegas (1995) também identificaram, pelo ensaio FURTA, 14 genes do sistema de captação e homeostase de ferro que são regulados por Fur em *Salmonella typhimurium*. Dentre estes genes regulados por Fur, 11 foram descritos também em *E. coli* ou *Yersinia enterocolitica*, incluindo os genes *fhuA*, *fhuB*, *fepA*, *fes*, *fepD*, *p43*, *entB*, *fur*, *foxA*, *hemP*, e *fhuE*.

Lin e colegas (2011) mostraram que o Fur serve como um repressor na regulação de pelo menos oito sistemas de aquisição ferro em *K. pneumoniae* CG43, embora em níveis diferentes. No estudo de Lin e colegas (2011), a análise dos boxes Fur nos genes *iroB*, *entC*, *hmuR*, *iucA*, *feo* e *fec* revelou níveis elevados de identidade com a sequência consenso do Fur, enquanto que os genes *fhuA* e *sitA* apresentaram identidades relativamente mais baixa. Isto sugere que uma sequência altamente conservada de 19 pares de bases da sequência é necessária para um fenótipo FURTA positivo. Esta correlação não foi observada no nosso trabalho, já que os boxes Fur dos genes *TonB* e *exbB* apresentaram escores baixos, no entanto através do ensaio FURTA os dois genes foram validados positivamente.

Baghal e co-autores (2010) mostraram a importância da proteína de membrana FepA (85 kDa) na patogenicidade bacteriana. Camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína FepA purificada. Os anticorpos produzidos pelos camundongos foram capazes de reconhecer e se ligar à proteína FepA. Os camundongos imunizados foram desafiados com as bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi* e sobreviveram, indicando que FepA é um potencial antígeno candidato a vacina.

4.3. Validação dos boxes Fur pela técnica do EMSA.

4.3.1. Amplificação do gene *fur* e clonagem no vetor de expressão pET-28a

O gene *fur* de *Klebsiella pneumoniae* foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico extraído de células de *K. pneumoniae*. O resultado obtido na reação de PCR foi checado após aplicação das amostras em gel de agarose 1% e corrida de eletroforese em tampão de corrida TBE 1x. Após a amplificação, o gene *fur* de *K. pneumoniae* e o vetor de expressão pET-28a foram digeridos com as enzimas de restrição *Xho*I e *Nde*I e, em seguida, purificados por meio da excisão de bandas em gel de agarose. A Figura 4 mostra o gene *fur* amplificado por PCR antes e após a purificação por meio da excisão de bandas em gel de agarose.

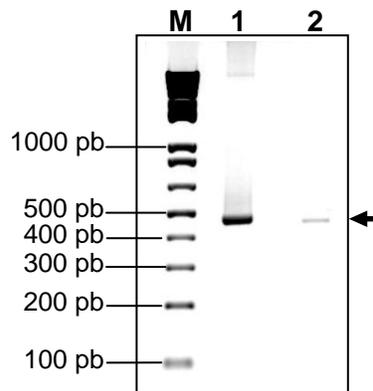


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose mostrando o gene *fur* amplificado por PCR (1) e este mesmo produto de PCR após a digestão com as enzimas *Xho*I e *Nde*I e a purificação por excisão de bandas do gel (2). A seta indica o tamanho do *amplicon* (472 pares de bases). **M**, marcador de peso molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

Após as purificações o gene *fur* foi clonado no vetor de expressão pET-28a, resultando no vetor pET-28a-*fur*. Este vetor foi utilizado para a transformação de células

de *E. coli* DH5 α , e clones recombinantes foram obtidos por meio de *minipreps*. Clones recombinantes contendo o gene *fur* de *K. pneumoniae* foram selecionados por meio de reação PCR, conforme ilustrado na Figura 5.

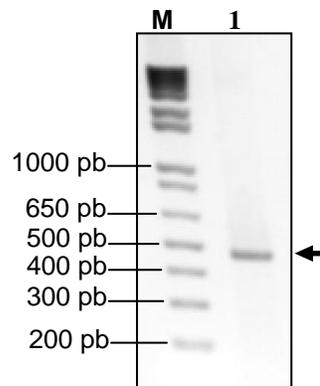


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose mostrando o gene *fur* amplificado por PCR a partir do DNA plasmidial extraído por *minipreps*. Este resultado confirma a presença do gene *fur* clonado no vetor pET-28a. A seta indica o tamanho do *amplicon* (472 pares de bases). **M**, marcador de peso molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

4.3.2. Expressão e Purificação da proteína Fur

Para a expressão da proteína Fur foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o vetor de expressão pET-28a+*fur*. A purificação da proteína Fur foi obtida com o kit *His-Select Nickel Affinity Gel* (Sigma-Aldrich).

Frações da proteína Fur foram obtidas com o tampão de eluição contendo 250 mM de imidazol. Em seguida as frações foram agrupadas, dialisadas e armazenadas no freezer -80°C no tampão de diálise. O método de Bradford indicou a concentração da proteína Fur purificada em 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e esta foi utilizada no ensaio de EMSA. A Figura 6 mostra a análise no gel de poliácridamida das frações de proteína total e do Fur obtidas durante o processo de purificação.

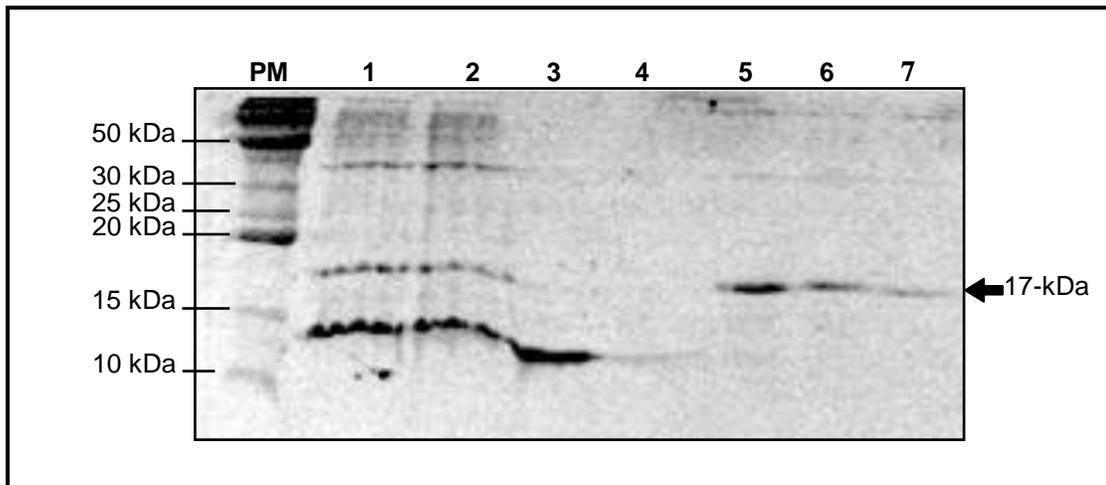


Figura 6. Gel de poliacrilamida mostrando as proteínas totais e a proteína Fur (seta) purificada com o kit *His-Select Nickel Affinity Gel*. **PM**, marcador de peso molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen); **1.** fração solúvel (sobrenadante) de BL21(DE3) com o vetor pET-28a+*fur* lisada após a indução com IPTG; **2.** fração insolúvel (precipitado) de BL21(DE3) com o vetor pET-28a+*fur* após a indução com IPTG; **3.** Após a primeira lavagem; **4.** Após a segunda lavagem; **5 e 6.** Frações da proteína Fur (seta) eluída com tampão contendo 250 mM de imidazol; **7.** Proteína Fur após a diálise.

4.3.3. Análise de EMSA em gel de poliacrilamida e em gel de agarose

A análise por EMSA foi realizada com o objetivo de investigar a interação da proteína Fur com os boxes Fur identificados. Esta técnica é baseada no fato de que em uma corrida de eletroforese o DNA quando complexado à uma proteína migra mais lentamente do que o DNA não complexado. A análise por EMSA foi realizada apenas para os boxes Fur identificados na região promotora dos genes *iroN* e *tonB* e aqueles boxes Fur identificados nas regiões entre os genes *fepA* e *fes* e entre *fepD* e *entS*.

Para o EMSA dos boxes Fur identificados na região promotora dos *iroN* e *tonB* foram utilizados como sonda oligonucleotídeos dupla fita contendo a sequência nucleotídica dos boxes Fur. Devido ao tamanho curto destas sondas, aproximadamente 20 pares de bases, as análises por EMSA destes boxes Fur foram realizadas em gel de poliacrilamida e com as sondas marcadas com biotina. A Figura 7 mostra os resultados

obtidos nesta análise, e confirma a interação da proteína Fur com os boxes Fur identificados naqueles genes.

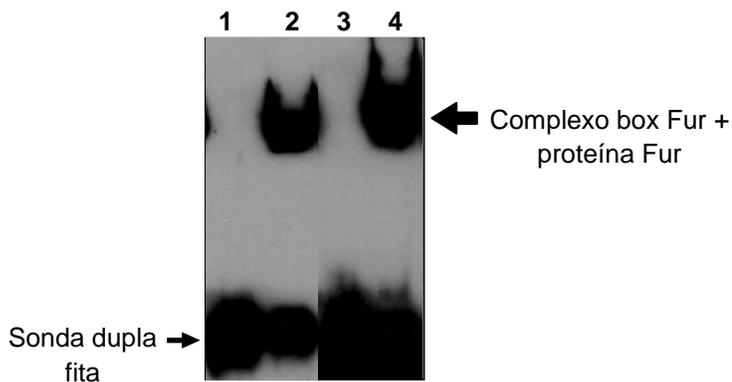


Figura 7. EMSA em gel de poliacrilamida dos boxes Fur identificados na região promotora dos genes *iroN* e *tonB*. **1.** oligo *iroN* marcado com biotina na ausência da proteína Fur; **2.** oligo *iroN* marcado com biotina incubado com a proteína Fur; **3.** oligo *tonB* marcado com biotina na ausência da proteína Fur; **4.** oligo *tonB* marcado com biotina incubado com a proteína Fur.

Para o EMSA dos boxes Fur identificados nas regiões entre os genes *fepA* e *fes* e entre *fepD* e *entS* optou-se pela análise em gel de agarose. Isto porque neste caso foram utilizadas as regiões intergênicas amplificadas por PCR. Como os fragmentos amplificados eram maiores, com tamanhos de aproximadamente 400 pares de bases, o EMSA pôde ser realizado em gel de agarose.

Para a análise do EMSA em gel de agarose as regiões intergênicas foram inicialmente amplificadas por PCR, conforme mostra a Figura 8. A partir destas regiões amplificadas foi realizado o EMSA, nas mesmas condições de incubação conduzidas no caso anterior, com a exceção de que as sondas livres e os complexos boxes Fur + proteína Fur foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida borax 5 mM. A Figura 9 mostra os resultados obtidos no EMSA em gel de agarose, confirmando que os boxes Fur identificados regiões intergênicas são sítios de interação com a proteína Fur.

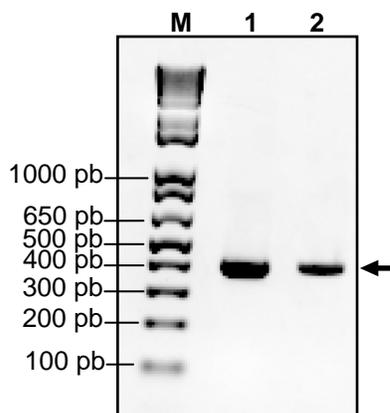


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose mostrando regiões entre os genes *fepD* e *entS* (1, 396 pares de bases) e entre os genes *fepA* e *fes* (2, 400 pares de bases) amplificadas por PCR (seta). **M**, marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

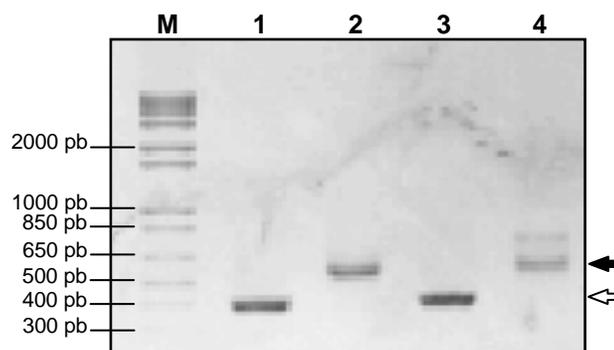


Figura 9. EMSA em gel de agarose dos boxes Fur identificados nas regiões entre os genes *fepD* e *entS* e entre os genes *fepA* e *fes*. 1. região intergênica *fepD-entS* (seta branca) na ausência da proteína Fur; 2. região intergênica *fepD-entS* incubada com a proteína Fur e o complexo formado (seta preta); 3. região intergênica *fepA-fes* (seta branca) na ausência da proteína Fur; 4. região intergênica *fepA-fes* incubada com a proteína Fur e o complexo formado (seta preta). **M**, marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

Os genes *tonB* (transdução de energia), *iroN* (receptor de salmoquelina) e sintetizadores e receptores de enterobactina são de suma importância para a virulência

da *K. pneumoniae*. Muitos trabalhos têm demonstrado a importância dos sistemas de captação de ferro dependentes da proteína TonB. Hsieh e colaboradores (2008) utilizaram análises de *microarray* em *K. pneumoniae* para investigar a adaptação bacteriana no hospedeiro em escala genômica em diferentes condições de crescimento. Essa investigação identificou supostos sistemas de captação de ferro, como yersiniabactina, aerobactina (genes *iucA-B-C-D-iutA*), e salmoquelina (*iroN-D-C-B*), dependentes de TonB e predominantes em *K. pneumoniae* associada ao abscesso hepático piogênico. Estes resultados sugerem que yersiniabactina, aerobactina, e salmoquelina agem sinergicamente sobre a virulência da bactéria. Estas descobertas sugerem que, embora um único sistema de aquisição de ferro sideróforo-dependente pode ser suficiente para a colonização bacteriana, a presença de sistemas adicionais poderia melhorar a eficiência de crescimento no hospedeiro, permitindo ao agente patogênico múltiplas fontes para importar ferro.

Mutações no gene *tonB* foram avaliadas em vários patógenos gram-negativos, e conferem um fenótipo avirulento quando testadas em modelos animais (Torres *et al.*, 2001). Em estudo de Hsieh e co-autores (2008) uma proteína TonB mutante prejudicou o crescimento bacteriano. Este achado sugere que o mutante TonB perde sua capacidade de ativar a aquisição de ferro por meio dos sistemas de captação de ferro TonB-dependentes. Camundongos BALB/cByJ imunizados com a bactéria mutante TonB negativa sobreviveram ao desafio intraperitoneal com bactérias selvagens (virulentas), enquanto que os de controle não imunizados ou imunizados com a mutante para o gene *maga* (do inglês, *mucoviscosity-associated protein*) morreram dentro de 5 dias de infecção. Estes resultados demonstram que o gene *tonB* é importante para a virulência da bactéria.

4.4. Caracterização do padrão de expressão dos genes investigados

Para os experimentos de PCR em tempo real foi utilizado cDNA sintetizado a partir de RNA total isolado de células de *K. pneumoniae* cultivadas em meio LB

(condição controle), e de células isoladas após 30 minutos de incubação após adição de ferro (100 μ M de FeSO₄) ou 2,2'-dipiridil (100 μ M). Tabela 7 mostra o padrão de expressão dos genes investigados, nas condições, repleta e em privação de ferro, quando comparadas ao padrão observado na condição controle. Os dados foram considerados estatisticamente significativos com p -value ≤ 0.05 .

Tabela 7. Padrão de expressão dos genes investigados no PCR em tempo real.

Gene	Presença de ferro (padrão expressão – p -value)	Presença de 2,2 dipiridil (padrão expressão – p -value)
<i>exbB</i>	Reprimido (0,33 – 0,002)	Induzido (3,11 – 0,02)
<i>tonB</i>	Reprimido (0,41 – 0,03)	Induzido (2,57 – 0,037)
<i>sitA</i>	Reprimido (0,31 – 0,024)	Induzido (2,87 – 0,016)
<i>fhuA</i>	Reprimido (0,57 – 0,002)	Induzido (2,39 – 0,045)
<i>cirA</i>	Reprimido (0,51 – 0,043)	Induzido (1,39 – 0,04)
<i>iroN</i>	Reprimido (0,23 – 0,018)	Induzido (5,67 – 0,015)
<i>ybiL</i>	Reprimido (0,30 – 0,009)	Induzido (3,77 – 0,0001)
KPN_3087	Reprimido (0,26 – 0,05)	Induzido (2,18 – 0,031)
<i>fepA</i>	Reprimido (0,40 – 0,01)	Induzido (2,97 – 0,03)
<i>fes</i>	Reprimido (0,22 – 0,026)	Induzido (5,71 – 0,014)
<i>fepD</i>	Reprimido (0,20 – 0,02)	Induzido (3,5 – 0,006)
<i>entS</i>	Reprimido (0,71 – 0,03)	Induzido (1,72 – 0,05)
<i>fepB</i>	Reprimido (0,41 – 0,0004)	Induzido (1,71 – 0,008)
<i>entC</i>	Reprimido (0,18 – 0,022)	Induzido (3,69 – 0,006)

Através da técnica de PCR em tempo real foi possível avaliar o padrão de expressão dos doze genes envolvidos no sistema de captação de ferro em *Klebsiella pneumoniae*, diante de duas condições de crescimento: na presença e na privação de ferro (tabela 7). O resultado mostra que todos os genes tiveram sua expressão induzida na condição de crescimento com privação de ferro. As duas maiores induções foram observadas nos genes: *iroN*, responsável pela síntese de uma proteína de membrana externa que transporta os complexos sideroforos-Fe⁺³ para o meio periplasmático e o gene *fes* que sintetiza uma proteína citoplasmática, a esterase férrica, que catalisa a remoção do ferro a partir dos complexos sideroforos-Fe⁺³ para a utilização do mesmo no metabolismo celular da bactéria.

Bleuel e co-autores (2005) também usaram a técnica de PCR em tempo real para a quantificação dos genes *entC*, que sintetiza o sideróforo enterobactina, e *fepA* uma proteína de membrana externa receptora de enterobactina férrica em *Escherichia coli* na condição de privação de ferro. Ambos os genes foram altamente expressos na privação de ferro, o gene *FepA* com aumento de 81 vezes e o gene *entC* com um aumento da expressão de 336 vezes. Esses resultados refletem a participação de *entC* e *FepA* na homeostase de ferro. Também pela técnica de PCR em tempo real White-Ziegler e co-autores (2007) demonstraram um aumento na expressão dos genes *Cira* e *fes* quando o cultivo bacteriano era exposto à temperatura a 37°C em comparação a 23°C em cepas de *Escherichia coli*, porém, os pesquisadores mostraram que esse efeito termorregulatório é anulado quando um quelante de ferro (2,2'-dipiridil) é adicionado no meio de crescimento. Estes resultados suportam a hipótese de que a falta de ferro tem um efeito estimulador sobre a transcrição dos genes em ambas as temperaturas.

Os resultados deste trabalho apontam que os genes de captação de ferro em *Klebsiella pneumoniae* estão ativos na condição de crescimento com privação de ferro. A compreensão do sistema captação de ferro é de extrema importância e de relevância clínica, pois, tanto a sobrevivência quanto a patogenicidade bacteriana são altamente dependentes de ferro.

4.5. Unidade transcricional dos genes organizados em operons

Alguns genes nos quais foram identificados prováveis boxes Fur estão organizados em operons ou *clusters* gênicos. Este é o caso dos genes *fes*, *fepD* e *entD*, do cluster gênico da via de síntese e captação de sideróforo enterobactina, o gene *fhuA* do operon *fhu*, composto dos genes *fhuA*, *fhuC*, *fhuD* e *fhuB*, o gene *sitA* do operon *sit*, composto dos genes *sitA*, *sitB*, *sitC* e *sitD*, e o gene *exbB* adjacente ao gene *exbD*. Os genes que compõem estes *clusters* são transcritos numa mesma unidade transcricional, conforme pode ser constatado pelas reações de amplificação por PCR das junções entre os genes (Figuras 10 a 13).

É importante ressaltar que este experimento não representa uma análise quantitativa dos níveis de transcritos nas condições testadas. No entanto, ao demonstrar que aqueles genes são, cada qual em seu *cluster* gênico, transcritos num único RNA policistrônico, é possível estender os resultados obtidos no PCR em tempo real para os demais genes que compõem os operons. Assim, é possível inferir que, de maneira geral, os genes que compõem o operon *fhu* e *sit* encontram-se induzidos na condição de escassez de ferro (presença de 2,2 dipiridil) e reprimidos na condição repleta de ferro, quando comparados à condição controle. Da mesma maneira, é possível inferir que os genes *fes*, *fepD* e *entD*, do cluster gênico da via de síntese e captação de sideróforo enterobactina, e os genes *exbB-exbD* encontram-se induzidos na condição de escassez de ferro e reprimidos na condição repleta de ferro, quando comparado à condição controle.

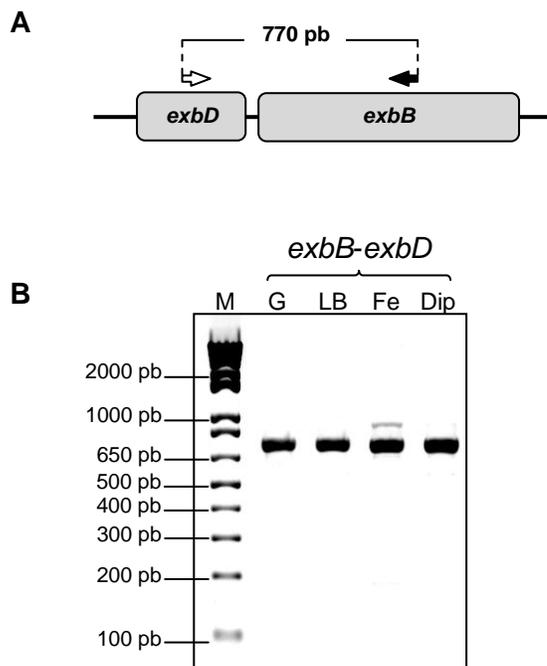


Figura 10. Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes *exbB* e *exbD*. Em **A** estão representados os genes, a posição dos *primers sense* (seta branca) e *anti-sense* (seta negra) utilizados nas reações de PCR, e o tamanho do *amplicom* em pares de bases (pb). Em **B**, gel de agarose 0,8% mostrando os fragmentos gerados após as reações de PCR. As reações foram realizadas com DNA genômico isolado de *K. pneumoniae* (G), e com cDNAs obtidos de células cultivadas em meio LB (LB), e de células incubadas por 30 minutos em meio LB contendo ferro (Fe) e em meio LB contendo 2,2'-dipiridil (Dip). **M**, marcadores de peso molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen) com os tamanhos em pares de bases (pb).

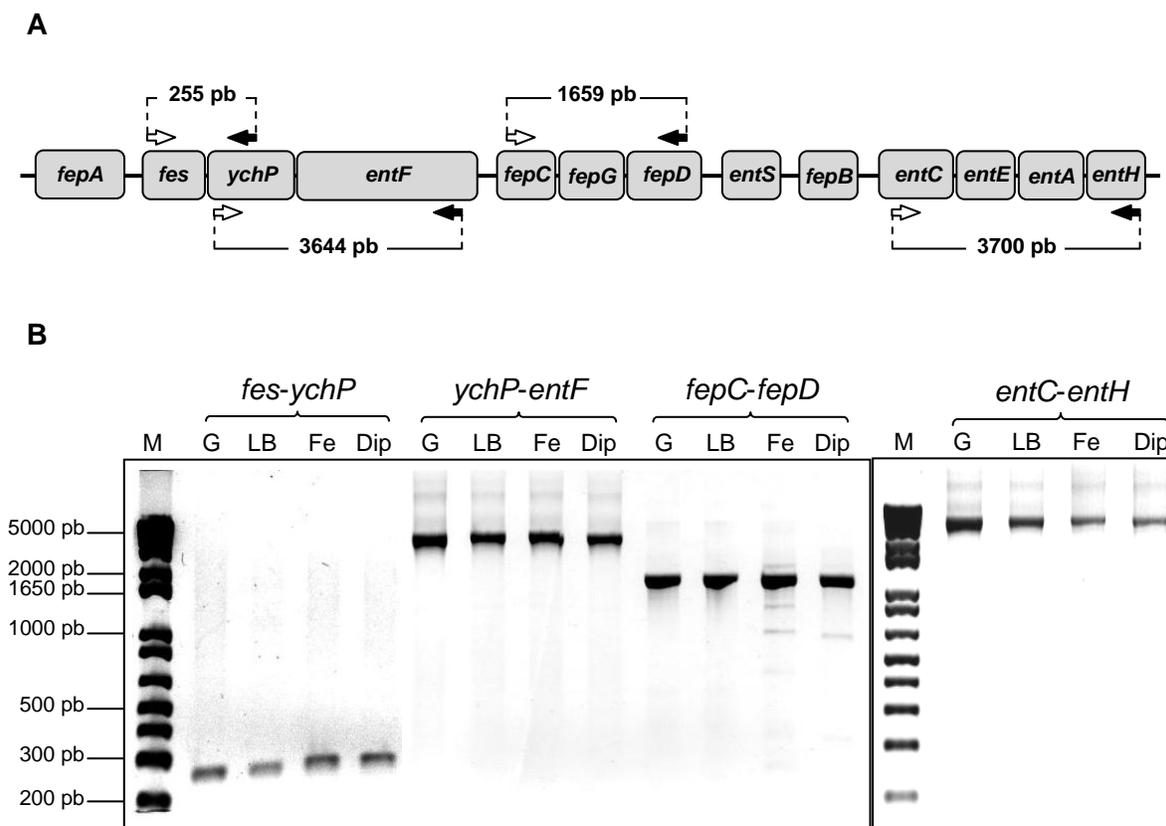


Figura 11. Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes que compõem o cluster gênico da via de síntese e captação do sideróforo enterobactina. Em **A** estão representados os genes do cluster, a posição dos *primers sense* (setas brancas) e *anti-sense* (setas negras) utilizados nas reações de PCR, e os tamanhos dos *amplicons* em pares de bases (pb). Em **B**, gel de agarose 0,8% mostrando os fragmentos gerados após as reações de PCR. As reações foram realizadas com DNA genômico isolado de *K. pneumoniae* (G), e com cDNAs obtidos de células cultivadas em meio LB (LB), e de células incubadas por 30 minutos em meio LB contendo ferro (Fe) e em meio LB contendo 2,2'-dipiridil (Dip). **M**, marcadores de peso molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen) com os tamanhos em pares de bases (pb).

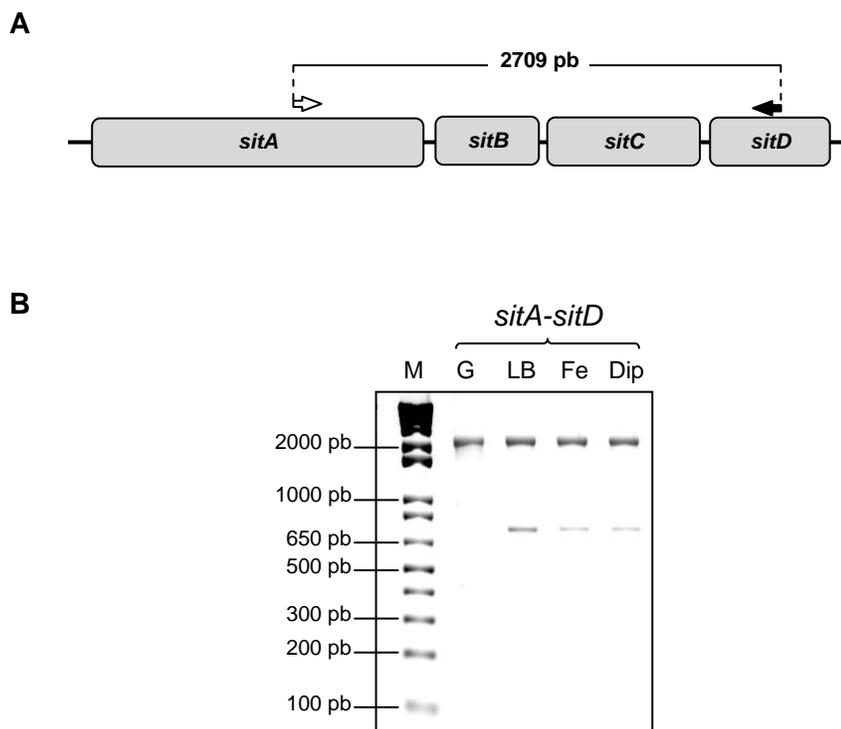


Figura 12. Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes que compõem o operon *sit*. Em **A** estão representados os genes do operon, a posição dos *primers sense* (seta branca) e *anti-sense* (seta negra) utilizados nas reações de PCR, e o tamanho do *amplicom* em pares de bases (pb). Em **B**, gel de agarose 0,8% mostrando os fragmentos gerados após as reações de PCR. As reações foram realizadas com DNA genômico isolado de *K. pneumoniae* (G), e com cDNAs obtidos de células cultivadas em meio LB (LB), e de células incubadas por 30 minutos em meio LB contendo ferro (Fe) e em meio LB contendo 2,2'-dipiridil (Dip). **M**, marcadores de peso molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen) com os tamanhos em pares de bases (pb).

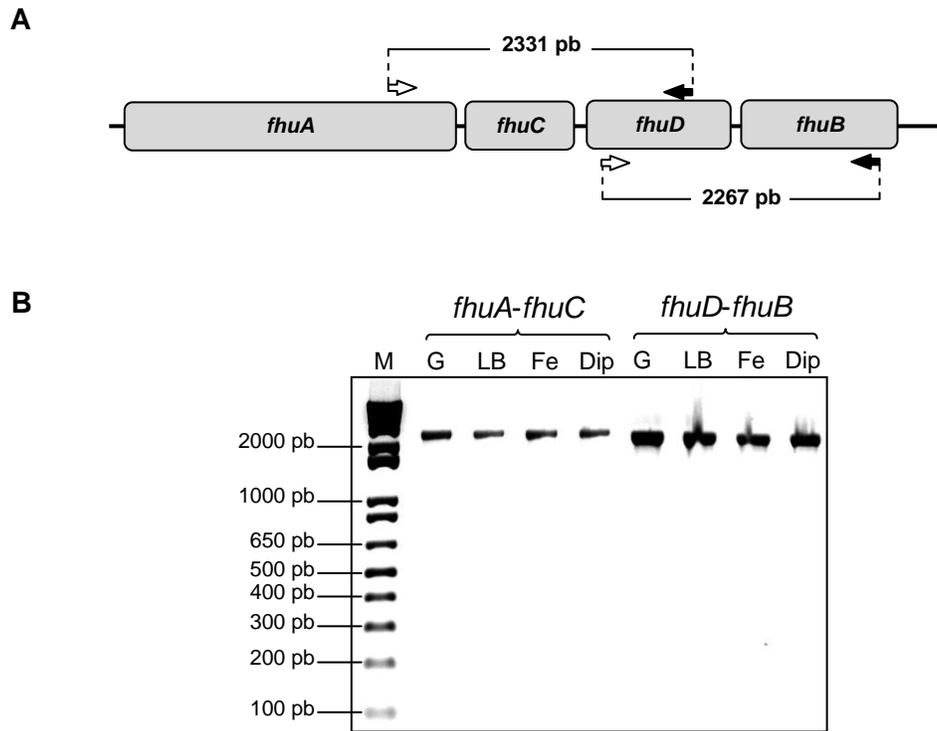


Figura 13. Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes que compõem o operon *fhu*. Em **A** estão representados os genes do operon, a posição dos *primers sense* (setas brancas) e *anti-sense* (setas negras) utilizados nas reações de PCR, e os tamanhos dos *amplicons* em pares de bases (pb). Em **B**, gel de agarose 0,8% mostrando os fragmentos gerados após as reações de PCR. As reações foram realizadas com DNA genômico isolado de *K. pneumoniae* (G), e com cDNAs obtidos de células cultivadas em meio LB (LB), e de células incubadas por 30 minutos em meio LB contendo ferro (Fe) e em meio LB contendo 2,2'-dipiridil (Dip). **M**, marcadores de peso molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen) com os tamanhos em pares de bases (pb).

5. CONCLUSÃO

Pela análise de bioinformática foi possível identificar prováveis boxes Fur na região promotora de genes do sistema de captação e homeostase de ferro. Doze genes foram selecionados de acordo com o melhor escore.

Os boxes Fur identificados no locus gênico KPN_3087 e nos genes *cirA*, *iroN*, *ybiL*, *fes*, *entC*, *fepD*, *fepB*, *fhuA*, *tonB*, *exbB* e *sitA* foram validados pelo ensaio FURTA, o mesmo não ocorrendo com os boxes Fur identificados nos *ybiL* e *fepB*.

A técnica EMSA revelou a interação da proteína Fur com os boxes Fur nos genes *iroN* e *tonB* e nas regiões intergênicas entre os genes *fepD-entS* e *fepA-fes*, confirmando a validação destes boxes.

Expressão dos genes do sistema de captação de ferro com boxes Fur mostrou-se reprimido em meio rico em ferro e induzido em meio com escassez de ferro. Os genes *iroN* e *fes* apresentaram as maiores induções em meio com escassez de ferro.

Os genes nos quais foram identificados boxes Fur e que estão organizados em operons ou *clusters* gênicos são transcritos num único RNA policistrônico. Assim, é possível inferir que, de maneira geral, os demais genes que compõem cada cluster também são induzidos na condição de escassez de ferro e reprimidos na condição repleta de ferro, quando comparados à condição controle.

6. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A., ADAMS, C., SCULLY, N., GLENNON, J., e O'GARA, F. A role for *TonB1* in biofilm formation and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 274, n. 2, p. 269-278, 2007.
- BACHMAN, M. A., OYLER, J. E., BURNS, S. H., CAZA, M., FRANÇOIS LEPINE, F., DOZOIS, C. M., e WEISER, J. N. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 8, p.3309-3316, 2011.
- BAGHAL, S. M. L., GARGARI, S. L. M., e RASOOLI, I. Production and immunogenicity of recombinant ferric enterobactin protein (FepA). **Intern. Journ. of Infect. Diseas.**, v. 14, p. 166-170, 2010.
- BALESTRINO, D., HAAGENSEN, A. J., RICH, C., e FORESTIER, C. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 8, p. 2870-2880, 2005.
- BALESTRINO, D., GHIGO, M., CHARBONNEL, N., HAAGENSEN, J. A., e FORESTIER, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environ. Microbiol.**, v. 10, n. 3, p. 685-701, 2008.
- BANIN, E., VASIL, M. L., e GREENBERG, E. P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v.102, n. 31, p. 11076-11081, 2005.
- BISTER, B., BISCHOFF, D., NICHOLSON, G. J., VALDEBENITO, M., SCHNEIDER, K., WINKELMANN, G.; HANTKE, K., e S'USSMUTH, R.D. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. **Biomaterials**, v.17, p. 471-481, 2004.
- BLEUEL, C., GROÙE, C., TAUDTE, N., SCHERER, J., WESENBERG, D., KRAUÙ, G. J., NIES, D. H., e GRASS, G. TolC Is Involved in enterobactin efflux across the

- outer membrane of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 19, p. 6701-6707, 2005.
- BRAUN, V. Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. **Arch. Microbiol.**, v.167, p.325-331, 1997.
- BSAT N., HERBIG A., CASILLAS-MARTINEZ L., SETLOW P., e HELMANN J. D. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 189-198, 1998.
- BUCHANAN, S. K., SMITH B. S., VENKATRAMANI L., XIA D., ESSER L., PALNITKAR M., CHAKRABORTY R., VAN DER HELM D., e DEISENHOFER J.. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. **Nat. Struct. Biol.**, v. 7, n.6, p.56-63, 1999.
- CAZA, M., LEPINE, F., MILOT, S., e DOZOIS, C. M. Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 8, p. 3539-3549, 2008.
- CHEN, Y. T., CHANG, H. Y., LAI, Y. C., PAN, C. C., TSAI, S. F., e PENG, H. L. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Gene**, v. 337, p. 189-198, 2004.
- CLARKE, T. E., TARI, L. W., e VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake systems. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 1, n. 1, p. 7-30, 2001.
- COLE, S. P., HARWOOD, J.; LEE, R.; SHE, R., e GUINEY, D. G. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n.10, p. 3124-3132, 2004.
- COOKSLEY, C., JENKS, P.J., GREEN, A., COCKAYNE, A., LOGAN, R.P., e HARDIE, K.R. *NapA* protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 461-469, 2003.

- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., e GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.
- DAVIES, D. G., PARSEK, M. R., PEARSON, J. P., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W., e GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295-298, 1998.
- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 114-122, 2003.
- DE ARAUJO, C., BALESTRINO, D., ROTH, L., CHARBONNEL, N., e FORESTIER, C. Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. **Res. Microbiol.**, v.161, n. 7, p. 595-603, 2010.
- DONLAN, R. M., e COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- ESCOLAR, L.; PÉREZ-MARTÍN, J., e LORENZO, V. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 20, p. 6223-6229, 1999.
- FERDELE, M. J., e BASSLER, B. L. Interspecies communication in bacteria. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 9, p. 1291-1299, 2002.
- FERGUSON, A.D., CHAKRABORTY, R., SMITH, B.S., ESSER, L., VAN DER HELM, D., e DEISENHOFER, J. Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. **Science**, v. 295, p. 1715-1719, 2002.
- FISCHBACH, M. A., LIN H., LIU D. R. e WALSH C. T. In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C glycosyltransferase. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v.102 p. 571-576, 2005.
- FISCHBACH, M. A., LIN, H., ZHOU, L., YU, Y., ABERGEL, R. J., LIU, D. R., RAYMOND, K. N., WANNER, B. L., FORTE, R. K., WALSH, C. T., ADEREM, A., e

- SMITH, K. D. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v.103, p.16502-16507, 2006.
- GABALLA, A., e HELMANN, J. D. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n.22, p. 5815-5821, 1998.
- GAO, H., ZHOU, D., LI, Y., GUO, Z., HAN, Y., SONG, Y., ZHAI, J., DU, Z., WANG, X., LU, J., e YANG, R. The iron-responsive Fur regulon in *Yersinia pestis*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 8, p. 3063-3075, 2008.
- GARCIA-HERRERO, A., PEACOCK, R. S., HOWARD, S. P., e VOGEL, H. J. The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins **Mol. Microbiol.**, v.66, n. 4, p. 872-889, 2007.
- GARÉNAUX, A., CAZA, M., e DOZOIS, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Vet. Microbiol.**, v. 153, p. 89-98, 2011.
- GOETZ, D. H., HOLMES, M. A., BORREGAARD, N., BLUHM, M. E., RAYMOND, K. N., e STRONG, R. K. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. **Mol. Cell.**, v.10, p.1033-1043, 2002.
- GUAM, L. L., ONUKI, H., e KAMINO, K. Bacterial growth stimulation with exogenous siderophores and synthetic *N*-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 7, p. 2797-2803, 2000.
- HALL H. K., e FOSTER J. W. The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. **J. Bacteriol.**, v.178, n. 19, p. 5683-5691, 1996.

- HAMMER, B. K. e BASSLER, L. B. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.**, v.50, n. 1, p 101-114, 2003.
- HAN, S. H. Review of hepatic abscess from *Klebsiella pneumoniae*. An association with diabetes mellitus and septic endophthalmitis. **West J. Med.**, v. 162, p. 220-224, 1995.
- HANCOCK, V., DAHL, M., e KLEMM, P. Abolition of biofilm formation in urinary tract *escherichia coli* and *klebsiella* isolates by metal interference through competition for fur. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 12, p. 3836-3841, 2010.
- HANTKE, K. Iron and metal regulation in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 172-177, 2001.
- HANTKE, K., NICHOLSON, G., RABSCH, W., e WINKELMANN, G. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p. 3677-3682, 2003.
- HIRSCH, E. B., e TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 1119-1125, 2010.
- HSIEH, P. F., LIN, T. L., LEE, C. Z., TSAI, S. F., e WANG, J. T. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. **J. Infect. Dis.**, v.197, p.1717-1727, 2008.
- JOHNSON A. W., OSINUSI, K., ADERELE, W. I., e ADEYEMI-DORO, F. A. Bacterial aetiology of acute lower respiratory infections in pre-school nigerian children and comparative predictive features of bacteraemic and non-bacteraemic illnesses. **J. Trop. Pediatr.**, v. 39, n. 2, p. 97-106, 1993.
- JONES, R. N. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. **Clin. Infect. Dis.**, v.51, p.81-87, 2010.

- KAMMLER, M., SCHON, C., e HANTKE, K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p.6212-6219, 1993.
- KAPLAN, J. B., JABBOURI, S., e SADOVSKAYA, I. Extracellular DNA dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. **Res. Microbiol.**, v. 162, n. 5, p. 525-541, 2011.
- KEYNAN, Y., e RUBINSTEIN, E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, n. 5, p. 385-389, 2007.
- KIM, I., STIEFEL, A., PLANTOR, S., ANGERER, A., e BRAUN, V. Transcription induction of the ferric citrate transport genes via the N-terminus of the FecA outer membrane protein, the Ton system and the electrochemical potential of the cytoplasmic membrane. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 333-344, 1997.
- KJELDSEN, L., JOHNSEN, A. H., SENGELOV, H., e BORREGAARD, N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 10425-10432, 1993.
- KOCZURA, R., e KAZNOWSKI, A. Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Microb. Pathog.**, v. 35, p. 197-202, 2003.
- LAI, Y. C., PENG, H. L., e CHANG, H. Y. Identification of genes induced in vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 7140-7145, 2001.
- LAU, Y. J., HU, B. S., WU, W. L., LIN, Y. H., CHANG, H. Y. e SHI, Z. Y. Identification of a major cluster of *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with liver abscess in Taiwan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 412-414, 2000.
- LAU, H. Y., CLEGG, S., e MOORE, T. A. Identification of *Klebsiella pneumoniae* genes uniquely expressed in a strain virulent using a murine model of bacterial pneumonia. **Microb. Pathog.**, v. 42, p. 148-155, 2007.

- LAVRRAR, J. L., CHRISTOFFERSEN, C. A., e MCINTOSH, M. A. Fur–DNA Interactions at the Bidirectional *fepDGC-entS* Promoter Region in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, v. 322, p. 983-995, 2002.
- LAWLOR, M. S., HSU, J., RICK, P. D., e MILLER, V. L. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. **Mol. Microbiol.**, v. 58, n. 4, p. 1054-1073, 2005.
- LAWLOR, M. S.; O'CONNOR, C., e MILLER, V. L. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 3, p. 1463-1472, 2007.
- LEVY, I., LEIBOVICI, L., DRUCKER, M., SAMRA, Z., KONISBERGER, H., e ASHKENAZI, S. A. Prospective study of Gram-negative bacteremia in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 15, n. 2, p. 117-122, 1996.
- LEWENZA, S., CONWAY, B., GREENBERG, E. P., e SOKOL, P. A. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 3, p. 748-756, 1999.
- LIN, C. T., WU, C. W., CHEN, Y. S., LAI, Y. C., CHI, C., LIN, J. C., CHEN, Y., e PENG, H. L., Fur regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Microbiology**, v. 157, p. 419-429, 2011.
- LITWIN, C. M., e CALDERMOOD, S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 137-149, 1993.
- LIVAK, K. J., e SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MA, L., KASERER, W., ANNAMALAI, R., SCOTT, D. C., JIN, B., e JIANG, X. Evidence of ball-and chain transport of ferric enterobactin through FepA. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 397-406, 2007.

- MAH, T. F., e O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.
- MCKENNEY, D., BROWN, K. E., e ALLISON, D. G. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 6989-6992, 1995.
- NELSON, A. L., BARASCH, J. M., BUNTE, R. M., e WEISER, J. N. Bacterial colonization of nasal mucosa induces expression of siderocalin, an ironsequestering component of innate immunity. **Cell. Microbiol.**, v. 7, p.1404-1417, 2005.
- O'TOOLE, G. A., e KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., e KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 49-79, 2000.
- PATRIQUIN, G. M., BANIN, E., GILMOUR, C., TUCHMAN, R., GREENBERG, E. P., e POOLE, K. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 2, p. 662-671, 2008.
- PATZER, S. I., e HANTKE, K. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n 32, p. 24321-24332, 2000.
- PESSOA-SILVA, C. L., RICHTMANN, R., CALIL, R., SANTOS, R. M., COSTA, M. L., FROTA, A. C., e WEY, S. B. Healthcare-associated infections among neonates in Brazil. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 25, n. 9, p. 772-777, 2004.

- PODSCHUN, R., e ULLMANN, U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- POHL, E., HALLER, J. C., MIJOVILOVICH, A., MEYER-KLAUCKE, W., GARMAN, E., e VASIL, M. L. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. **Mol. Microbiol.**, v. 47, n. 4, p.903-915, 2003.
- QUATRINI, R., LEFIMIL, C., HOLMES, D. S., e JEDLICKI, E. The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Microbiology**, v. 151, p. 2005-2015, 2005.
- QUATRINI, R., LEFIMIL, C., VELOSO, F. A., PEDROSO, I., HOLMES, D. S., e JEDLICKI, E. Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, n. 7, p. 2153-2166, 2007.
- ROSEN, D. A., PINKNER, J. S., JONES, J. M., WALKER, J. N., CLEGG, S., e HULTGREN, S. J. Utilization of an IBC pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of fimK on type 1 pilus expression. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3337-3345, 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F., e MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1-3, 1989.
- SCHALK, I. J., YUE, W. W., e BUCHANAN, S. K. Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. **Mol. Microbiol.**, v. 54, n.1, p. 14-22, 2004.
- SCHNEIDER, T. D. Information content of individual genetic sequences. **J. Theor. Biol.**, v. 189, p. 427-441, 1997.
- SCHUBERT, S., CUENCA, S., FISCHER, D., e HEESEMANN, J. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures and

- urine samples: prevalence and functional expression. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1268-1271, 2000.
- SHEA, C. M., e MCINTOSH, M. A. Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 1415-1428, 1991.
- SINGH, P. K. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. **Biometals**, v. 17, n. 3, p. 267-270, 2004.
- SINGH, R., RAY, P., DAS, A., e SHARMA, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, n. 9, p. 1955-1958, 2010.
- SMITH, D. L., HARRIS, A. D., JOHNSON, J. A., SILBERGELD, E. K., e MORRIS, J. G. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 9, p. 6434-6439, 2002.
- STINTZI, A., EVANS, K., MEYER, J.-M., e POOLE, K. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: *lasR/lasI* mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 166, n. 2, p. 341-345, 1998.
- STOJILJKOVIC, I., BAUMLER; A. J., e HANTKE, K. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. **J. Mol. Biol.**, v. 236, n. 2, p. 531-545, 1994.
- STRUVE, C., FORESTIER, C., e KROGFELT, K. A. Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 167-176, 2003.
- SUNTHARALINGAM, P., e CVITKOVITCH, D. G. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. **Trends Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 3-6, 2005.

- TORRES, A. G., REDFORD, P., WELCH, R. A., e PAYNE, S. M. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6179-6185, 2001.
- TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., STOJILJKOVIC, J., e HEFFRON, F. Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 16, p. 4628-4637, 1995.
- WANDERSMAN, C., e DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 58, p. 611-647, 2004
- WHITE-ZIEGLER, C. A., MALHOWSKI, A. J., e YOUNG, S. Human body temperature (37°C) increases the expression of iron, carbohydrate, and amino acid utilization genes in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 15, p. 5429-5440, 2007.
- WILLIAMS, P., e TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 1, p. 196-204, 1990.
- WILLIAMS, P. H., RABSCH, W., METHNER, U., VOIGT, W., TSCHÄPE, H., e REISSBRODT, R. Catecholate receptor proteins in *Salmonella enterica*: role in virulence and implications for vaccine development. **Vaccine**, v. 24, p. 3840-3844, 2006.
- WOODMANSEE, A. N., e IMLAY, J. A. Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 34055-34066, 2002.
- WOOLDRIDGE, K. G., e WILLIAMS, P. H. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 325-348, 1993.
- YANG, Y. S., SIU, L. K., YEH, K. M., FUNG, C. P., HUANG, S. J., HUNG, H. C., LIN, J. C. & CHANG, F. Y. Recurrent *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: clinical and microbiological characteristics. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 3336-3339, 2009.