
ANÁLISES *IN SILICO* NA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS CONTRA A RESISTÊNCIA BACTERIANA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM.
IN SILICO ANALYSIS IN THE IDENTIFICATION OF TARGETS AGAINST BACTERIAL RESISTANCE OF SALMONELLA TYPHIMURIUM.

GIANINI, Samara Ketlin.¹; SILVA, Kauany Rodrigues Chalegre¹; CURCELLI, Felipe²; CREMONESI, Aline Sampaio²

¹Graduando do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco; ²Professor do Curso Medicina Veterinária – Universidade São Francisco
samaragianini01@gmail.com

RESUMO. A bactéria *Salmonella* Typhimurium é o sorovar não tifóide mais identificado na clínica, contendo ampla resistência aos antimicrobianos encontrados na indústria. Mecanismos de resistência e virulência desta bactéria estão associados a captação de poliaminas a partir de transportadores ABC - uma superfamília de proteínas integrais responsáveis pela captação e transporte de nutrientes. A identificação e caracterização de transportadores ABC de poliaminas e vitamina B₁₂ da bactéria *Salmonella* Typhimurium contribui para o desenvolvimento de novos fármacos destinados ao controle do crescimento bacteriano. A partir de análises *in silico*, as proteínas constituintes de transportadores ABC foram identificadas e caracterizadas e iniciou-se a caracterização de 3 transportadores ABC tipo importadores. Foram identificados a localização das proteínas dos transportadores ABC de poliaminas e vitamina B₁₂, como também a caracterização de cada proteína. Foram construídos modelos por homologia para PotD, PotF e BtuF com as proteínas moldes depositadas no PDB: 1POT (PotD de *E. coli*); 1A99 (PotF de *E. coli* K-12) e 1N4A (BtuF de *E. coli*), com identidade de 93,83%, 94,19%, e 81,20%, respectivamente. Através dos modelos pode-se identificar regiões de hélice-alfa, fita-beta e *coil* nas SBPs. Identificou-se também os aminoácidos dos bolsões de ligação dessas SBPs. Neste trabalho pode-se verificar e caracterizar dois transportadores de poliaminas e um de vitamina B₁₂ como também seus possíveis substratos, o transportador PotABCD como um provável transportador de espermidina, PotFGHI como de putrescina e ButCDF de vitamina B₁₂.

Palavras-chave: Transportador ABC. PotD. PotF. BtuF.

ABSTRACT. The bacterium *Salmonella* Typhimurium is the most identified non-typhoid serovar in the clinic, containing broad resistance to antimicrobials found in the industry. Resistance and virulence mechanisms of this bacterium are associated with the uptake of polyamines from ABC transporters - a superfamily of integral proteins responsible for the uptake and transport of nutrients. The identification and characterization of ABC transporters of polyamines and vitamin B₁₂ from the bacterium *Salmonella* Typhimurium contributes to the development of new drugs to control bacterial growth. From *in silico* analyses, the constituent proteins of ABC transporters were identified and characterized and the characterization of 3 importing type ABC transporters began. The location of the ABC polyamine and vitamin B₁₂ transporters proteins were identified, as well as the characterization of each protein. Models were constructed by homology for PotD, PotF and BtuF with the template proteins deposited in the PDB: 1POT (PotD from *E. coli*); 1A99 (PotF from *E. coli* K-12) and 1N4A (BtuF from *E. coli*), with identity of 93.83%, 94.19%, and

81.20%, respectively. Through the models it is possible to identify regions of alpha helix, beta strand and coil in SBPs. The amino acids of the binding pockets of these SBPs were also identified. In this work we can identify and characterize two polyamine transporters and one of vitamin B₁₂ as well as their possible substrates, the PotABCD transporter as a possible spermidine transporter, PotFGHI as a putrescine transporter and ButCDF for vitamin B₁₂.

Keywords: ABC Transporter. PotD. PotF. BtuF.

INTRODUÇÃO

Transportadores ABC são importantes para sobrevivência de bactérias resistentes como Salmonella enterica sorovar Typhimurium

A *Salmonella enterica* é uma bactéria gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, de respiração anaeróbica facultativa. Entre os principais sorovares não tifóides isolados dessa bactéria está o sorovar Typhimurium, que é comumente encontrado em isolados de alimentos vegetais e animais de consumo humano, sendo o patógeno que mais causa doença por alimentos contaminados (JAJERE, 2019; DOS SANTOS, et al., 2019; GALÁN, 2021). A infecção pela *Salmonella* Typhimurium acarreta em gastroenterites autolimitantes e até septicemia, em casos mais graves, ocasionando em mortes (ANDERSON; KENDALL, 2017; JAJERE, 2019). Nestes casos, a doença pode estar relacionada a isolados bacterianos do patógeno com resistência antimicrobiana, sendo comum o sorovar Typhimurium ser um sorovar multirresistente (ANDINO; HANNING, 2015; NIRANJAN, BHASKAR, 2017).

As bactérias, como *Salmonella* Typhimurium, contém vários mecanismos de patogenicidades, que aumentam sua sobrevivência e sua virulência, os transportadores de cassete de ligação ao ATP (ABC - *ATP-binding cassette*) são exemplos disso, estes tipos de transportadores que são encontrados em organismos procariontes e eucariontes, em bactérias estão relacionados com a resistência a antimicrobianos e a diferentes fatores de virulência (COSTA, et al., 2015; HOLLENSTEIN; DAWSON; LOCHER, 2007; BOGOMOLNAYA, et al., 2013). Os transportadores ABCs são pertencentes de uma superfamília de proteínas integrais de membrana responsáveis por transportar vários tipos de moléculas para dentro e fora da célula, tais transportadores são encontrados desde organismos procariontes até os eucariontes. Nas bactérias, por exemplo, os transportadores ABC estão relacionados com a resistência a antimicrobianos e a diferentes fatores de virulência (HOLLENSTEIN; DAWSON; LOCHER, 2007; BOGOMOLNAYA, et al., 2013).

Os transportadores ABCs são constituídos de dois domínios de ligação a nucleotídeos citoplasmáticos (NBDs - *Nucleotide-Binding Domain*), denominados de ATPases, que são responsáveis por hidrolisar o ATP (adenosina trifosfato) para a reação, e dois domínios transmembranares (TMDs - *Transmembrane Domains*), conhecidos como permeases, que servem de canal através da membrana para o substrato (HOLLENSTEIN; DAWSON; LOCHER, 2007; DAVIDSON e CHEN, 2004). Os transportadores importadores tipos I e II ainda possuem uma outra proteína responsável por ligar o substrato ao canal, denominada de proteína de ligação ao substrato (SBP - *substrate binding protein*) (LOCHER, 2009; LOCHER, 2016).

As SBPs são responsáveis por se ligar e capturar várias moléculas essenciais para a célula e seus mecanismos de virulência e sobrevivência de certos patógenos, desta forma elas são

um ótimo alvo para estudos e criação de novos transportes de antimicrobianos (LEWIS; WEEN; MCDEVITT, 2012; CLARKE et al., 2002).

Os transportadores ABC estão envolvidos na captação de diversos nutrientes essenciais para as bactérias, como íons de ferro e metal, aminoácidos, carboidratos e poliaminas (BERNTSSON et al., 2010). As poliaminas mais encontradas em bactérias são as espermidina e putrescina e sua obtenção ocorre através de transportadores específicos ou de biossíntese (ESPINEL; GUERRA; JELSBK, 2016; GUERRA et al., 2020). Estudos relatam a importância das poliaminas para a virulência e sobrevivência bacteriana da *Salmonella* Typhimurium, enquanto a vitamina B₁₂ é um importante cofator enzimático para processos metabólicos em bactérias, que pode ser absorvida do ambiente através de transportadores específicos (ESPINEL; GUERRA; JELSBK, 2016; PIENKO; TRYLSKA, 2020; RÓWNICKI, et al., 2017).

METODOLOGIA

As proteínas transportadoras de poliaminas e vitamina B₁₂ de *Salmonella* Typhimurium foram identificadas a partir de busca no banco de dados Kegg (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <https://www.genome.jp/kegg/>). As sequências de nucleotídeos e aminoácidos de cada proteína foram analisadas por alinhamento de sequências do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - ALTSCHUL et al., 1997) e Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> - LARKIN et al., 2007) a fim de comparação dos aminoácidos envolvidos na ligação das poliaminas e vitamina B₁₂ e construção da árvore filogenética de ambas. As sequências das proteínas usadas para alinhamento foram obtidas pelo Kegg ou pelo banco PDB (*Protein Data Bank* - <https://www.rcsb.org/>) para aquelas proteínas que possuem estrutura resolvida. A estrutura e localização das proteínas constituintes dos transportadores foram analisadas a partir do mapa genômico de *Salmonella* Typhimurium disponível no Kegg.

Proteínas de membranas e proteínas secretadas pelas células necessitam de uma região que sinaliza seu direcionamento até o local de atuação, esta região é o peptídeo sinal e, geralmente se encontra na região N-terminal das proteínas, sendo clivado quando a proteína chega ao seu destino (VON HEIJNE, 1990). As análises de bioinformáticas são mais eficientes quando utilizada a sequência de aminoácidos da proteína funcional, logo, é necessário identificar o peptídeo sinal nas proteínas para realizar as análises sem essa região da sequência. Para isso, as sequências de aminoácidos das proteínas obtidas no banco de dados Kegg foram analisadas pelo programa SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> - ARMENTEROS et al., 2019) a fim de identificar as regiões de peptídeo sinal a serem removidas.

As proteínas permeases do transportador ABC de poliaminas e vitamina B₁₂ foram identificadas a partir do programa *online* TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> - KROGH et al., 2001) para avaliar as características dos aminoácidos presentes na sequência FASTA das proteínas, buscando por regiões hidrofóbicas, características de regiões transmembranas (KROGH et al., 2001).

Para gerar os modelos tridimensionais das proteínas do transportador ABC foi utilizado o método de modelagem por homologia por meio do programa Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org> - WATERHOUSE et al., 2018). As sequências de aminoácidos das proteínas foram utilizadas para buscar no Banco de Dados de Proteínas (PDB - *Protein data bank*), proteínas com estrutura resolvida e com maior cobertura de sequência e

identidade com as proteínas de interesse para servir de molde para a modelagem da estrutura terciária. Os modelos gerados foram validados pelo diagrama de Ramachandran e visualizados e comparados no programa PyMol (<https://pymol.org/2/> - DeLANO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do banco de dados Kegg foram encontradas onze proteínas constituintes de transportadores ABC de poliaminas e vitamina B₁₂ de *Salmonella* Typhimurium (Tabela 1). Com essa análise foi possível identificar três transportadores, o transportador PotABCD, o transportador PotFGHI e o transportador BtuCDF, como a décima primeira proteína, ABC transporter, se encontra sozinha foi dada prioridade para esses três transportadores identificados nesta pesquisa.

Tabela 1 – Dados de proteínas encontradas no banco de dados Kegg.

Nome da Proteína	Código no Kegg	Número de Nucleotídeos	Número de Aminoácidos	Localização no Mapa Genômico
PotA	STM1226	1137	378	1.312.020 a 1.313.156
PotB	STM1225	864	287	1.311.173 a 1.312.036
PotC	STM1223	780	259	1.308.739 a 1.309.518
PotD	STM1222	1047	348	1.307.668 a 1.308.714
PotF	STM0877	1113	370	948.388 a 949.500
PotG	STM0878	1134	377	949.588 a 950.721
PotH	STM0879	954	317	950.731 a 951.684
PotI	STM0880	846	281	951.681 a 952.526
BtuC	STM1340	981	326	1.419.562 a 1.420.542
BtuD	STM1342	750	249	1.421.185 a 1.421.934
BtuF	STM0206	801	266	241.270 a 242.070
ABC transporter	STM4494	1092	363	4.742.189 a 4.743.280

● Proteínas do transportador PotABCD de espermidina; ● Proteínas do transportador PotFGHI de putrescina; ● Proteínas do transportador BtuCDF de vitamina B₁₂. Fonte: Kegg.

Transportadores PotABCD e PotFGHI conservam os aminoácidos do bolsão e provavelmente são captadores de poliaminas.

Através do Kegg pode-se analisar o mapa genômico do transportador PotABCD. Desta forma, foram identificadas as proteínas PotA, PotB, PotC e PotD que se encontram em sequência no genoma e a proteína SifA que se encontra no meio da sequência das proteínas do transportador (Figura 1A). As proteínas do transportador PotFGHI também se encontram próximas (Figura 2A).

Para identificar as permease que estão no transportador PotABCD e no transportador PotFGHI utilizou-se as sequências de aminoácidos no programa on-line TMHMM, que identificou 6 regiões hidrofóbicas e transmembranas das proteínas PotB, PotC (Figura 1B e Figura 2C, respectivamente); e PotH e PotI (Figura 2B e Figura 2C, respectivamente), o que, de acordo com Igarashi e Kashiwagi (1999), caracterizam as proteínas que constituem o canal do transportador tipo ABC.

A identificação das ATPases foi realizada através do programa SMART, que analisa a sequência de aminoácidos e identifica as regiões que mais se repetem na sequência. Foram identificados os domínios AAA na sequência de PotA e PotG, sugerindo que ambas sejam proteínas ATPases uma vez que, de acordo com Ogura e Wilkinson (2001), o domínio AAA é característico de proteínas capazes de hidrolizar ATP.

O programa SignalP 5.0 foi utilizado para encontrar os peptídeos sinais das proteínas dos transportadores PotABCD e PotFGHI, na qual foi identificado o peptídeo sinal apenas nas proteínas PotD e PotF. O SignalP5.0 mostrou que a PotD tem peptídeo sinal entre os aminoácidos de número 1 ao 23 da sequência, enquanto PotF apresenta peptídeo sinal entre os aminoácidos de número 1 e 26. A remoção da região de peptídeo sinal das proteínas, mantém a sequência funcional de PotD e PotF que passam a ter 325 e 344 aminoácidos, respectivamente.

Após obter a sequência funcional da PotD e PotF utilizou-se o programa PSIPRED e FoldIndex para prever sua estrutura secundária e comparar com os resultados entre estes dois programas. O programa FoldIndex identificou 6 regiões desordenadas na PotD (Figura 2D) e uma na PotF (Figura 1D). O PSIPRED sugere que ambas as proteínas apresentam regiões com hélice-alfa, folha-beta e regiões em *coil* em sua estrutura (Figura 1E e 2E, respectivamente).

O alinhamento múltiplo de sequências (Figura 3) de SBP captadoras de poliaminas de bactérias resistentes, revelou regiões de conservação na sequência de aminoácidos dentre as proteínas. As regiões de conservação do bolsão foram analisadas a partir da modelagem por homologia adiante.

Modelos tridimensionais a partir da modelagem por homologia das SBPs foram gerados, utilizando a proteína SBP de espermidina/putrescina da *E. coli* (1POT - código PDB) como molde para a proteína PotD (Figura 4A), com 93% de identidade e 93,8% de cobertura de sequência. Para a PotF (Figura 4C) foi utilizada a SBP de putrescina também de *E. coli* (6YE0 - código PDB), a qual apresenta identidade de 94,19% e cobertura de sequência de 92%. Ambos os modelos gerados indicaram proteínas globulares formadas por dois domínios unidos por duas fitas betas, corroborando com as análises do PSIPRED. Esta arquitetura das proteínas periplasmáticas foi observada por Quiocho e Ledvina (1996) em proteínas SBP do tipo II.

Os aminoácidos conservados em PotD são Trp³⁴, Thr³⁵, Glu³⁶, Tyr³⁷, Ser⁸³, Tyr⁸⁵, Asp¹⁶⁸, Glu¹⁷¹, Ser²¹¹, Trp²²⁹, Trp²⁵⁵, Asp²⁵⁷, Tyr²⁹³, Gln³²⁷ (Figura 4B). Esses mesmos aminoácidos também são encontrados no bolsão de ligação da 1POT de *E. coli* na pesquisa de Sugiyama e colaboradores (1996), de forma que pode-se sugerir, diante destes dados, que a PotD de *Salmonella Typhimurium* é uma proteína ligadora de espermidina. Outras pesquisas demonstram a relação do aminoácido Trp para ligação da espermidina com o bolsão de ligação da SBP (WU et al., 2012), que em PotD o Trp é identificado 3 vezes no bolsão de ligação. Para a proteína PotF foram identificados no bolsão os seguintes aminoácidos: Trp³⁷, Ser³⁸, Asp³⁹, Tyr⁴⁰, Ser⁸⁵, Glu¹⁸⁵, Trp²⁴⁴, Asp²⁴⁷, Phe²⁷⁶, Asp²⁷⁸, Tyr³¹⁴ (Figura 3D). Nos estudos de Vassilyev e colaboradores (1998) foram identificados na SBP de putrescina de *E. coli*, código 1A99, os mesmos aminoácidos conservados, de forma que pode-se sugerir que a PotF é uma proteína ligadora de putrescina.

Os aminoácidos que são substituídos entre PotD e PotF, (Thr³⁵, Glu³⁶ e Trp²⁵⁵ por Ser³⁸, Asp³⁹ e Phe²⁷⁶), que podem ser observados no alinhamento, de acordo com Vassilyev e colaboradores (1998), é o que diferencia a ligação de espermidina em PotD para putrescina em PotF. A árvore filogenética das PotF demonstra que ambas têm similaridade, entretanto as

PotF de *Salmonella* Typhimurium e *Klebsiella pneumoniae* contêm maior similaridade entre suas sequências que a proteína ydcS de *Klebsiella pneumoniae*. Na Figura 5 pode-se analisar que as proteínas PotD de *Klebsiella pneumoniae* e PotD de *Salmonella* Typhimurium têm o mesmo ancestral, apresentando maior similaridade em sua sequência do que a proteína PotD de *Streptococcus pyogenes*. Segundo Berntsson e colaboradores (2010), de acordo com a topologia, similaridade de sequência e a árvore filogenética, pode-se classificar a PotD e PotF como pertencente ao cluster D-II, que engloba proteínas ligadoras de poliaminas.

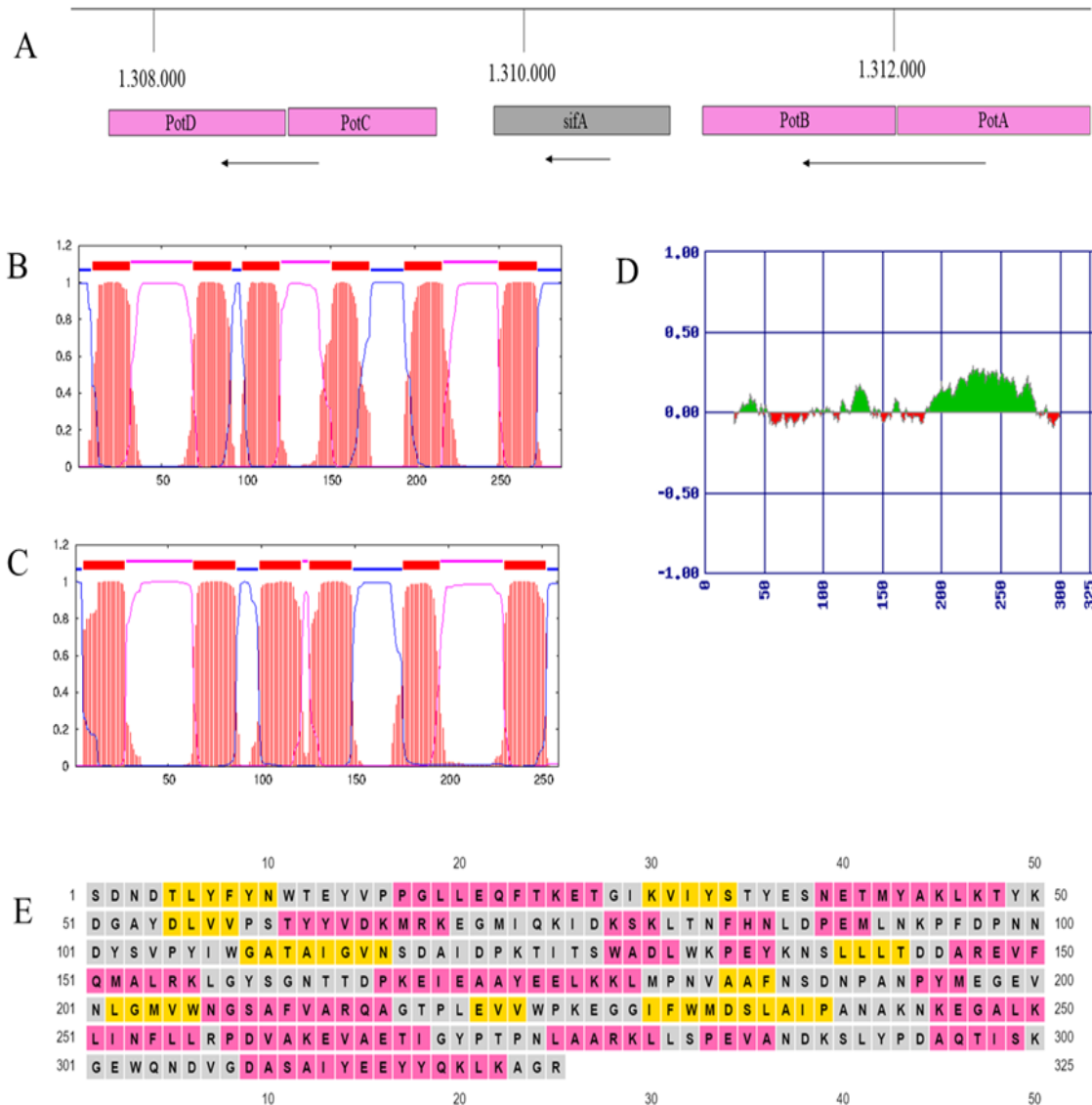


Figura 1 - A: Representação parcial do Mapa Genômico do Transportador PotABCD, contendo as proteínas PotA, PotB, SifA, PotC e PotD; Fonte: Kegg. **B e C:** Predição de regiões transmembranas de PotB e PotC, respectivamente. Em vermelho estão as regiões transmembrana das proteínas, azul são regiões citoplasmáticas e em rosa regiões extracelulares de ambas as proteínas. **D:** Análise do FoldIndex. Regiões ordenadas em verde e 6 regiões desordenadas representadas em vermelho da sequência de aminoácidos da SBP PotD. **E:** Análise do PsiPred de PotD. Cinza representa as regiões em *coil*, em amarelo as regiões de fita-beta e hélice-alfa representadas em rosa. Fonte: Próprio Autor.

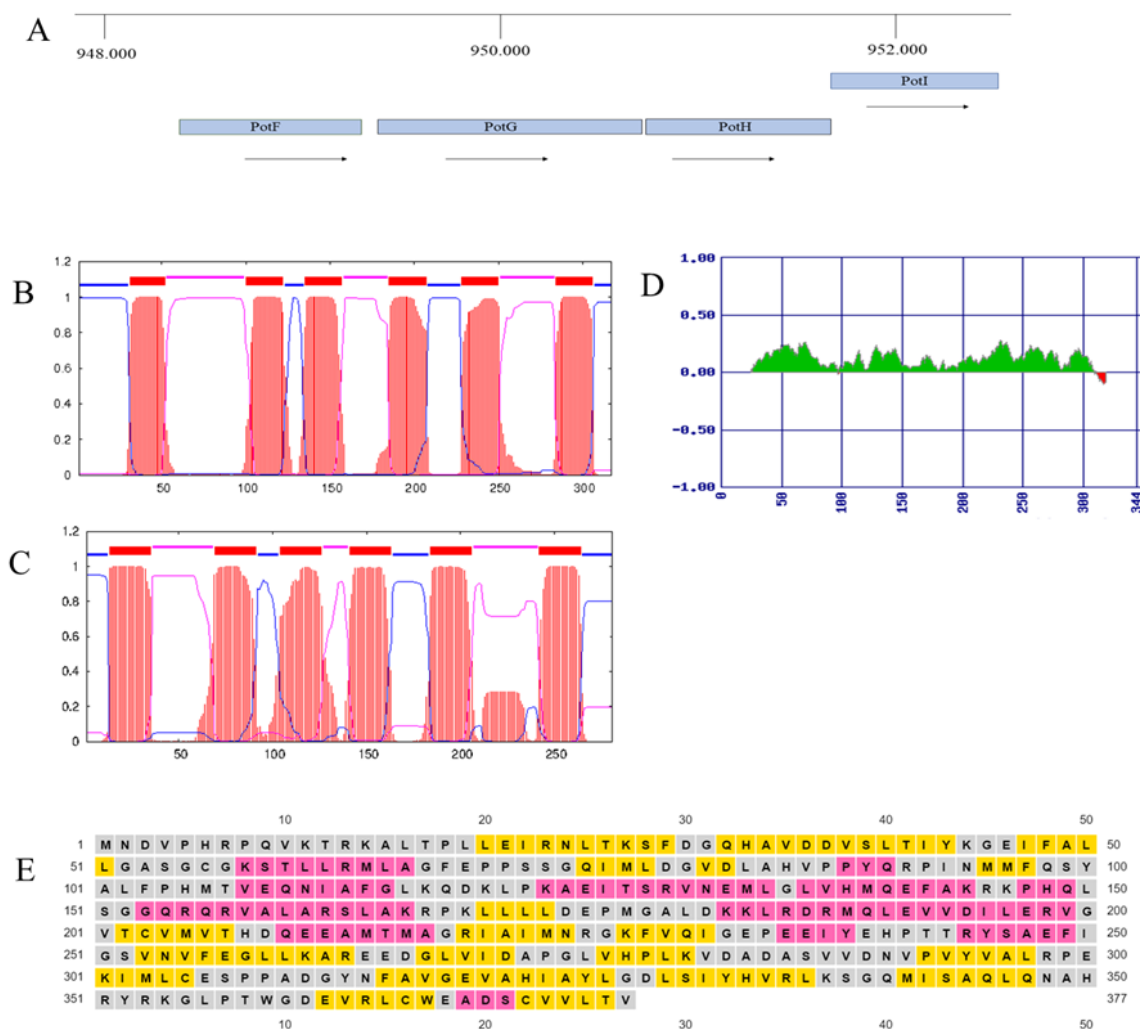


Figura 2 - A: Representação parcial do Mapa Genômico do Transportador PotFGHI, contendo as proteínas PotF, PotG, PotH e PotI; Fonte: Kegg. **B e C:** Predição de regiões transmembranas de PotH e PotI, respectivamente. Em vermelho estão as regiões transmembranas das proteínas, azul são regiões citoplasmáticas e em rosa regiões extracelulares de ambas as proteínas; **D:** Análise do FoldIndex. Regiões ordenadas em verde e uma região desordenada representada em vermelho da sequência de aminoácidos da SBP PotF; **E:** Análise do PsiPred. Cinza representa as regiões em *coil* da sequência da SBP PotD, em amarelo as regiões de fita-beta e hélice-alfa representadas em rosa. Fonte: Próprio Autor.

Transportador BtuCDF apresenta exceções na tridimensional para o transporte de Vitamina B₁₂.

Através do Kegg pode-se analisar o mapa genômico do transportador BtuCDF. Desta forma, foi identificado que as proteínas do transportador estão localizadas em regiões genômicas diferentes (Figura 6A e B).

A proteína permease analisada pelo programa *on-line* TMHMM apresentou 9 regiões, na qual uma delas apresenta um pico mais largo, podendo condizer com 10 hélices (Figura 6C), na pesquisa de Davidson (2002), também foram observados 10 hélices no transportador

de vitamina B12 em *E. coli*, essa maior quantidade de hélices, 10 ao invés de 6 hélices, é utilizada para acoplar melhor a molécula de vitamina B12 e para estabilizar um canal maior. De acordo com esses dados pode-se sugerir que a BtuC é a permease do transportador, pois ainda de acordo com Igarashi e Kashiwagi (1999), regiões transmembranas e hidrofóbicas caracterizam as proteínas que constituem o canal do transportador tipo ABC.

kpn_ydcS	AEPLTSLDKPEGRDLIIANPGYIERGQTDKQYDWVSQFEKDTGCQVNVKTAATSDEMVS	60
stm_PotF	-----AEQKTLHIYNWSDYIAPD-----TVANFEKETGINVIYDVDFSNEVLE	45
kpn_PotF	-----AEQKTLHVYNWSDYIAPD-----TVANFEKETGIKVVDVDFSNEVLE	45
stm_PotD	-----SDNDTLFYFNWTEYVPPG-----LLEQFTKETGIKVIYSTYESNETMYAK	45
knp_PotD	-----DDSKTLYFYFNWTEYVPPG-----LLEQFTKETGIKVIYSTYESNETMYAK	45
spy_PotD	-----SDKLVIYNWGDYDPA-----LLKKFTKETGIEVQYETFDSEAMYTK	43
	. * . * * :	: : * * : * : . . : : :
kpn_ydcS	M---AKGGYDLVTASGDASLRLIMGKRVQPINTAL IAGWGS LDPRIAKGAWFNVGKQVYG	117
stm_PotF	LMA-GSTGFDLVVFSASF LERQL TAGVFQPLDKSKLPGWKNLDPELLKLVAKHDPDNKYA	104
kpn_PotF	LMA-GSTGFDLVVFSASF LERQL AAGVFQPLDKSKLPWKNLDPEVLKLVAKHDPENKYA	104
stm_PotD	LKTYKDGAYDLVVFSTIYVDKMRKEGMIQKIDKSKLTNHNLDPEMLN--KPFDPNDYS	103
knp_PotD	LKTYKDGAYDLVVFSTIYVDKMRKEGMLQKIDKSKLTNFSNLDPQMLN--KPFDPNDYS	103
spy_PotD	IKQ-GGTTYDIAVFSYITIDKMIKENLLNKLDKSKLVGMDNIGKEFLG--KSFPQNDYS	100
	: : * : . . * :	: : : : : . . : : : *
kpn_ydcS	TPYQWGNP LLMYNTRVF-----PTPPDSWRVVFVKQDLPDGKTNQGRVQAYDGP IYIAD	171
stm_PotF	MPYMWATTGIGYNVDKVKAVLGDDAPVNSWDLVLPENLEKLKS--CGVSFLDAPEEIFA	162
kpn_PotF	MPYLWATTGIGYNVDKVKAVLGDDAPVDSWDLVLPENLEKLKS--CGVSFLDAPEEIFA	162
stm_PotD	VPYIWGATAIGVNSDAI-----DPKTITSWADLWKPEYKNS-----LLLTDDAREVFQ	151
knp_PotD	IPYIWGATAIGVNSEAI-----DPKTITSWADLWKPEYKSS-----LLLTDDAREVFQ	151
spy_PotD	LPYFWGTGVIVYNDQLV-----DKAPMHWEDLWRPEYKNS-----IMLIDGAREMLG	147
	** * . : * . :	* : : . : * :
kpn_ydcS	AALFVKATQPQLGIEDPYQLTETQYNAVLKVLRDQQLIHRVWHDATVQMNDFKNEGVA	231
stm_PotF	TVLNYLQGD--PNSSKADDTGTPATD LLLK----LRPNIRYFHS--SQYINDLANGDTCV	214
kpn_PotF	TVLNYLQGD--PNSSKADDTGTPATD LLLK----LRPNIRYFHS--SQYINDLANGDICV	214
stm_PotD	MALRKLKGY--GNTTDPKEI--EAAYEELKK----LMPNVAAFNS--DNPANPYMEGEVNL	202
knp_PotD	MALRKLKGY--GNTTDPKEI--EAAYNELKK----LMPNVAAFNS--DNPANPYMEGEVNL	202
spy_PotD	VGLTTFGYS--VNSKNLEQL-QAAERKLQ--LTPNVKAIVA--DEMKGYMIQGDAAI	198
	* :	: : : * : * : * : * :
kpn_ydcS	SSSWPYQANGLK-----AEGQP VATVFPKEGVTGWD TMLHSEAKHPVCAYKWMNWSL	285
stm_PotF	AIGWAGD VWQAANRAKEAKGNVNISFSIPKEGAMAF FDFVAMPADAKNKDEAYQFLNYLL	274
kpn_PotF	AIGWAGD VWQAANRAKEAKGNVNSYFIPKEGALAF FDFVAMPADAKNKDEAYQFLNYLM	274
stm_PotD	GMVWNGSAFVAR-----QAGTPLEVWVWKEGGIFW DLSLAIPANAKNKEGALKLINFL	256
knp_PotD	GMVWNGSAFVAR-----QAGTPLEVIWVWKEGGIFW DLSLAIPANAKNVDGALKLINFL	256
spy_PotD	GITFSGEASEML-----DSNEHLHYIVPSEGSNLWFDNLVLPKTMKEKEAYAFLNFIN	252
	. : . . . :	* : * : * : * : * :
kpn_ydcS	TPKVQGDVAAWFGS PVVPEGCKASALLGDKGCETNGYEQ---FNRIHFWKTPVAEGGKY	342
stm_PotF	RPDVIAHISDHVFYANA---NKEATALVSQQVRDNP GIYPPADVRAKLFTLKVQEP--KI	329
kpn_PotF	RPDVIAKISDQVFYANG---NKA STPLVSETIRNPAIYPPADVF AKLFTLKVQDP--KI	329
stm_PotD	RPDVAKVAETIGYPTP---NLAARKLLSPEVANDKSLYPDAQTISKGEWQNDVGD--A	310
knp_PotD	RPDVAKQVAETIGYPTP---NLAARKMLSPAVANDKSLYPDAATIEKGEWQNDVGS--A	310
spy_PotD	RPENAAQNAAYIGYATP---NKKAKALLPDEIKNDPAFYPTDDI IKKLEVYNDLGS--RW	307
	* . . : . :	: : : : :
kpn_ydcS	VPYSRWTQDYIAIMGGR-	359
stm_PotF	--DRVRTRAWTKVKSGK-	344
kpn_PotF	--DRVRTRAWTKVKSGK-	344
stm_PotD	--SAIYEEYYQKLKAGR-	325
knp_PotD	--SAIYEEYYQKLKAGR-	325
spy_PotD	--LGIYNDLYLQFKMYRK	323

Figura 3: Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos das SBPs de poliaminas, contendo PotD e PotF da bactéria *Klebsiella pneumoniae* (kpn); PotD de *Streptococcus pyogenes* (spy); PotD e PotF de *Salmonella Typhimurium* (stm); circulado em vermelho estão os aminoácidos do bolsão de ligação.

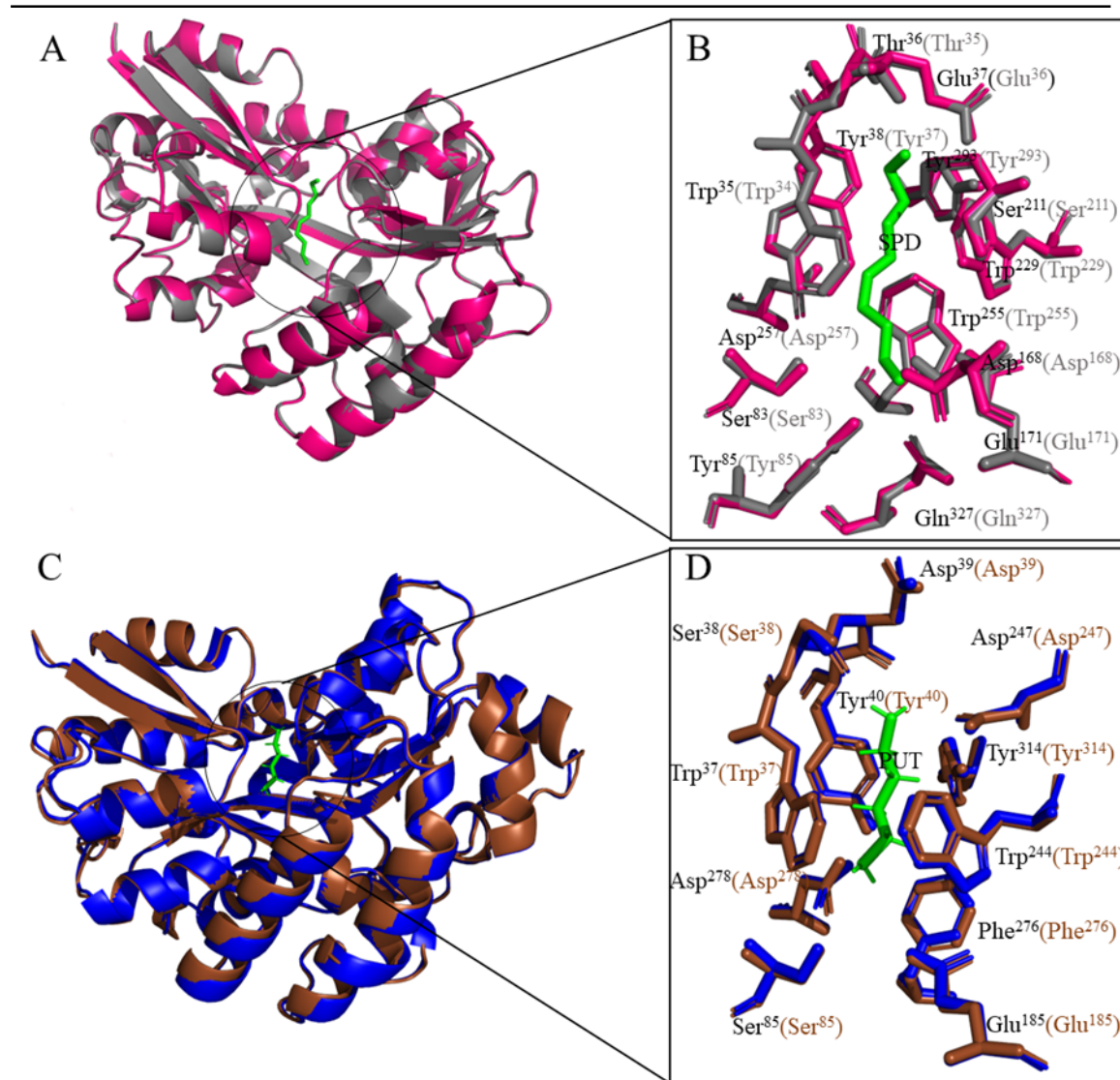


Figura 4 - A: Modelo tridimensional da SBP de espermidina/ putrescina de *E.coli*, código PDB: 1POT em cinza, alinhado com o modelo criado por homologia da SBP PotD de *Salmonella Typhimurium* em rosa forte, molécula de espermidina em verde localizada na região do bolsão de ligação das SBPs. **B:** Representação dos aminoácidos do bolsão de ligação da PotD de *Salmonella Typhimurium* alinhados com os aminoácidos do bolsão de ligação da SBP 1POT, os aminoácidos conservados em ambos os bolsões são: Trp³⁵(Trp³⁴), Thr³⁶(Thr³⁵), Glu³⁷(Glu³⁶), Tyr³⁸(Tyr³⁷), Ser⁸³(Ser⁸³), Tyr⁸⁵(Tyr⁸⁵), Glu¹⁷¹(Glu¹⁷¹), Ser²¹¹(Ser²¹¹), Asp¹⁶⁸(Asp¹⁶⁸), Trp²²⁹(Trp²²⁹), Trp²⁵⁵(Trp²⁵⁵), Asp²⁵⁷(Asp²⁵⁷), Tyr²⁹³(Tyr²⁹³), Gln³²⁷(Gln³²⁷). **C:** Modelo tridimensional da SBP de putrescina de *E. coli*, código PDB: 1A99 em marrom, alinhado com o modelo criado por homologia da SBP PotF de *Salmonella Typhimurium* em azul, molécula de putrescina em verde localizada na região do bolsão de ligação das SBPs. **D:** Representação dos aminoácidos do bolsão de ligação da PotF de *Salmonella Typhimurium* alinhados com os aminoácidos do bolsão de ligação da SBP 1A99, os aminoácidos conservados em ambos os bolsões são: Trp³⁷(Trp³⁷), Ser³⁸(Ser³⁸), Asp³⁹(Asp³⁹), Tyr⁴⁰(Tyr⁴⁰), Glu¹⁸⁵(Glu¹⁸⁵), Trp²⁴⁴(Trp²⁴⁴), Asp²⁴⁷(Asp²⁴⁷), Phe²⁷⁶(Phe²⁷⁶), Asp²⁷⁸(Asp²⁷⁸), Tyr³⁴⁰(Tyr³⁴⁰). Fonte: Próprio Autor

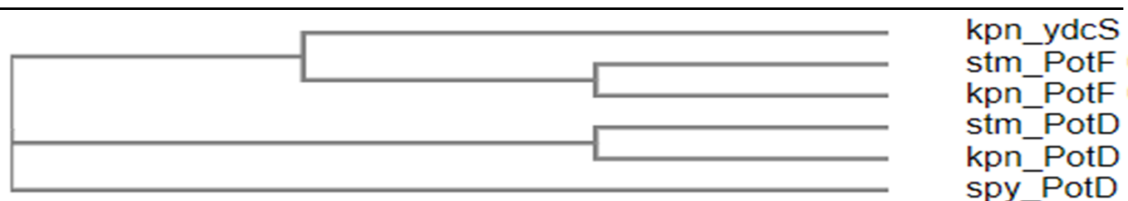


Figura 5: Árvore filogenética das SBPs de poliaminas de *Klebsiella pneumoniae* (kpn); PotD de *Streptococcus pyogenes* (spy); PotD e PotF de *Salmonella Typhimurium* (stm), na qual pode identificar que as SBPs de kpn e stm originam do mesmo ancestral e mantém uma maior similaridade em suas sequências em comparação com spy. Fonte: Próprio Autor.

Para identificar a ATPase foi realizado uma análise pelo programa SMART, onde foi identificado o domínio AAA na sequência da proteína BtuD, essa região é responsável pela ligação do ATP e também pela sua hidrólise, que de acordo com Ogura e Wilkinson (2001), caracteriza as ATPases.

Para identificar o peptídeo sinal das proteínas do transportador BtuCDF foi utilizado o programa SignalP 5.0, no qual somente identificou peptídeo sinal na proteína BtuF. O programa apresentou que o corte para remoção do peptídeo sinal deve ser feito entre os aminoácidos das posições 1 a 23 da sequência. A remoção do peptídeo sinal, de BtuF gera uma proteína funcional com 326 aminoácidos

A sequência funcional da BtuF foi analisada pelos programas PSIPRED e FoldIndex para prever suas estruturas secundárias. O programa FoldIndex não identificou região desordenada na proteína BtuF (Figura 6D) e o programa PSIPRED identificou que a BtuF tem regiões hélice-alfa, fitas betas e coil (Figura 6E).

Para a modelagem molecular por homologia foi utilizada a SBP de vitamina B₁₂ de *E.coli* (1N4A - código PDB) como molde para a BtuF, que contém 81.20% de identidade e 100% cobertura de sequência. Os modelos gerados (Figura 7) foram analisados pelo programa PyMol para visualizar as proteínas alinhadas, ambos modelos foram validados pelo diagrama de Ramachandran.

A SBP BtuF contém duas regiões globulares ligadas por um interdomínio constituído de alfa-hélice, de forma que não se pode classificar essa SBP conforme a classificação de Quioco e Ledvina (1996). Essa topologia da BtuF é similar a da SBP de manganês, a PsA de *Streptococcus pneumoniae* e a SBP de zinco, a TroA de *Treponema pallidum* e, de acordo com Borths e colaboradores (2002), são classificados em um terceiro grupo destinado a SBP que contém a referida estrutura.

O alinhamento múltiplo de sequência entre as SBP de transportadores ABC de vitamina B₁₂ de bactérias de interesse à saúde, (Figura 8A). Para esse alinhamento múltiplo foi utilizado o programa Clustal e também para construção e análise da árvore filogenética dessas proteínas (Figura 8B). Através do alinhamento múltiplo de sequência em conjunto com método de comparação no Pymol e pesquisa na literatura de SBPs com estruturas resolvidas, pode-se identificar que os aminoácidos do bolsão de ligação de BtuF são: Pro⁹, Tyr²⁸, Trp⁶³, Asp²²⁰, Arg²²⁴ e Trp¹⁷⁴ (Figura 7B). De acordo com Karpowich e colaboradores (2003) esses mesmos aminoácidos estão relacionados com a ligação da Vitamina B₁₂ a SBP ButF de *E. coli*. Esses aminoácidos estão conservados na sequência da BtuF, de forma que pode-se sugerir que a ButF é uma proteína ligadora de Vitamina B₁₂.

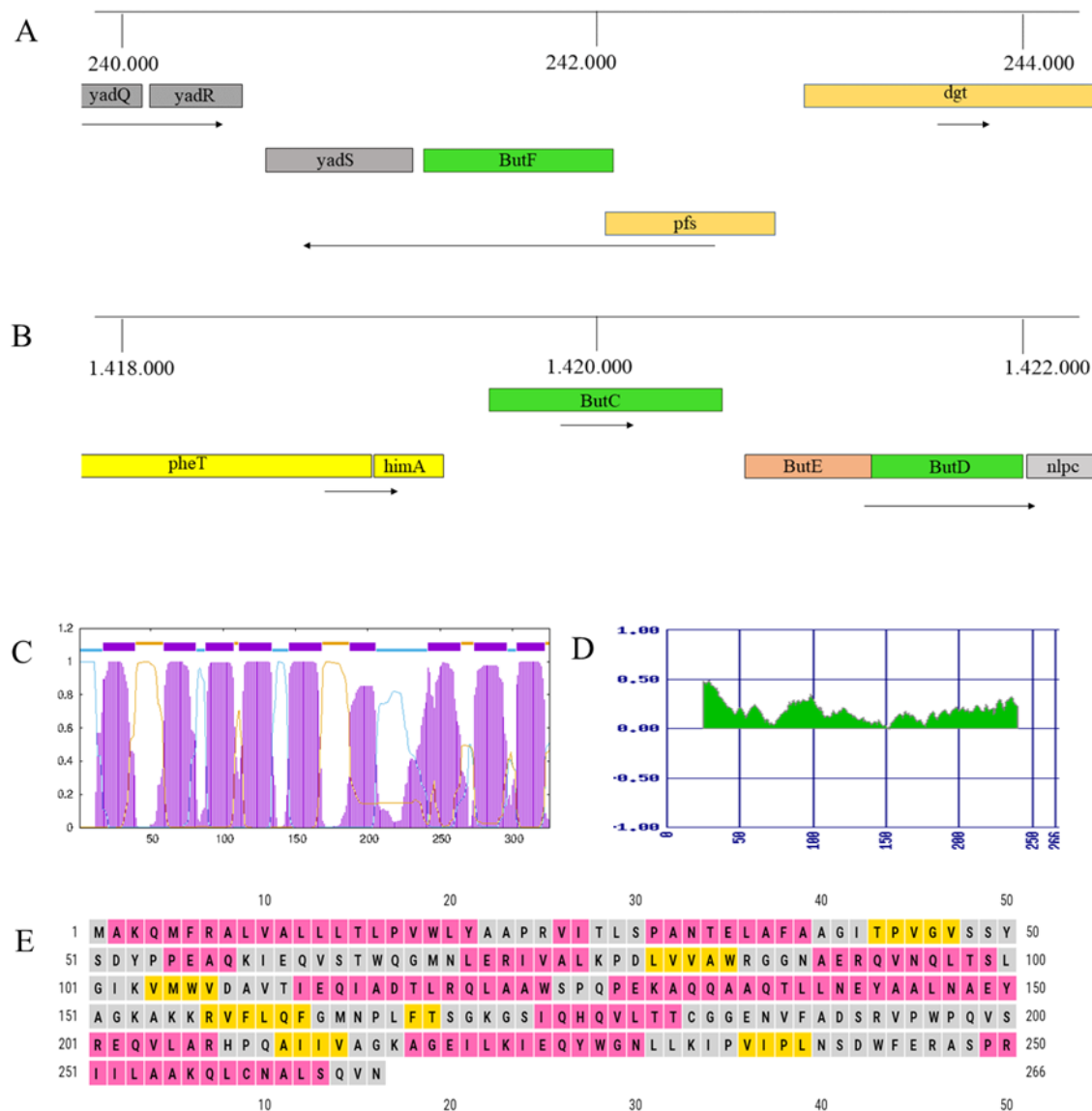


Figura 6 - A e B: Representação parcial do Mapa Genômico do Transportador BtuCDF, onde a proteína ButF se encontra em região diferente das proteínas ButC e ButD, a ButF está entre os nucleotídeos 241.270 até 242.070, enquanto ButC e ButD estão localizados entre os nucleotídeos 1.419.562 até 1.420.542 e 1.421.185 até 1.421.934, respectivamente; Fonte: Kegg. **C:** Análise do programa TMHMM da proteína ButC onde mostra em roxo as regiões transmembranas da proteína, em azul são regiões citoplasmáticas e em laranja são as regiões extracelulares. **D:** Análises das regiões ordenadas da ButF, não foram identificadas regiões desordenadas. **E:** Cinza representa as regiões em coil da sequência da SBP ButF, em amarelo as regiões de fita-beta e hélice alfa representadas em rosa. Fonte: Próprio Autor.

Na Figura 8B pode-se analisar que as proteínas ButF de *Klebsiella pneumoniae*, ButF de *Salmonella Typhimurium* e *E.coli* têm o mesmo ancestral, apresentando uma maior similaridade em sua sequência. Segundo Berntsson e colaboradores (2010), de acordo com a topologia, similaridade de sequência e a árvore filogenética, pode-se classificar a ButF como pertencente ao cluster A-II, que engloba SBPs ligantes de metais quelados.

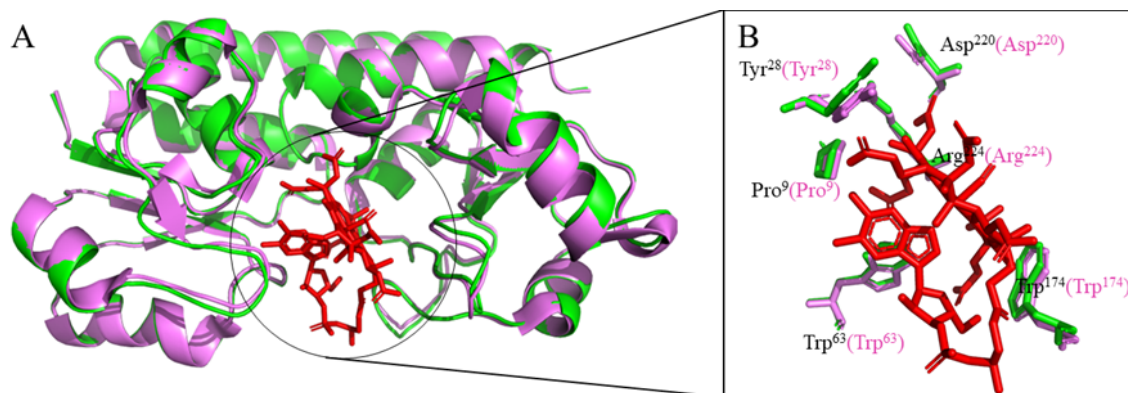


Figura 7 - A: Modelo tridimensional da SBP de vitamina B₁₂ de *E. coli*, código PDB: 1N4A em rosa claro, alinhado com o modelo criado por homologia da SBP BtuF de *Salmonella Typhimurium* em verde cintilante, molécula de vitamina B₁₂ em vermelho localizada na região do bolsão de ligação das SBPs. **B:** Representação dos aminoácidos do bolsão de ligação da BtuF de *Salmonella Typhimurium* alinhados com os aminoácidos do bolsão de ligação da SBP 1N4A, os aminoácidos conservados em ambos os bolsões são: Pro⁹, Tyr²⁸, Trp⁶³, Asp²²⁰, Arg²²⁴ e Trp¹⁷⁴. Fonte: Próprio Autor

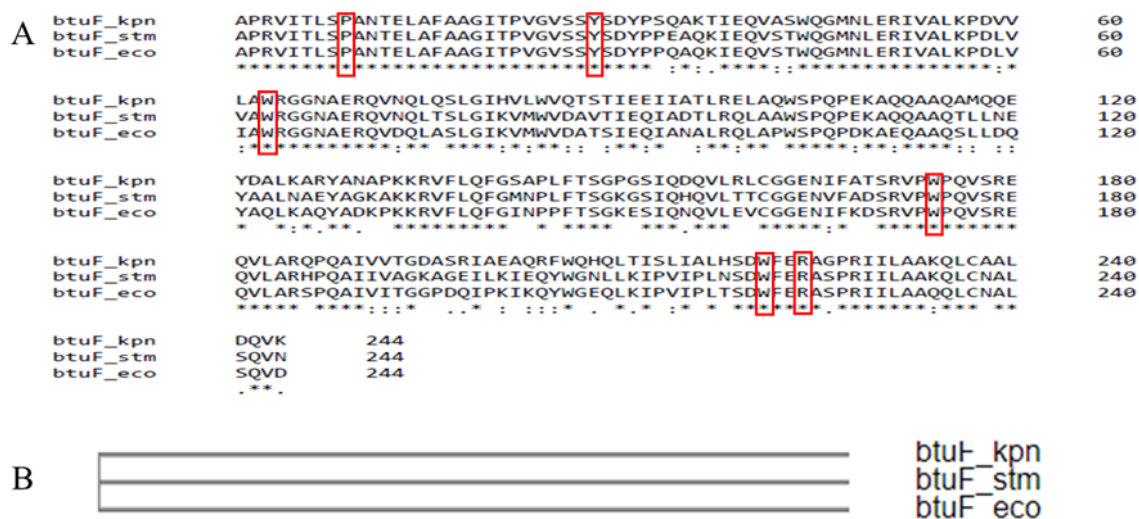


Figura 8 - A: Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos das SBPs de vitamina B₁₂, contendo BtuF da bactéria *Klebsiella pneumoniae* (kpn); BtuF de *E. coli* (eco) e BtuF de *Salmonella Typhimurium* (stm); circulado em vermelho estão os aminoácidos do bolsão de ligação. **B:** Árvore filogenética das SBPs de vitamina B₁₂ de kpn, eco e stm, na qual pode identificar que as SBPs originam do mesmo ancestral e mantêm uma maior similaridade em suas sequências. Fonte: Próprio Autor.

CONCLUSÃO

O trabalho mostrou ser importante para elucidação dos constituintes dos transportadores ABC PotABCD, PotFGHI e BtuCDF, e a caracterização de seus bolsões de ligação. A árvore filogenética das SBPs de poliaminas demonstraram que ambas as proteínas vieram do mesmo ancestral e através alinhamento múltiplo demonstrou a similaridade das

seqüências de SBPs e que a maioria dos aminoácidos dos bolsões de ligação são conservados entre elas, isso também visto no caso das SBPs de vitamina B₁₂, de forma que possibilita novos projetos que buscam mecanismos que inibam a ligação do substrato com a SBP, sendo assim, um possível mecanismo para combater a resistência bacteriana relacionada ao transportador ABC e consequentemente combater o patógeno.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, A.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.

ANDERSON, C. J; KENDALL, M. M. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strategies for Host Adaptation. **Front Microbiol.** 2017;8:1983. 2017. doi:10.3389/fmicb.2017.01983.

ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. **ScientificWorldJournal.** 2015; 520179. doi:10.1155/2015/520179.

ARMENTEROS, José Juan Almagro et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019. doi: 10.1038/s41587-019-0036-z.

BERNTSSON, R. P.; SMITS, S. H.; SCHMITT, L.; SLOTBOOM, D. J.; POOLMAN, B. A structural classification of substrate-binding proteins. **FEBS Lett.** 2010, 18;584(12):2606-17. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.043.

BORTHS, E.L.; LOCHER, K.P.; LEE, A.T.; REES, D.C. The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002;99(26):16642-16647. doi:10.1073/pnas.262659699

COSTA, T. R., FELISBERTO-RODRIGUES, C., MEIR, A., PREVOST, M. S., REDZEJ, A., TROKTER, M., & WAKSMAN, G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature reviews. Microbiology.** 2015 13(6), 343–359. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>

DAVIDSON, A.; CHEN, J. ATP-binding Cassette Transporters in Bacteria. **Annu Rev Biochem.** 2004, 73:241-68. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073626.

DELANO, W. L. The PyMol Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, 2002. <http://www.pymol.org>.

DAVIDSON, A.L. Not Just Another ABC Transporter. **Science.** 2002, 296(5570), 1091–1098. doi:10.1126/science.1071142

DOS SANTOS, A. M. P.; FERRARI, R. G.; CONTE-JUNIOR, C. A. Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. **Curr Microbiol.** 76(6), 2019, 762-773. doi: 10.1007/s00284-018-1510-4. Epub 2018 May 21. PMID: 29785632.

ESPINEL, I. C.; GUERRA, P. R.; JELSBÄK, L. Multiple roles of putrescine and spermidine in stress resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microb Pathog.** 2016; 95:117-123. doi: 10.1016/j.micpath.2016.03.008. Epub 2016 Apr 1. PMID:27041598.

GALÁN, J. E. *Salmonella* Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. **Nat Rev Microbiol.** 2021;19(11):716-725. doi:10.1038/s41579-021-00561-4.

GUERRA, P. R.; LIU, G.; LEMIRE, S.; NAWROCKI, A.; KUDIRKIENE, E.; MOLLER-JENSEN, J.; OLSEN, J. E.; JELSBÄK, L. Polyamine depletion has global effects on stress and virulence gene expression and affects HilA translation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Research in Microbiology**, 2020; 171(3-4), 143–152. doi:10.1016/j.resmic.2019.12.001.

HOLLENSTEIN, K.; DAWSON, R. J.; LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. **Curr Opin Struct Biol.** 17(4), 2007, 412-418. doi:10.1016/j.sbi.2007.07.003.

JAJERE S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Vet World.** 2019;12(4):504-521. doi: 10.14202/vetworld.2019.504-521.

KARPOWICH, N.K.; HUANG, H.H.; SMITH, P.C.; HUNT, J.F. Crystal structures of the BtuF periplasmic-binding protein for vitamin B12 suggest a functionally important reduction in protein mobility upon ligand binding. **J Biol Chem.** 2003;278(10):8429-8434. doi:10.1074/jbc.M212239200

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E.L.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. :567-580, 2001. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.

LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D; GIBSON T.J. AND HIGGINS D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.

LETUNIC, I.; Peer BORK, P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research.** Volume 46, Issue D1, 2018, Pages D493– D496, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx922>.

LEWIS, V. G.; WEEN, M. P.; MCDEVITT, C. A. The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. **Protoplasma**. 2012, 249:919–942. doi: 10.1007/s00709-011-0360-8.

LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. 2009; 364(1514), 239–245. doi:10.1098/rstb.2008.0125.

LOCHER, K. P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nature structural & molecular biology**. 2016, v 23, n 6. doi: 10.1038/nsmb.3216.

MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D.T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**. 2000 Apr;16(4):404-5. doi: 10.1093/bioinformatics/16.4.404. PMID: 10869041.

NIRANJAN H.B; BHASKAR M.M. Drug resistance in nontyphoidal *Salmonella*- challenges for the future. **J. Vet. Med. Res**. 2017;4(4).

PRILUSKY, J; FELDER, C. E; MORDEHAI, T. Z. B.; RYDBERG, E. H.; MAN, O.; BECKMANN, J. S.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. FoldIndex©: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. **Bioinformatics**. 2005. Volume 21, Issue 16, Pages 34353438, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti537>.

REECE, J. B., URRY, L. A., CAIN, M. L., WASSERMAN, S. A., MINORSKY, P. V., AND JACKSON, R. B. (2011). Membrane structure and function. **In Campbell biology**, 10th ed., p. 127. San Francisco, CA: Pearson.

RÓWNICKI, M; WOJCIECHOWSKA, M; WIERZBA A. J; CZARNECKI, J; BARTOSIK, D; GRYKO, D; TRYLSKA, J. Vitamin B12 as a carrier of peptide nucleic acid (PNA) into bacterial cells. **Sci Rep**. 2017 Aug 9;7(1):7644. doi: 10.1038/s41598-017-08032-8. PMID: 28794451; PMCID: PMC5550456.

SALAMOV, V. S. A.; SOLOVYEVAND, A. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. **Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies. Hauppauge: Nova Science Publishers**, p. 61-78, 2011.

VON HEIJNE, G. The Signal Peptide. **J. Membrane Biol**. 1990, 115, 195-201. <https://doi.org/10.1007/BF01868635>.

WATERHOUSE, A., BERTONI, M., BIENERT, S., STUDER, G., TAURIELLO, G., GUMIENNY, R., HEER, F.T., DE BEER, T.A.P., REMPFER, C., BORDOLI, L., LEPORE, R., SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Res**. 46(W1), W296-W303, 2018. doi: 10.1093/nar/gky427.