

CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE CAPTAÇÃO DE NUTRIENTES DE BACTÉRIAS RESISTENTES E BUSCA POR INIBIDORES COM O USO DA BIOINFORMÁTICA

CHARACTERIZATION OF NUTRIENT UPTAKE MECHANISMS OF RESISTANT BACTERIA AND SEARCH FOR INHIBITORS USING BIOINFORMATICS

CREMONESI, Aline Sampaio¹; NASCIMENTO, Ana Carolina Chiou¹; ANTONIO, Heber da Silva²; CARNEIRO, Geovana Almeida².

¹Docentes do Curso de Biomedicina da Universidade São Francisco;

²Graduandos de Biomedicina da Universidade São Francisco.

geovana.carneiro@mail.usf.edu.br | heber.antonio@mail.usf.edu.br

RESUMO

Frequentemente presentes em ambientes hospitalares, *Acinetobacter baumannii* (ACB) e *Klebsiella pneumoniae* (KPN) possuem resistência a antibióticos e mecanismos de comunicação celular, mediados por transportadores do tipo ABC. Proteínas ligadoras de substrato (SBP) estão envolvidas no transporte através da membrana e absorção de nutrientes como Poliaminas e Taurina, indispensáveis para a sobrevivência celular. Visando a compreensão do transporte a favor de possíveis estratégias antimicrobianas, o objetivo do estudo foi caracterizar e prever as estruturas dos transportadores ABC de KPN e ACB e suas prováveis interações, através dos bancos de dados KEGG e PDB, e dos *softwares* TMHMM, AlphaFold e DockThor. Também foram testados os transportadores de taurina TauA e poliaminas PotD e PotF com moléculas potencialmente inibidoras (cistamina, acetil-espermina, GABA e vigabatrina). Os resultados de energia livre (kcal/mol) indicam a capacidade de interações espontaneamente, além dos aminoácidos conservados. Para o transportador de taurina em ACB foram obtidos -42.029kcal/mol de energia livre e Q²⁰, G⁵¹, G⁶⁹, E⁹⁶, T¹²⁴ e D¹⁹⁷ apresentavam-se conservados, enquanto KPN, -39.957kcal/mol e Q⁸, G³⁹, G⁵⁷, T¹¹⁰ e D¹⁸³. Transportadores de poliaminas de KPN, tiveram: W¹¹, T¹², E¹³, Y¹⁴, S⁶⁰, Y⁶², D¹⁴⁵, E¹⁴⁸, D²³⁴ e Q³⁰⁴ conservados em -30.474kcal/mol para espermidina; e S¹², E⁵⁹, E¹⁵⁹, D²²¹ e Y²⁸⁸ em -25.017kcal/mol para putrescina. Em ACB, espermidina apresentou -40.278kcal/mol e putrescina, -26.499kcal/mol, com um aminoácido conservado (E¹⁹). A identificação de aminoácidos conservados e a possível interação com moléculas sintéticas podem proporcionar futuros alvos para antimicrobianos.

Palavras-chave: Análises *in silico*; Resistência bacteriana; Biofilmes; Infecção hospitalar; Estratégias bioinformáticas.

ABSTRACT

Frequently found in hospital environments, *Acinetobacter baumannii* (ACB) and *Klebsiella pneumoniae* (KPN) have antibiotic resistance and cell communication mechanisms mediated ABC-type transporters. Substrate binding proteins (SBP) are involved in the transport across the membrane and absorption of nutrients such as polyamines and taurine, essential for cell survival. To understand this transport for possible antimicrobial strategies, the aim of this study was to characterize and predict the structures of the KPN and ACB ABC transporters and their probable interactions, using the KEGG and PDB databases and the TMHMM,



Alphafold and DockThor software. Taurine transporter TauA and polyamines PotD and PotF were also tested with other molecules with potentially inhibitory (cystamine, acetyl-spermine, GABA and vigabatrin). The free energy results (kcal/mol) indicate the capacity to interact spontaneously, in addition to the conserved amino acids. For the taurine transporter in ACB, -42.029kcal/mol of free energy was obtained and Q²⁰, G⁵¹, G⁶⁹, E⁹⁶, T¹²⁴ e D¹⁹⁷ were conserved, while in KPN, -39.957kcal/mol and Q⁸, G³⁹, G⁵⁷, T¹¹⁰ and D¹⁸³. KPN polyamine transporters, the results were: W¹¹, T¹², E¹³, Y¹⁴, S⁶⁰, Y⁶², D¹⁴⁵, E¹⁴⁸, D²³⁴ and Q³⁰⁴ were conserved at -30.474kcal/mol for spermidine; and S¹², E⁵⁹, E¹⁵⁹, D²²¹ and Y²⁸⁸ at -25.017kcal/mol for putrescine. In ACB, spermidine showed -40.278kcal/mol, and putrescine, -26.499kcal/mol, with one conserved amino acid (E¹⁹). The identification of conserved amino acids and their possible interaction with synthetic molecules could provide future targets for antimicrobials.

Keywords: *In silico* analysis; Bacterial resistance; Biofilms; Hospital infection; Bioinformatics strategies.

INTRODUÇÃO

Nos dias atuais as bactérias têm sido reportadas na literatura com a prevalência de multirresistência a antibióticos conhecidos e utilizados como tratamento dos pacientes após o diagnóstico de infecção bacteriana. Possivelmente, nas próximas décadas não será possível usufruir de medicamentos atuais, devido à capacidade de alta prevalência de resistência bacteriana. Esse é um fator preocupante assim como a caracterização de morbimortalidade na população (Ribeiro, 2023).

Em geral, bactérias gram negativas como *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (KP) também se destacam pelo alto perfil de resistência a antimicrobianos. KP é conhecida por infecções do trato urinário, trato respiratório, sistema nervoso central, corrente sanguínea, entre outros. Em relação aos mecanismos de resistência destes microrganismos, *K. pneumoniae* é descrita por ser ESBL + (β-lactamases de espectro estendido) (Stojowska-swędrzyńska, 2021), com padrão de múltiplo de resistência. Ainda, está presente em surtos de infecções hospitalares a nível mundial (Dienstmann, 2010) nos pacientes atendidos em unidades de terapia intensiva (UTI).

Na classe das opções terapêuticas, *Acinetobacter baumannii* é considerado um carbapenêmico resistente (Bartal, 2022), que apresenta um perfil de colonização em ambientes hospitalares com amplo painel de virulência com casos hospitalares da classe dos gram negativos descritos por *A. baumannii*. A capacidade de formação de biofilmes possibilita a adesão e fixação deste microrganismo, que ocorre a partir da captação de múltiplos nutrientes (Vieira, 2015; Picoli, 2015), o que caracteriza a resistência aos medicamentos utilizados para tratamentos, ocasionando em um maior tempo de subsistência da bactéria.

Existem também nutrientes que são indispensáveis para a sobrevivência das bactérias, como as Poliaminas (PAs), moléculas presentes em inúmeros tipos celulares, desde microrganismos até plantas e animais. Possui peso molecular baixo e sua denominação são cátions inorgânicos, com alta capacidade de interação com moléculas de carga negativa, como o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), desta maneira mediam o crescimento e a proliferação celular (Igarashi; Kashiwagi, 2000). A captação de poliaminas pode ser feita por meio de complexos proteicos específicos para captação e internalização dessas moléculas. Outro nutriente utilizado é a taurina, molécula orgânica sulfurada



biogénica, extensivamente utilizada pelos microrganismos para a assimilação de enxofre (necessário para a biossíntese de aminoácidos e de cofatores). A absorção da taurina pode complementar a carência do enxofre em diversas bactérias. (Nishikawa, *et al.*, 2018; Qu, *et al.*, 2019; Pereira, 2017; Kertsz, 1999).

Entretanto, a utilização desses nutrientes pelos microrganismos só é possível devido a presença de proteínas que realizam o transporte através da membrana, como a família de proteínas dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Esses, são potencialmente reconhecedores de solutos de interesse biológico (orgânico ou inorgânico) e realizam transporte de forma ativa através membrana, sendo divididos entre importadores e exportadores. Estes grupos contém uma estrutura organizacional básica comum, como: dois domínios ligadores de nucleotídeos que utilizam ATP como energia para o transporte (ATPases) e dois domínios transmembranas (permeases), que formam poros de passagem nas membranas. Envolvidas na absorção de nutrientes, a proteína ligadora de substrato (*substrate-binding proteins* – SBPs), ou periplasmática, que forma uma classe de proteínas com domínios proteicos ligadores, que transportam valiosos nutrientes (Pereira, 2017; Araújo *et al.*, 2013; Kertsz, 1999; Berntsson *et al.*, 2010).

A bioinformática permite analisar, processar e organizar grande quantidade de informações biológicas, o que seria impossível de analisar manualmente. As ferramentas específicas para interpretação de dados biológicos e resoluções de problemas, contribuem nas aplicações de informática e ciências da informação na biologia. São realizadas previsões da estrutura e função das proteínas, acompanhamento de fenômenos genéticos, criação de macromoléculas alteradas para a clínica ou indústria, montagem de pequenas moléculas que podem inibir ou potencializar a sua função biológica (Altman, 1998). O *docking* molecular é excepcional para o desenvolvimentos de fármacos, a fim de observar uma molécula interagindo com uma proteína a partir de predições de análises da interação entre ligantes e proteínas alvo (Machado, 2011).

METODOLOGIA

Busca de transportadores ABC em *A. baumannii* e *K. pneumoniae*

As proteínas transportadoras que compõem os transportadores ABC de poliaminas e taurina de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* foram identificadas a partir de busca no banco de dados Kegg (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <https://www.genome.jp/kegg/>), onde foi observado a localização genômica, assim possibilitando a sugestiva região dos operons nas bactérias.

Identificação Inicial das Proteínas

Para maior eficiência das análises de bioinformáticas 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). A sequência de aminoácidos da proteína funcional foi localizada e encontrada as regiões de peptídeo sinal, que posteriormente foram removidas, pelo programa SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> - Armenteros *et al.*, 2019) para realizar as análises sem essa região. As proteínas permeases do transportador ABC foram identificadas a partir do programa *on line* TMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>), avaliando as características dos aminoácidos presentes na sequência FASTA das proteínas, buscando por regiões hidrofóbicas, características de regiões transmembranas (Krogh *et al.*, 2001). As proteínas ATPases tiveram seus domínios identificados a partir do programa Smart Domain,



que determina os domínios funcionais das proteínas, podendo identificar as regiões conservadas (<http://smart.embl-heidelberg.de/> - Letunic *et al.*, 2021).

Modelagem e Docking Molecular

Para a predição da estrutura tridimensional das proteína SBP do transportador ABC de poliaminas e de taurina em *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*, modelos tridimensionais *ab initio* foram obtidos através do programa online ColabFold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) predizendo de forma rápida, as coordenadas atômicas de modelos de proteínas gerados tridimensionalmente (Mirdita, 2022). Posteriormente as sequências de aminoácidos das proteínas foram alinhadas por meio do programa Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> - Larkin *et al.*, 2007) a fim de comparar com proteínas que possuem estrutura resolvida. Foi visualizada a posição de aminoácidos conservados presentes no bolsão pelo programa Pymol (<https://pymol.org/2/> - DeLano, 2002), permitindo assim identificação dos aminoácidos já descritos na literatura com para interagir com o ligante. Os modelos gerados foram utilizados para a realização do *docking* molecular, utilizando o programa DockThor (<https://dockthor.lncc.br/v2/>), um preditor *online* que estima a interação entre proteína e moléculas, a fim de avaliar a energia livre (associação entre moléculas), que contribuem para definir a energia livre da ligação (Guedes, 2021). As possíveis moléculas ligadoras e inibidoras de SBP utilizadas na *docking* foram identificadas na literatura e por meio do banco de dados DRUGBANK (*DrugBank 5.0* - <https://go.drugbank.com>) (WISHART *et al.*, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Proteínas do transportador ABC de poliaminas e de taurina de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* foram identificadas no banco de dados Kegg a partir do código acb e kpn, respectivamente. Foram organizados em óperon os genes possivelmente relacionados aos transportadores ABC envolvidos no transporte de poliaminas e taurina (Tabela 1).

Tabela 1: Organização dos dados e informações obtidas por meio do KEGG de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*.

Organismo	Nutriente	Código KEGG	Proteína	Classificação
<i>A. baumannii</i>	Poliaminas	A1S_1359	PotD	SBP
		A1S_1360	PotA	ATPase
		A1S_1361	-	Indeterminado
		A1S_1362	PotC	Permease
	Taurina	A1S_1442	TauA	SBP
		A1S_1443	TauB	ATPase
		A1S_1444	TauC	Permease

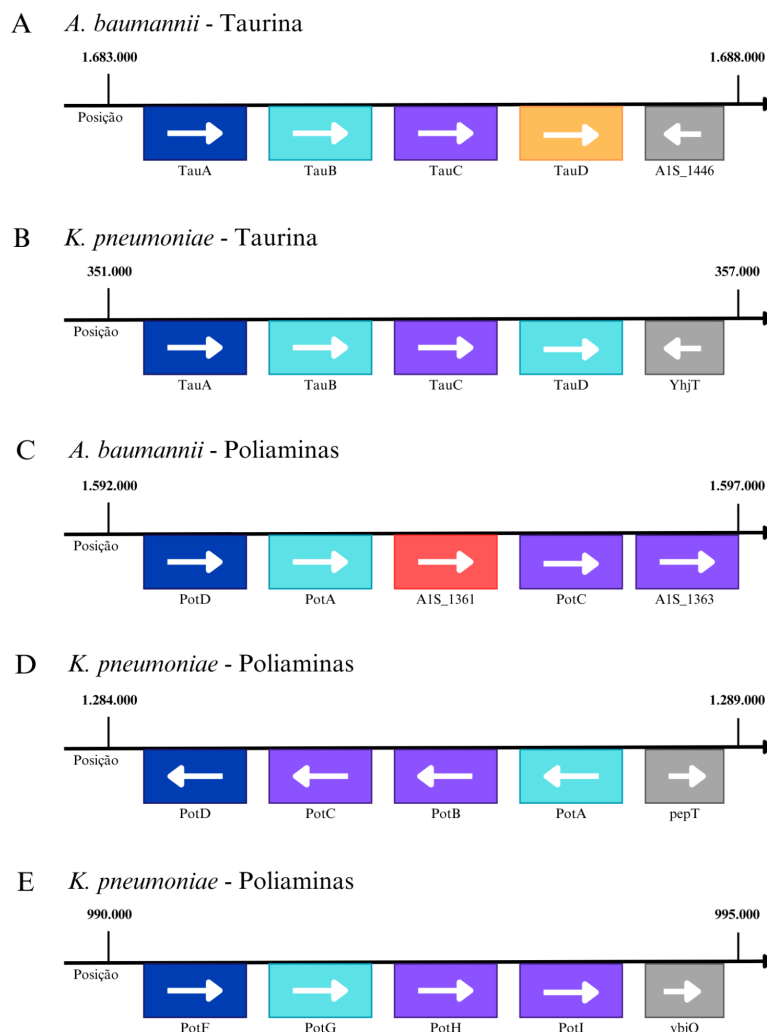


Organismo	Nutriente	Código KEGG	Proteína	Classificação
<i>K. pneumoniae</i>	Espermidina	KPN_00311	TauA	SBP
		KPN_00312	TauB	ATPase
		KPN_00313	TauC	Permease
		KPN_01129	PotD	SBP
		KPN_01130	PotC	Permease
		KPN_01131	PotB	Permease
	Putrescina	KPN_01132	PotA	ATPase
		KPN_00885	PotF	SBP
		KPN_00886	PotG	ATPase
		KPN_00887	PotH	Permease
		KPN_00888	PotI	Permease

Esta organização (Figura 1) é comum nas diferentes espécies bacterianas para diferentes transportadores como o transportador de poliaminas em *Xanthomonas citri* (Cremonesi, 2021) e *Staphylococcus* (Silva *et al.*, 2023) e de taurina em *Escherichia coli* (Van Der Ploeg, *et al.*, 1997).

Figura 1: Identificação das proteínas dos transportadores ABC de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* em seus respectivos operons e posições no genoma. Ilustração dos óperons. Em azul escuro estão as SBPs, em azul claro as ATPases e em roxo as permeases. Destacadas em cinza são os genes que não fazem parte do óperon e em vermelho significa que não obteve caracterização significativa. **(A)** TauA, TauB e TauC de *A. baumannii*; **(B)** TauA, TauB e TauC de *K. pneumoniae*; **(C)** PotD, PotA, A1S_1361(indeterminada) e PotC de *A. baumannii*; **(D)** PotD, PotC, PotB e PotA de *K. pneumoniae*; **(E)** PotF, PotG, PotH e PotI de *K pneumoniae*.





As permeases são proteínas transmembranas que contém predominância de aminoácidos hidrofóbicos organizados em hélices-alfa para interação com as camadas lipídicas (Guna, 2018).

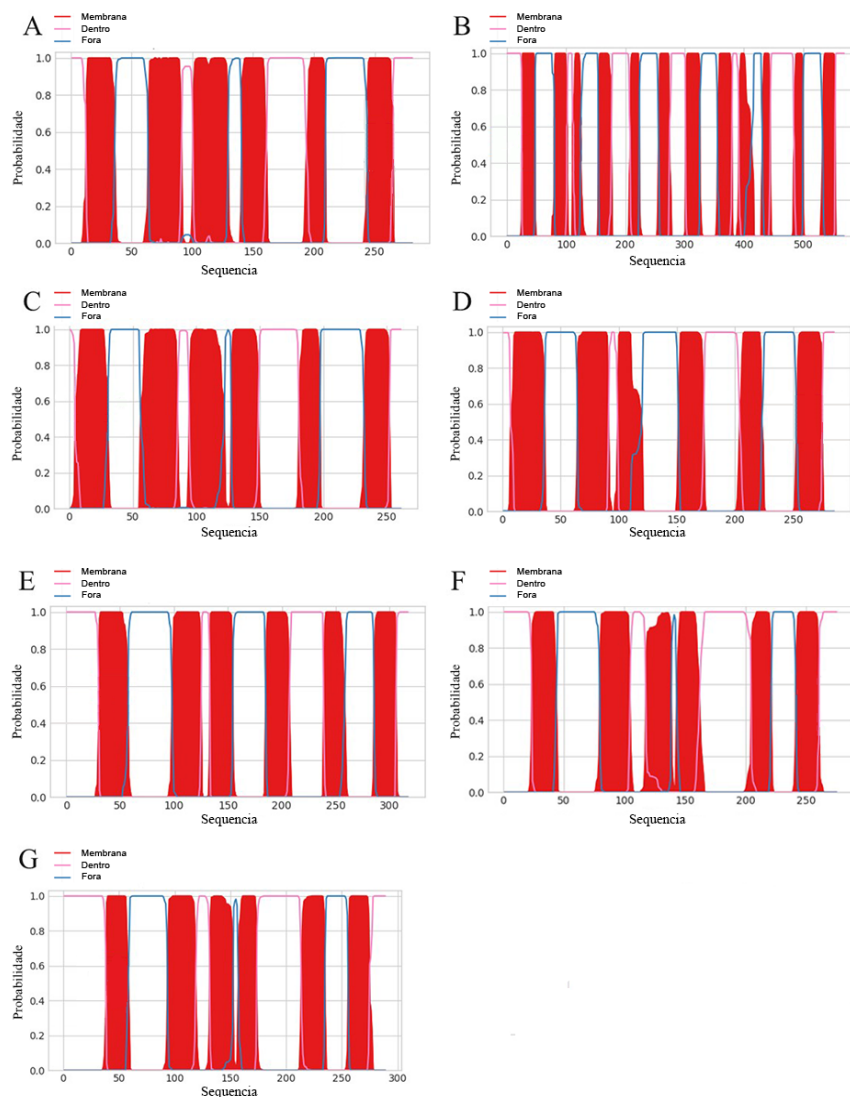
Segundo Alam, 2023, as hélices alfa transmembrana das TMDs formam um poro transmembrana que pode ser acessado a partir do citoplasma ou da extremidade da célula. De uma forma geral, as TMDs contém de 6 a 10 hélices alfa transmembrana (comparado a um total de 12 a 20 segmentos de um transportador inteiro). Além disso, para importadores bacterianos do tipo I, porções específicas das TMDs estão envolvidas na ligação de substrato, onde foram visualizados por meio de estudos de cristalografia e mutagênese (Alam, 2023).

Ao realizar a análise, a partir das características dos aminoácidos presentes na sequência FASTA das proteínas, foram identificadas proteínas PotI (KPN), PotC (ACB), PotC (KPN), PotB (KPN), PotH (KPN), TauC (KPN) e TauC (ACB), com domínios transmembrana, indicadas na Figura 2. As proteínas de TauA se caracterizam homodiméricas por obter somente um gene codificador da permease no óperon. Diferentemente, as proteínas PotD e PotC são heterodiméricas, pois estão acompanhadas de dois genes codificadores de proteínas permeases no mesmo óperon (Figura 1).

Figura 2: Os resultados obtidos no programa TMHMM apontaram possíveis regiões transmembranas, conforme visualizado (A) PotI (KPN); (B) PotC (ACB); (C) PotC (KPN); (D) PotB (KPN); (E) PotH (KPN); (F) TauC



(KPN); (G) TauC (ACB). Regiões intermembranas em vermelho. Regiões citoplasmáticas em rosa. Regiões externas à membrana em azul. Regiões transmembranas identificadas, caracterizando as proteínas como possíveis permeases.



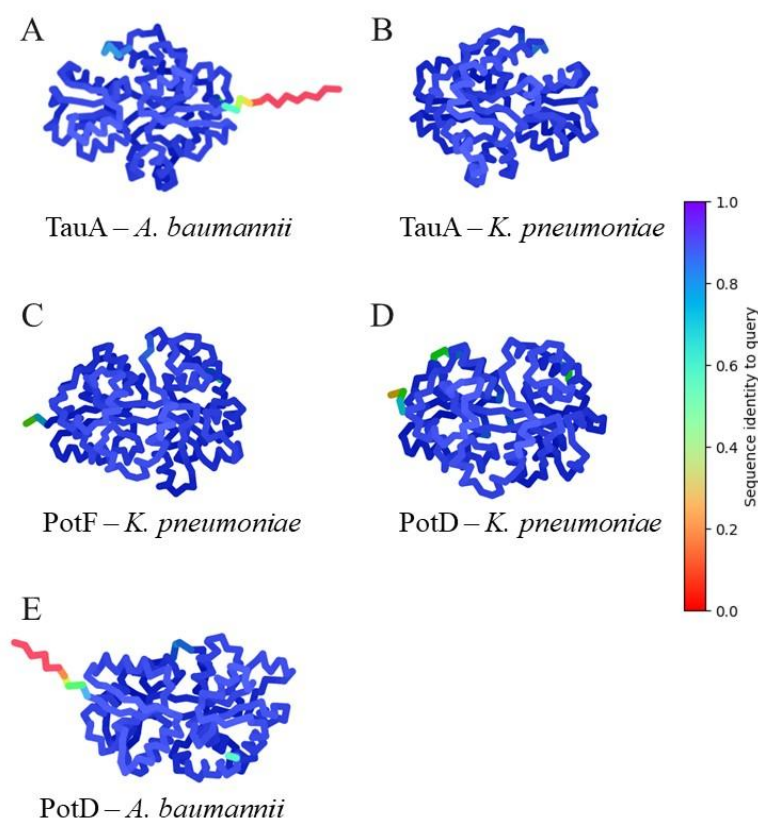
O programa Smart Domain identificou o domínio AAA nas proteínas PotA (ABC); TauB (ACB); TauB (KPN); PotA (KPN) PotG (KPN), característico de ATPases, indicando sequências específicas da proteína que participam de atividades celulares que são dependentes da energia de hidrólise de ATP (Jones, 2013).

Outra comum na estrutura dos transportadores ABC são as SBP (*substrate-binding protein*), que foram identificadas nas proteínas que 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). Foi identificado na proteína TauA de KPN e de ACB a mesma região de peptídeo sinal, que cliva na posição 24-25. Para a PotD de ACB e PotF de KPN o sítio de clivagem é entre a posição 26-27. A PotD de KPN cliva na posição 23-24. Isso sugere que a proteína é uma SBP. A partir desses resultados foi sugerido que as proteínas citadas possivelmente são proteínas SBPs pois elas precisam ser externalizadas. Foram identificadas como proteínas SBPs e então utilizadas para a modelagem tridimensional.



Um fator de métrica de qualidade é o IDDT (*Local Distance Difference Test* - Teste de Diferença de Distância Local), que avalia a distância entre átomos de uma estrutura conhecida e de extrema qualidade. Segundo as análises de Mariani *et al.*, 2013) o IDDT é uma ferramenta robusta com boa correlação de avaliação de um modelo, de forma automatizada. Os gráficos do IDDT apresentam a visualização de um modelo de proteína em que as cores quentes indicam áreas menos favoráveis e as áreas de cores frias indicam alto nível de confiabilidade do modelo (Mariani *et al.*, 2013).

Figura 3: Resultados das proteínas SBPs gerados pelo programa online ColabFold. Modelo tridimensional utilizado para realizar as análises. Identidade das sequências apresentadas por índices em azul que contém alta confiabilidade, enquanto regiões em vermelho obtêm menor índice de favorecimento. (A) TauA de *A. baumannii*; (B) TauA de *K. pneumoniae*; (C) PotF de *K. pneumoniae*; (D) PotD de *K. pneumoniae*; (E) PotD de *A. baumannii*.



Para estabelecer a relação entre a sequência de aminoácidos das proteínas encontradas em outros microrganismos, os modelos foram comparados com estruturas proteicas que foram previamente resolvidas por cristalografia de raios X. Foram escolhidas as proteínas de *Escherichia coli* (ECO) com estruturas resolvidas como PotD de *E. coli* (1POT), PotF de *E. coli* k-12 (6YE8) e a TauA de *E. coli* k-12 (6ST0) apresentadas na Tabela 2. Contendo um alto índice de *Query Cover* (QC) e *Percentual Ident* (PI), catalogadas em bancos de dados como transportadoras de nutrientes específicos (poliaminas e taurina), onde existem aminoácidos suscetíveis de serem conservados, por conta de estruturas semelhantes (Taylor, 1986), sendo indicativo de especificidade entre as proteínas.

Tabela 2: Descrição das proteínas SBPs já apresentadas na literatura como transportadoras de poliaminas e taurina, detalhados pelo PDB (*Protein Data Bank*). Resultado do alinhamento com as proteínas TauA, PotD e PotF evidenciando as porcentagens de cobertura e identidade.



Organismo	Código PDB	Alinhado com	Cobertura (Query Cover)	Identidade (Percentual Ident)
ECO	6ST0	TauA (ACB)	94%	55,89%
ECO	6ST0	TauA (KPN)	99%	88,89%
ECO	6YE8	PotD (ACB)	41%	25%
ECO	1POT	PotD (KPN)	93%	91,69%
ECO	1POT	PotF (KPN)	92%	91,86%

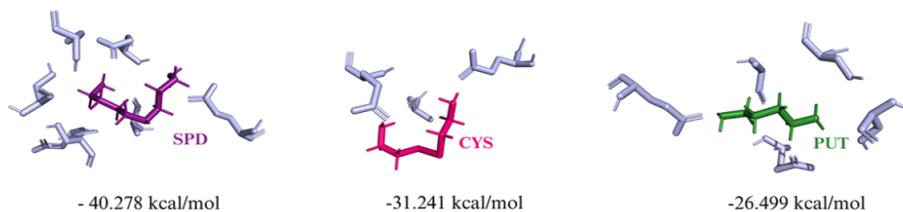
A predição da interação entre receptores e ligantes ocorre pelo *docking* molecular. Este método avalia a possibilidade de ligação entre duas moléculas onde no sítio de ativação acontecem as ligações (Machado, 2014). A força da reação precisa de um tipo de energia favorável que se chama energia livre (*free energy of binding* - FEB), que em um nível atômico, quanto menor a energia livre, mais espontânea é a reação. As análises geraram posições diferentes de interação de cada molécula, em relação a proteína. Foi avaliado a interação das proteínas SBPs com seus respectivos ligantes (poliaminas e taurina) com o intuito de reforçar a proposta de suas funções no transporte desses nutrientes. Além dessa predição, foi avaliada uma possível interação das proteínas com as moléculas de cistamina e acetil-espermina. A cistamina é uma molécula provável de inibição competitiva pela putrescina (Hoet, 1993). Estudos com a acetil-espermina conjugada demonstram que a molécula contém uma possível habilidade de inibir poliaminas (Burns, 2001). Sabe-se que o GABA é um substrato para o TauT, um transportador de taurina. Um estudo realizado por Rasmussen *et al.*, 2016, investigou a capacidade dos miméticos básicos do GABA interagirem com TauT, por meio da correlação entre taxas de absorção e dados moleculares. Foi demonstrado que os miméticos do GABA como a vigabatrina (fármaco utilizado como antiepilético) inibiram a captação de taurina em células SKPT renais hiperosmóticas de ratos. Há pouca informação sobre os miméticos do GABA quando relacionados com os transportadores ABC de taurina em bactérias. Por este motivo foi avaliado a relação da GABA e da vigabatrina com as proteínas TauA de KPN e ACB. Foi observado que ambas as moléculas têm potencial de interação, devido aos resultados de energia livre negativa obtidos na *docking* molecular.

Os resultados das análises indicam que muito provavelmente as proteínas são transportadoras específicas, como descritas. Além disso, análises com outras moléculas foram testadas para proteínas já descritas, a fim de apresentar as sugestões que possam ser funcionais e impedir o transporte dos nutrientes (Figura 4).

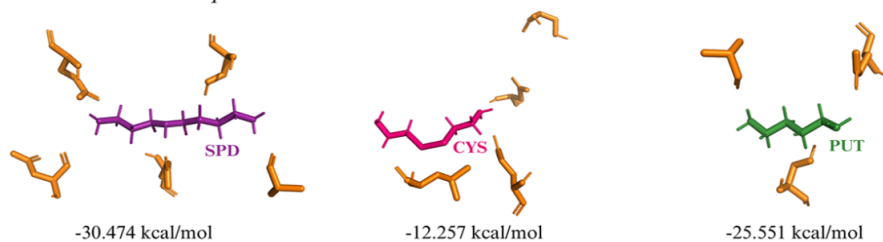
Figura 4: Modelos tridimensionais de potenciais resultados das interações entre aminoácidos-ligantes.. Destacados em *sticks*: aminoácidos interagindo na cavidade de cada proteína SBP. Interações da PotD e PotF com espermidina (SPD), cistamina (CYS) e putrescina (PUT). Interação da TauA com Taurina (TAU), Vigabatrina (VIG) e GABA. Valores de energia livre (kcal/mol) abaixo de cada figura de interação. (A) Proteína PotD de *A. baumannii*; (B) PotF de *K. pneumoniae*; (C) PotD de *K. pneumoniae*; (D) TauA de *A. baumannii*; (E) TauA de *K. pneumoniae*.



A PotD - *Acinetobacter baumannii*



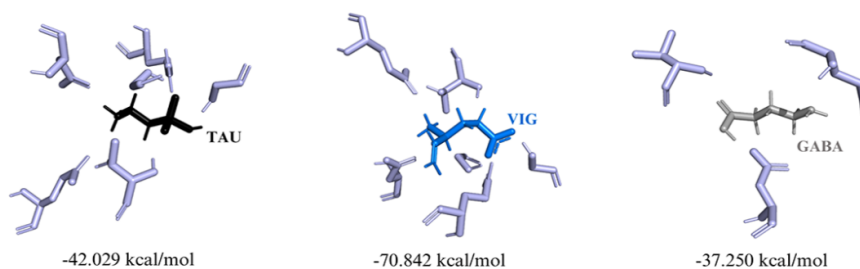
B PotF - *Klebsiella pneumoniae*



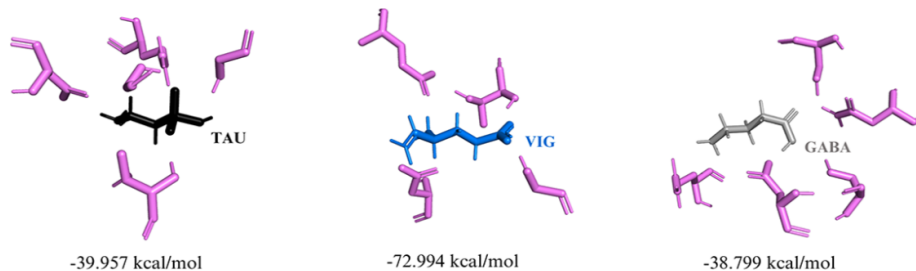
C PotD - *Klebsiella pneumoniae*



D TauA - *Acinetobacter baumannii*



E TauA - *Klebsiella pneumoniae*



PotD e TauA de *A. baumannii* resultaram em energia livre de -40.278 kcal/mol e -42.029 kcal/mol, com espermidina e taurina, respectivamente. A energia livre calculada para os transportadores de *K. pneumoniae* resultou em PotD (-14.582 kcal/mol), PotF (-25.551 kcal/mol para putrescina e -30.474 kcal/mol para espermidina) e TauA (-39.957 kcal/mol) com interação com espermidina, putrescina e taurina, respectivamente. A interação das proteínas



SPBs com outras moléculas obtiveram índice de energia livre consideráveis e aminoácidos interagiram com os ligantes (Figura 4). Em geral, as proteínas apresentam aminoácidos conservados nas sequências, quando comparados às proteínas descritas e resolvidas na literatura, o que indica a alta probabilidade de serem transportadoras dos respectivos nutrientes. Os aminoácidos destacados na Figura 4 indicam, em grande parte, a sequência conservada dos respectivos nutrientes. Na Tabela 3 estão apresentadas as correlações entre os aminoácidos.

Tabela 3: Relação dos aminoácidos identificados no *docking* molecular que possivelmente interagem com as moléculas de taurina, GABA e Vigabatrina, em proteínas TauA de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Foi correlacionado com aminoácidos da proteína TauA de *E. coli* que atuam no transporte de taurina, já descritos na literatura.

Organismo	Proteína	Molécula	Aminoácidos com interação					
ECO	TauA	Taurina	Q ³⁰	G ⁶¹	G ⁷⁹	E ¹⁰⁶	T ¹³²	D ²⁰⁵
	TauA	Taurina	Q ²⁰	G ⁵¹	G ⁶⁹	E ⁹⁶	T ¹²⁴	D ¹⁹⁷
ACB	TauA	GABA	Q ²⁰	-	-	-	-	D ¹⁹⁷
	TauA	Vigabatrina	Q ²⁰	G ⁵¹	G ⁶⁹	E ⁹⁶	T ¹²⁴	D ¹⁹⁷
KPN	TauA	Taurina	Q ⁸	G ³⁹	G ⁵⁷	-	T ¹¹⁰	D ¹⁸³
	TauA	GABA	Q ⁸	-	-	-	-	D ¹⁸³
	TauA	Vigabatrina	-	G ³⁹	-	E ⁸⁴	T ¹¹⁰	D ¹⁸³

Por meio do *docking* molecular, foi notado outros possíveis aminoácidos que podem realizar a interação no transporte. Em TauA de KPN foi visualizado os aminoácidos S⁷⁸, S⁸³ e N²⁴⁸ interagindo com a molécula GABA. No caso da proteína TauA de ACB analisada com a molécula de Vigabatrina, foi visto também a interação do aminoácido V²³.

Tabela 4: Os aminoácidos identificados na *docking* molecular que interagiram com as moléculas de espermidina, putrescina e cistamina, em proteínas PotD A de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Foi correlacionado com aminoácidos das proteínas PotD de *E. coli* que atuam no transporte de espermidina.

Organismo	Proteína	Molécula	Aminoácidos com interação							
ECO	PotD	SPD	E ³⁶	Y ³⁷	S ⁸³	Y ⁸⁵	D ¹⁶⁸	E ¹⁷¹	D ²⁵⁷	Q ³²⁷
		SPD	E ¹⁹	-	-	-	-	-	-	-
ACB	PotD	PUT	E ¹⁹	-	-	-	-	-	-	-
		CYS	E ¹⁹	-	-	-	-	-	-	-



		SPD	E ¹³	Y ¹⁴	-	-	D ¹⁴⁵	D ²³⁴	-
KPN	PotD	PUT	-	Y ¹⁴	-	-	D ¹⁴⁵	E ¹⁴⁸	D ²³⁴ -
		CYS	-	Y ¹⁴	S ⁶⁰	Y ⁶²	D ¹⁴⁵	E ¹⁴⁸	D ²³⁴ -

Neste *docking*, outros possíveis aminoácidos foram visualizados que podem realizar a interação no transporte (Tabela 4). Em PotD de ACB foi visualizado os aminoácidos A¹⁷, D⁴⁴, S⁴⁵ e E²³⁷ interagindo com a molécula Cistamina. No caso da proteína PotD de KPN analisada com Cistamina, a interação foi com os aminoácidos D⁸⁸, Q⁹⁰ e T²⁷².

Tabela 5: Os aminoácidos identificados na *docking* molecular que interagiram com as moléculas de espermidina, putrescina e cistamina, em proteínas PotF A de *K. pneumoniae*. Foi correlacionado com aminoácidos das proteínas PotF de *E. coli* que atuam no transporte de putrescina.

Organismo	Proteína	Molécula	Aminoácidos com interação			
ECO	PotF	PUT	S ³⁸	E ¹⁸⁵	D ²⁴⁷	Y ³¹⁴
		SPD	-	E ¹⁵⁹	-	-
KPN	PotF	PUT	-	E ¹⁵⁹	-	-
		CYS	S ¹²	E ¹⁵⁹	D ²²¹	Y ²⁸⁸

A PotF de KPN é apresentada como um duplo transportador (Cremonesi, 2021), por obter interação com espermidina e putrescina. No *docking* molecular, aminoácidos foram caracterizados na possível interação no transporte. Em PotF de KPN foram visualizados os aminoácidos D³⁷, E⁴⁰, S⁶¹ e L³²² interagindo com a molécula Cistamina (Tabela 5).

No geral, não foi encontrado na literatura estudos que mencionem a atuação dos aminoácidos excedentes no transporte de taurina (Tabela 3), espermidina (Tabela 4) e putrescina (Tabela 5). As análises realizadas neste trabalho são feitas de forma preditiva, os dados obtidos podem ser explorados no futuro em pesquisas voltadas a antagonistas da taurina.

CONCLUSÃO

Por meio das análises realizadas, certamente há um padrão na organização dos genes dos transportadores na forma de óperon visualizados pelo Kegg. As proteínas identificadas apresentam padrões característicos dos transportadores ABC, o que permitiu classificá-las em permeases, ATPases e SBPs. Com base nas energias livres negativas dos *dockings* realizados, é possível sugerir que a PotD de *A. baumannii* é ligadora de espermidina, bem como a PotD de *K. pneumoniae*. Enquanto na PotF de *K. pneumoniae* sugere-se a ligação com putrescina. Para TauA de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* é sugerido que o transporte seja realizado por taurina. Moléculas como GABA e Vigabatrina apresentaram uma potencial interação com



TauA de KPN e TauA de ACB. A molécula de cistamina apresentou um potencial interação com as proteínas PotD e PotF de KPN e PotD de ACB.

REFERÊNCIAS

ALAM, A.; LOCHER, K. P. Structure and Mechanism of Human ABC Transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 52, p. 275-300, 2023.

ALTMAN, R. B. A curriculum for bioinformatics: the time is ripe. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 14, n. 7, p. 549–550, 1998.

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.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019.

ARAÚJO, F. T., BOLANOS-GARCIA, V. M., PEREIRA, C. T., SANCHES, M., OSHIRO, E. E., FERREIRA, R. C. C., CHIGARDZE, D. Y., BARBOSA, J. A. G., FERREIRA, L. C. S., BENEDETTI, C. E., BLUNDELL, T. L., BALAN, A. Structural and physiological analyses of the alkanesulphonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen *Xanthomonas citri*. Brasília: **PLoS One**. v. 8, p. 1-14, 2013.

BARTAL, C. ; ROLSTON, K. VI; NESHER, L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: colonization, infection and current treatment options. **Infectious diseases and therapy**, v. 11, n. 2, p. 683-694, 2022.

BERNTSSON, R. P., SMITS, S. H. J., SCHMITT, L., SLOTBOOM, D., POOLMAN, B. Structural classification of substrate-binding proteins. **Düsseldorf: FEBS Letters**, v. 584, p. 2606-2617, 2010.

BURNS, M. R. et al. Amino acid/spermine conjugates: polyamine amides as potent spermidine uptake inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 22, p. 3632-3644, 2001.

Cremonesi, A.S.; De la Torre, L.I.; Degenhardt, M.F.S.; Muniz, G.S.V.; Lamy, V.T.; Oliveira, C.L.P. BALAN, A. The citrus plant pathogen *Xanthomonas citri* has a dual polyamine-binding protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 28, p. 1-12, 2021.

DELANO, W. L. et al. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsl. Protein Crystallogr**, v. 40, n. 1, p. 82-92, 2002..

DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 23-27, 2010.

GUEDES, I. A. et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 3198, 2021.



- GUNA, A.; HEDGE, R. S. Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control. **Current Biology Review**, v.28, 2018.
- HOET, P. H. et al. Kinetics and cellular localisation of putrescine uptake in human lung tissue. **Thorax**, v. 48, n. 12, p. 1235-1241, 1993.
- IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 271, n. 3, p. 559-564, 2000.
- JONES, P. M.; GEORGE, A. M. Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 48, n. 1, p. 39-50, 2013.
- KROGH, A. et al. 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.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- LETUNIC I., SUPRIYA K., PEER B. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 49, 2021. < doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937> >
- MACHADO, K. S., SCHROEDER, E. K., RUIZ, D. D., COHEN, E. M., & DE SOUZA, O. N. FReDoWS: a method to automate molecular docking simulations with explicit receptor flexibility and snapshots selection. **In BMC genomics** Vol. 12, No. 4, p. 1-13p, 2011.
- MACHADO, O. Um estudo comparativo de algoritmos de agrupamento de dados para dados de docagem molecular. 2014.
- MARIANI, V. et al. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2722-2728, 2013.
- MIRDITA, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature methods**, v. 19, n. 6, p. 679-682, 2022.
- NISHIKAWA, M., SHEN, L., & OGAWA, K. Taurine dioxygenase (tauD)-independent taurine assimilation in *Escherichia coli*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 164, n. 11, p. 1446-1456, 2018. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000723>
- PEREIRA, C. T. Estudos funcionais e estruturais sobre o transportador do tipo ABC de sulfato em *Xanthomonas citri*. 2017. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2017.
- RASMUSSEN, R. N. et al. Interaction of GABA-mimetics with the taurine transporter (TauT, Slc6a6) in hyperosmotic treated Caco-2, LLC-PK1 and rat renal SKPT cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 138-146, 2016



RIBEIRO, E. C. R.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; DE SOUSA, Georgette Carnib.
Superbactéria: Os principais mecanismos e medicamentos de resistência bacteriana.
REVISTA DA FAESF, v. 6, n. 3, 2023.

SILVA, K.M.; FIGUEIREDO, N.G.; CREMONESI, A.S. Use of Bioinformatics Techniques in the Characterization of Genes and Proteins Involved in the Transport of Polyamines from *Staphylococcus* Genus. **JSM Bioinformatics, Genomics and Proteomics**, v. 6(1), 2023.

STOJOWSKA-SWĘDRZYŃSKA, K. et al. Antibiotic heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 449, 2021.

TAYLOR, W. R. The classification of amino acid conservation. **Journal of theoretical Biology**, v. 119, n. 2, p. 205-218, 1986.

VAN DER PLOEG, J. R. et al. Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the tauABCD operon and other sulfate starvation-inducible genes in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 24, p. 7671-7678, 1997.

VIEIRA, P. B.; PICOLI, S. U. Acinetobacter Baumannii multirresistente: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19., p. 151-6, 2015.

VON HEIJNE, G. The signal peptide. **The Journal of membrane biology**, v. 115, p. 195-201, 1990.

QU, F., ELOMARI, K., WAGNER, A., DE SIMONE, A., & BEIS, K. Desolvation of the substrate-binding protein TauA dictates ligand specificity for the alkanesulfonate ABC importer TauABC. **The Biochemical journal**, v. 476, n. 23, p. 3649–3660, 2019.

WISHART, D. S., FEUNANG, Y. D., GUO, A. C., LO, E. J., MARCU, A., GRANT, J. R., SAJED, T., JOHNSON, D., LI, C., SAYEEDA, Z., ASSEMPOUR, N., IYNKKARAN, I., LIU, Y., MACIEJEWSKI, A., GALE, N., WILSON, A., CHIN, L., CUMMINGS, R., LE, D., PON, A., ... WILSON, M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic acids research**. v. 46, e. 1, p. D1074-D1082, 2018.

