

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DAS VIAS DE REDUÇÃO DE NITRATO EM
CORYNEBACTERIUM PEUDOTUBERCULOSIS BIOVAR EQUI**



ORIENTADO: **Carlos Augusto Almeida Diniz**

ORIENTADORA: **Dra. Sintia Silva de Almeida**

CO-ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

BELO HORIZONTE

Outubro 2014

CARLOS AUGUSTO ALMEIDA DINIZ

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DAS VIAS DE REDUÇÃO DE NITRATO EM
CORYNEBACTERIUM PEUDOTUBERCULOSIS BIOVAR EQUI**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Dra. Sintia Almeida

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

BELO HORIZONTE

Outubro 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me abençoar, guiar meus passos e me amar infinitamente. Muito obrigado Deus por tudo!

A todos meus mentores espirituais que sempre estiveram presentes guiando meus passos , me iluminando e renovando minhas forças.

A minha mãe, por sempre estar presente e me amar incondicionalmente, sendo dela o maior amor já recebido por mim. Te amo muito mãe, muito obrigado por tudo!

A todos os meus amigos e familiares, que sempre me apoiaram quando eu mais precisava. Muito obrigado, meus queridos!

A minha avó querida que tanto amo, um anjo iluminado que Deus me deu de presente. Te amo muito vó, sempre e para sempre!

A minha irmã que apesar de longe, está também sempre presente. Te amo! Ah... e claro, ao meu sobrinho mais lindo do mundo que eu amo incondicionalmente!!!

Ao Professor Vasco, que é como se fosse um pai para todos nós, inclusive para mim, sendo que o mesmo, além de ser uma das pessoas mais inteligentes e inovadoras que tive o prazer de conhecer e trabalhar, é também, sem dúvida, um grande ser humano com um coração gigante. Muito obrigado por tudo, Professor Vasco, sem você nada disso seria possível. Obrigado por acreditar em mim e por todo o seu carinho. Te levo dentro do meu coração como um grande pai, amigo e professor.

A minha orientadora Síntia, seu Marido Vinícius e a nova integrante da família, que sejam muito abençoados cada dia mais.

A todos os meus amigos do LGCM que sempre me apoiaram e ajudaram, sendo uma família para mim. Muito obrigado, meus amigos, amo muito vocês. (Não vou citar nomes, já que são muitos, mas sei que vocês sabem quem são e que é verdadeiro o sentimento. Amo demais. Saudades sem fim.

Os meus queridos amigos de infância Claudinho e Silvia, meus amores, irmãos, companheiros de todos as horas. Amo muito vocês! Muito obrigado por sempre fazer dos meus dias, dias mais felizes e encantados. Não sei o que seria de mim sem vocês!!! Amor eterno!

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE QUADROS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>.....	2
1.1.1. Linfangite Ulcerativa	3
1.1.2. Propriedades bioquímicas	4
1.1.3. Determinantes de virulência.....	5
1.1.4. Projeto Genoma de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	6
1.2. Redução do Nitrato	7
1.2.1. Desnitrificação	8
1.2.1.1. Nitrato redutase respiratória ligada à membrana NarGHI	9
1.2.1.2. Nitrato redutase periplasmática.....	15
1.2.1.3. Nitrito redutases.....	16
1.2.1.4. Óxido nítrico redutase	17
1.2.1.5. Óxido nitroso redutase	19
1.2.2. Redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA)	20
1.2.3. Respiração de nitrato e virulência.....	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Análises <i>in silico</i>	25
3.1.1. Dados genômicos do resequenciamento das linhagens 31 e 258 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	25
3.1.2. Identificação <i>in silico</i> da Nitrato Redutase	25

3.1.3. Predição das vias metabólicas e enzimas envolvidas na cadeia respiratória, redução de nitrato	26
3.1.4. Análise de similaridade.....	27
3.1.5. Análise dos domínios proteicos e das famílias das proteínas estudadas	27
3.1.6. Alinhamento Múltiplo de Sequências	27
3.1.6.1. Coleta de dados biológicos	27
3.1.6.2. Clustal W.....	29
3.1.6.3. Edição do alinhamento e análise de similaridade.....	30
3.2. Análises <i>in vitro</i>	30
3.2.1. Obtenção das amostras	30
3.2.1.1. Linhagens bacterianas e condições de cultivo	30
3.2.2. Avaliação fenotípica das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i>	32
3.2.2.1. Prova de redução de Nitrato	32
3.2.3. Avaliação genotípica das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i>	33
3.2.3.1. Extração do DNA	33
3.2.3.2. Eletroforese em Gel de Agarose	33
3.2.3.3. Primer design.....	34
3.2.3.4. PCR.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
Parte I – Análises <i>in silico</i> para identificação da cadeia respiratória de <i>C. pseudotuberculosis</i>	36
4.1. Identificação e caracterização do operon nar de <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi através de análises <i>in silico</i>.....	36
4.1.1. Alinhamento múltiplo	36
4.1.2. Confirmação <i>in silico</i> do operon	38
4.1.3. Caracterização e análises <i>in silico</i> do metabolismo respiratório de <i>C. pseudotuberculosis</i> usando como modelo a via respiratória da nitrato redutase	39
4.1.4. Nitrato redutase respiratória ligada à membrana de <i>C. pseudotuberculosis</i>	39
4.1.4.1 NarG.....	39
4.1.4. 2. NarH.....	48
4.1.4.3. NarI	55
4.1.4. 4. NarJ.....	62
4.1.4.5. Transportadores de nitrato e nitrito	65
4.1.5. Nitrito redutase	77
4.1.4.6. Nitrito redutase NrfAH	77
4.1.4.6.1. NrfA.....	77
4.1.4.6.2. NrfH.....	84
4.1.4.7. Nitrito redutase dependente de cobre NirK.....	90
4.1.4.8. Óxido nítrico redutase	101
4.1.5. Proposta da via de redução de nitrato através de abordagens <i>in silico</i>	113
4.1.6. Comparação entre os genes, as enzimas e as vias presentes nas linhagens Equi e Ovis	114

PARTE II – ANÁLISE *IN VITRO* PARA IDENTIFICAÇÃO DA VIA RESPIRATÓRIA DE REDUÇÃO DE NITRATO EM *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* BIOVAR EQUI . 116

4.2. Teste fenotípico para confirmar a capacidade de redução de nitrato em <i>C. pseudotuberculosis</i>	116
4.3. Teste genotípico para confirmar a presença dos genes envolvidos na redução de nitrato em <i>C. pseudotuberculosis</i>	117
5. CONCLUSÕES.....	118
6. PERSPECTIVAS	119
7. REFERÊNCIAS	120
ANEXOS.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de desnitrificação.....	9
Figura 2: Nitrato redutase respiratória ligada à membrana.....	10
Figura 3: Modelo hipotético para o papel do óxido nítrico em macrófagos humanos infectados por micobactérias.....	14
Figura 4: Organização das proteínas da via dissimilatória de nitrato	16
Figura 5: Modelo de sistemas nfr respiratórios. 21	
Figura 6: Arquivo de entrada para alinhamento múltiplo no clustalw.....	29
Figura 7: Esquema de reações de duas etapas consecutivas no processo de análise dos resultados quanto à capacidade de redução de nitrato pelas linhagens estudadas.	32
Figura 8: Organização dos genes associados à redução de nitrato entre as linhagens utilizadas para o alinhamento múltiplo.	36
Figura 9: Organização gênica do operon <i>narkghji</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> 31	37
Figura 10: Operon <i>narkghji</i> de <i>C. Pseudotuberculosis</i> ,.....	38
Figura 11: Subunidade NarG de <i>E. coli</i>	40
Figura 12: Domínios protéicos conservados de NarG de <i>C. pseudotuberculosis</i>	41
Figura 13: Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarG.....	43
Figura 14: Aglomerados de ferro-enxofre presentes na estrutura de NarH de <i>E. coli</i> .:	49
Figura 15: Domínios protéicos conservados em NarH de <i>C. pseudotuberculosis</i>	51
Figura 16: Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarH.	52
Figura 17: Grupamentos heme presentes na estrutura de NarI de <i>E. coli</i>	55
Figura 18: Predição de hélices transmembrânicas da proteína NarI de <i>C. pseudotuberculosis</i> ,.....	56
Figura 19: Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarI.....	59
Figura 20: Domínios protéicos conservados em NarI de <i>C. pseudotuberculosis</i>	62
Figura 21: Domínios protéicos conservados de narJ de <i>C. pseudotuberculosis</i>	64
Figura 22: Sítio de ligação ao substrato na estrutura de NarK de <i>E. coli</i>	66
Figura 23: Posição relativa dos genes envolvidos na redução de nitrato em <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi.	66

Figura 24: Domínios protéicos conservados em NarK de <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi.,	71
Figura 25: Domínios protéicos conservados em nart de <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi.,	71
Figura 26: Predição de hélices transmembrânicas da proteína NarK de <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi.	72
Figura 27: Predição de localização subcelular de porções da proteína nart de <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi.	72
Figura 28: Alinhamento múltiplo entre as proteínas NarK e NarT.	73
Figura 29: Domínios protéicos conservados de NrfA de <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi.	79
Figura 30: Alinhamento múltiplo entre as proteínas NrfA.....	81
Figura 31: Domínios protéicos conservados em NrfH de <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi.,	85
Figura 32: Predição de hélices transmembrânicas em NrfH de <i>C. pseudotuberculosis</i>	87
Figura 33: Alinhamento múltiplo entre as proteínas nrfh.....	89
Figura 34: Coordenação dos átomos de cobre na estrutura de CuNIR de <i>G. kaustophilus</i> 90	
Figura 35: Domínios proteicos conservados em CuNIR de <i>C. pseudotuberculosis</i>	94
Figura 36: Predição de hélices transmembrânicas em CuNIR de <i>C. pseudotuberculosis</i> ...	94
Figura 37: Região N-terminal de baixa cobertura em CuNIR de <i>C. pseudotuberculosis</i>	96
Figura 38: Disposição dos centros metal e redox de qNOR de <i>G. stearothermophilus</i>	101
Figura 39: Estrutura do centro binuclear em qNOR de <i>G. stearothermophilus</i>	102
Figura 40: Disposição do íon de cálcio em qnor de <i>G. stearothermophilus</i>	103
Figura 41: Domínios proteicos conservados em qNOR de <i>C. pseudotuberculosis</i>	105
Figura 42: Predição dos domínios transmembrânicos em qNOR de <i>C. pseudotuberculosis</i>	106
Figura 43: Alinhamento múltiplo entre as proteínas qNOR	107
Figura 44: Proposta da via de redução de nitrato em <i>C. pseudotuberculosis</i> biovar Equi.	113
Figura 45: Análise comparativa das vias de desnitrificação e amonificação entre as linhagens <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 e 31	115

Figura 46: Gel de agarose 1% contendo o resultado da pcr efetuada para confirmação molecular do operon nar nas linhagens 258, 162, 5297 e 106/a.117

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Espécies utilizadas no alinhamento múltiplo de sequências.	28
Quadro 2: Correlação entre as propriedades físico-químicas dos resíduos e as cores utilizadas no alinhamento múltiplo de sequências.	30
Quadro 3: Linhagens utilizadas nas análises fenotípicas e genotípicas referentes à atividade da nitrato redutase.....	31
Quadro 4: Primers e seus respectivos genes utilizados neste trabalho.	34
Quadro 5: Resultados da busca por sequências similares à <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem 31.	41
Quadro 6: Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NarG de <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>E. coli</i> utilizadas no alinhamento múltiplo.....	47
Quadro 7: Resultados da busca por sequências similares à linhagem 31.	50
Quadro 8: Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NarH de <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>E. coli</i> utilizadas no alinhamento múltiplo.	54
Quadro 9: Resultados da busca por sequências similares à <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem 31	57
Quadro 10: Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas narI de <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>E. coli</i> utilizadas no alinhamento múltiplo.	61
Quadro 11: Resultados da busca por sequências similares à NarJ de <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem 31	63
Quadro 12: Resultados da busca por sequências similares à NarK de <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem 31	68
Quadro 13: Resultados da busca por sequências similares à NarT de <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem 31	70
Quadro 14: Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NarK de <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>E. coli</i> utilizadas no alinhamento múltiplo.	76
Quadro 15: Resultados da busca por sequências similares à NrfA nitrito redutase de <i>C. pseudotuberculosis</i> que catalisa a redução de nitrito a amônio.	78
Quadro 16: Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NrfA de <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>W. succinogenes</i> utilizadas no alinhamento múltiplo.	83
Quadro 17: Resultados da busca por sequências similares à NrfH de <i>C. pseudotuberculosis</i> 31	85

Quadro 18: Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NrfH de <i>D. vulgaris</i> e de <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizadas no alinhamento múltiplo.....	88
Quadro 19: Resultados da busca por sequências similares à nitrito redutase dependente de cobre CuNIR de <i>C. pseudotuberculosis</i>	93
Quadro 20: Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas CuNIR de <i>G. kaustophilus</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizadas no alinhamento múltiplo	99
Quadro 21: Resultados da busca por sequências similares à óxido nítrico redutase dependente de quinol qNOR de <i>C. pseudotuberculosis</i>	104
Quadro 22: Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas qNOR de <i>G. stearotherphilus</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizadas no alinhamento múltiplo.	111
Quadro 23: Resultado do teste bioquímico para avaliar a capacidade redução de nitrato .	116

LISTA DE ABREVIATURAS

ArnR	Aerobic repressor of nitrate reductase
ATP	Trifosfato de Adenosina
Az	Azurinas
BHI	Infusão Cérebro-Coração
CDS	Sequências codificadoras
CMNR	<i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia e Rhodococcus.</i>
cNIR	Citocromo cd1 Nitrito Redutase
cNOR	Óxido nítrico redutase dependente de citocromo c
cuNIR	Nitrito redutase dependente de cobre
DNRA	Redução Dissimilatória De Nitrato Amônio
EDTA	Etileno diamino tetra-acetato dissódio
EMBL	Europe Molecular Biology Laboratory
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
FeMo	Ferro-Molibdênio
FP	Flovo proteína
HCOs	Heme/cobre oxidases
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutiva
KCL	Cloreto de potássio
KNO₃	Nitrato de potássio
LC	Linfadenite caseosa
LGCM	Laboratório de Genética Celular e Molecular
LU	Linfagite Ulcerativa
MFS	Superfamília dos Facilitadores Principais
MDH	Malato desidrogenase
MGD	Molibdopterina guanina dinucleotídeo
MK	Menoquinona
Mo	Átomo de molibdênio
Mo-bisMGD	Cofator Molibdopterina Dinucleotídeo
MOCO	Molibdênio cofator
MQO	Malato: quinona oxidoreductase
NaCL	Cloreto de sódio
NAP	Nitrato redutase periplasmática
NAR	Nitrato redutase respiratória
NAS	Nitrato redutase assimilatória
NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>

NH₄⁺	Amônio
N₂	Nitrogênio gasoso
NO	Óxido nítrico
NO₃⁻	Nitrato
NO₂⁻	Nitrito
NOR	Óxido nítrico redutase
NosZ	Óxido Nitroso Redutase
NrfA	Citocromo C Nitrito Redutase
NrfAH	Nitrito redutase geradora de amônio
PAZ	Pseudoazurinas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
QFR	Quinol: Fumato Redutase
qNOR	Óxido Nítrico Redutase dependente de quinol
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
SQO	Succinato: quinona oxidoreductase
SQR	Succinato: quinona redutase
μl	Microlitro

RESUMO

Tecnologias de sequenciamento de nova geração têm o potencial para decifrar a diversidade genômica a um custo moderado. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é um parasita intracelular facultativo, responsável por causar enfermidades infecto-contagiosas de caráter crônico. A doença se apresenta de diferentes formas, de acordo com o hospedeiro acometido. Linhagens de *C. pseudotuberculosis* mostram alta adaptabilidade para diversos nichos ecológicos e são capazes de crescer em algumas fontes de carbono, bem como existem linhagens capazes de realizar a redução de nitrato. O objetivo deste trabalho é analisar e propor a via de redução de nitrato de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi e identificar as enzimas que constituem a cadeia de transporte de elétrons através de análises *in silico*. Foram analisados 15 genomas completos de *C. pseudotuberculosis*, para identificação *in silico* da cadeia respiratória e da via de redução de nitrato. Genes constituintes destas vias foram identificados. Validação experimental foi realizada por fenotipagem e PCR. Com este trabalho inédito para a espécie pretende-se utilizar a genômica comparativa e validação experimental para tentar entender e caracterizar via metabólicas associadas a respiração ainda não conhecidas em *C. pseudotuberculosis*. Para se adaptar a uma ampla variedade de condições de crescimento e estresse ambiental, as bactérias possuem sistemas respiratórios modulares que as permitem aperfeiçoar a produção de energia em ambientes variáveis e que podem ser hostis. A composição do sistema respiratório é ajustada de acordo com condições específicas em que se encontram, por meio de uma complexa rede de regulação que as permitem sobreviver e prosperar em um determinado ambiente, tais como compartimentos intracelulares fagossomais de macrófagos humanos. Uma maior compreensão do metabolismo respiratório de *C. pseudotuberculosis* será de grande importância para o discernimento das interações patógeno-hospedeiro e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, redução de nitrato, respiração, adaptação, genômica comparativa.

ABSTRACT

Technologies for sequencing new generation have the potential to decode the genomic diversity at a moderate cost. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a facultative intracellular parasite, responsible for causing chronic infect-contagious illnesses. The disease presents itself in different ways, in accordance with the affected host. Lineages of *C. pseudotuberculosis* show high adaptability to different ecological niches and are able to grow in some carbon sources, besides the fact that some specific lineages are capable of achieving the nitrate reduction. The objective of this study is to analyze and propose the route of nitrite reduction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi and to identify the enzymes that constitute the electron transport chain, through analysis *in silico*. A total of 15 complete genomes of *C. pseudotuberculosis* were analyzed, in order to identify the respiratory chain and the route of nitrate reduction *in silico*. Constituent genes of these routes have been identified. Experimental validation was performed through phenotyping and PCR. With this yet unpublished work for the species, comparative genomics and experimental validation are intended to be used, in order to try to understand and characterize metabolic routes associated with breathing still not known in *C. pseudotuberculosis*. To adapt to a wide range of growing conditions and environmental stress, bacteria have modular respiratory systems that allow them to improve energy production in variable environments, which can be hostile. The respiratory system composition is adjusted according to specific conditions in which they find themselves, by means of a complex network of regulation that allow them to survive and thrive in a particular environment, such as fagosomes intracellular compartments of human macrophages. A greater understanding of the respiratory metabolism of *C. pseudotuberculosis* will be of great importance to perceive the interactions between pathogen and host and for the development of therapeutic strategies in the future.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, reduction of nitrate, respiration, adaptation, comparative genomics.

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este manuscrito apresenta, em sua primeira seção, uma revisão de literatura abordando três assuntos principais: (i) *Corynebacterium pseudotuberculosis*, características da bactéria e da doença causada; (ii) propriedades bioquímicas do organismo, determinantes de virulência e os dados genômicos disponíveis utilizados para a identificação dos genes envolvidos nas vias de redução de nitrato e da cadeia respiratória de *C. pseudotuberculosis*; (iii) a respiração por nitrato e sua associação com a virulência. Em seguida, encontram-se os objetivos do trabalho e a metodologia utilizada para seu desenvolvimento. A seguir, os resultados obtidos e a discussão dos mesmos são apresentados em 2 partes: (i) análises *in silico* para identificação das vias de redução de nitrato e da cadeia respiratória de *C. pseudotuberculosis* e (ii) análises *in vitro* para identificação da via respiratória de redução de nitrato em *C. pseudotuberculosis* biovar Equi. Por fim, as conclusões e as perspectivas do presente trabalho serão demonstradas, seguindo-se as Referências Bibliográficas e Anexos.

1 INTRODUÇÃO

1.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis* é um dos representantes do filo *Actinobacteria*. O gênero *Corynebacterium*, juntamente com outros gêneros deste filo (*Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*) compõe o grupo CMNR. Este é representado por bactérias Gram positivas, com alto conteúdo G+C em seus genomas e que possuem uma camada externa de ácidos micólicos na parede celular. Além disso, os organismos deste grupo são de grande importância médica, veterinária e biotecnológica (Songer, 2005; Dorella et al., 2006a).

C. pseudotuberculosis, é parasita intracelular facultativo, responsável por causar enfermidades infecto-contagiosas de caráter crônico. A doença se apresenta de diferentes formas, de acordo com o hospedeiro acometido, podendo ser: linfadenite caseosa (LC) em caprinos e ovinos (Ayers, 1977; Brown et al., 1986; Doherr et al., 1998; Piontkowski & Shivvers, 1998); linfangite ulcerativa em equinos, bovinos e búfalos (Baird et al., 2004; Baird & Fontaine, 2007) e em humanos, a linfadenite subaguda e crônica (Peel et al., 1997; Selim, 2001; Songer et al., 1988). O conteúdo dos abscessos é rico em material caseoso ou purulento e contém células viáveis de *C. pseudotuberculosis* que podem infectar diretamente outros animais, ou ainda permanecer viáveis no solo, água e alimentos, por até dois anos (Nairn & Robertson, 1974).

Este organismo possui dois biovars denominados Ovis e Equi, que são classicamente definidos pela capacidade de conversão do nitrato para nitrito em provas bioquímicas (Batey et al., 1986; Songer et al., 1988). As linhagens que infectam principalmente equinos (biovar Equi) são redutoras de nitrato a nitrito e as linhagens que infectam caprinos e ovinos (biovar Ovis) são nitrato-negativas (Batey, 1986a; Batey, 1986b; Batey et al., 1986). Os bovinos podem ser infectados pelos dois biovars, com predomínio do biovar Equi. Dada a bordagem deste trabalho sobre a cadeia respiratória da enzima nitrato redutase, será dado enfoque aos organismos pertencentes ao biovar Equi.

1.1.1. Linfangite Ulcerativa

Linfagite ulcerativa (LU) é uma doença mundialmente distribuída, e afeta sobretudo equinos, mas que pode atingir bovinos (Radostets et al., 2000). Ela é considerada moderadamente contagiosa e o índice de mortalidade é baixo.

Mais de um agente infeccioso já foi registrado, sendo que *C. pseudotuberculosis* biovar Equi é o mais comum, dito como causador da doença clássica (Singathia et al., 2011). Outros microrganismos reportados como causadores da doença são: *C. pyogenes*, *C. equi*, *Mannheimia haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium necrophorum* e *Streptococcus* spp. (Zavoshti et al., 2009).

A doença é caracterizada pela infecção dos vasos linfáticos dos membros inferiores, a partir de uma ferida na pele, e pelo desenvolvimento de abscessos ao longo do corpo (Radostets et al., 2000). Abscessos no peito e pescoço de equinos também já foram relatados, assim como letargia, anorexia, úlceras em diversas partes do corpo e perda de peso (Singathia et al., 2011).

Doherr et al., (1998) realizaram estudos epidemiológicos sobre doenças em equinos causadas por *C. pseudotuberculosis*, e concluíram que a infecção não está relacionada com sexo ou acasalamento. Mas observaram que o ambiente, no qual os animais vivem, a estação do ano e a idade exercem influência na contaminação pela bactéria. Segundo os autores, logo após o nascimento os animais estão protegidos pelo sistema imune recebido pela mãe, e quando atingem um ano de vida, sua suscetibilidade a doença aumenta, o que permanece alta até os cinco anos de idade. Após este período, o risco diminui novamente. Outra possível explicação para a relação entre idade e suscetibilidade à doença pode estar vinculado a outros elementos, como a permanência dos animais em ambientes com um baixo ou elevado fator de risco, ou seja, locais com higiene precária, com a presença de animais contaminados, ou mesmo, na presença de possíveis vetores (Doherr et al., 1998).

Diferentes autores sugerem que vetores estejam envolvidos com a transmissão de doenças como a LU e PF, entre outras doenças causadas por *C. pseudotuberculosis* (Hall et al., 2001; Selim, 2001; Spier et al., 2004). Segundo uma avaliação preliminar realizada por Spier e colaboradores (2004) os padrões sazonais de maior incidência de sintomas, como abscessos, das enfermidades supracitadas coincidem com a presença de PLD na mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*), na mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e na mosca doméstica (*Musca domestica*), o que indica estes insetos como possíveis vetores. Os

resultados obtidos pelos autores sugerem que a bactéria é adquirida pelas moscas através do contato direto dessas com a secreção purulenta de abscessos dos equinos.

As moscas são possíveis vetores, mas não são consideradas reservatórios da bactéria (Spier et al., 2004). Estudos revelaram que linhagens de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi são capazes de sobreviverem e multiplicarem em diferentes tipos de solo (arenoso e rochoso), sob diferentes condições ambientais, o que insinua o papel do solo como reservatório (Spier et al., 2012).

Muitas pesquisas já foram realizadas com o intuito de melhor compreender a doença, além do hospedeiro e o patógeno vinculados a ela, mas muito ainda precisa ser estudado para entender estas e outras relações. Muitos desses estudos envolvem genes específicos, conhecidos como fatores de virulência.

1.1.2. Propriedades bioquímicas

As reações bioquímicas de isolados de *C. pseudotuberculosis* variam consideravelmente, principalmente quanto às suas habilidades de fermentação. Todas as linhagens produzem ácido, mas não gás, a partir de muitas fontes de carbono, incluindo glicose, manose, frutose, galactose, e sacarose (Merchant e Packer, 1967; Buxton e Fraser, 1977; Holt *et al.*, 1994). A bactéria é fosfolipase D e catalase positiva, oxidase negativa e beta-hemolítica (Buxton e Fraser, 1977; Anderson *et al.*, 2004).

Nos primeiros estudos com *C. pseudotuberculosis*, Biberstein et al (1971) identificaram dois biótipos baseados na diferença da capacidade de produzir a enzima nitrato-redutase, que permite a redução do nitrato para nitrito. Os organismos capazes de reduzir nitrato (nitrato-positivo), foram isolados a partir de equinos e bovinos, enquanto que os que não possuíam tal capacidade de redução de nitrato (nitrato-negativo) foram isolados a partir de ovelhas, cabras e bovinos (Biberstein et al., 1971). Subsequentemente, a caracterização bioquímica e a análise de restrição do DNA cromossomal de *C. pseudotuberculosis* utilizando a técnica de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) demonstrou que a diferença na capacidade de reduzir nitrato coincidia com os diferentes padrões de restrição, e o termos “biovar Equi” (linhagem nitrato-positivo) e “biovar Ovis” (linhagem nitrato-negativo), foram propostos (Songer et al., 1988). Posteriormente, outros estudos foram realizados e confirmaram a existência desses dois biovares através de análises RFLP do 16S-rDNA (Vanechoutte et al., 1995; Sutherland et al., 1996; Costa et al., 1998) e por eletroforese em gel submetido a corrente em campo pulsátil (PFGE; Pulse Field Gel Electrophoresis) (Connor et al., 2000). Riegel et al (1995) através da técnica de hibridização de ácidos nucleicos, sugeriram que os biovares equi e

ovis de *C. pseudotuberculosis* não deveriam ser classificados como subespécies, devido a sua grande similaridade genômica.

1.1.3. Determinantes de virulência

Fatores de virulência estão envolvidos nos processos de adesão, invasão, adaptação e dispersão do patógeno no hospedeiro. Os genes, que exercem estas funções, são induzidos durante a infecção, e o mecanismo que os ativam ou reprimem estão muitas vezes atrelados ao ambiente exposto ao patógeno (Schumann, 2007).

Patógenos intracelulares são expostos a condições extremas durante infecções, e para sobreviverem necessitam de mecanismos que impeçam o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, e ao mesmo tempo permitam sua proliferação e permanência no ambiente hostil. Caso o resultado desta interação seja a sobrevivência do patógeno, essa evasão por parte do microrganismo acaba por provocar a doença no organismo infectado (Jin et al., 2010; Raybourne and Bunning, 1994). De acordo com estes autores, apenas uma pequena fração sobrevive nas fases iniciais da infecção, e essa corresponde àquelas bactérias que demonstraram adaptações que permitiram a sobrevivência, por exemplo, dentro dos macrófagos. Estes fazem parte do sistema fagocitário mononuclear, sendo responsável por proteger o organismo contra agentes infecciosos.

Os determinantes moleculares de virulência de *C. pseudotuberculosis* são pouco conhecidos, assim como suas ações sobre o controle da expressão gênica (Dorella et al., 2006a; McKean et al., 2007), e por isso estudos nesta área são importantes para melhor caracterização e entendimento desses fatores essenciais para a disseminação de doenças. Estudos anteriores demonstraram que a fosfolipase D, lipídeos da parede celular e o operon *fagABC* e o gene *fagD* são importantes determinantes de virulência em *C. pseudotuberculosis* (Billington et al., 2002; Carne et al., 1956; Wilson et al., 1995; Pinto, 2011). Outros fatores importantes que contribuem para a patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* são: (i) genes envolvidos na sobrevivência do patógeno na célula do hospedeiro, que pode ficar incubado por longos períodos, sem que seja detectado pelo sistema imune, (ii) produtos gênicos exportados, como as fimbrias, pili (fatores de adesão e colonização) e invasinas.

1.1.4. Projeto Genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Devido a sua grande importância na sanidade animal, diversas linhagens de *C. pseudotuberculosis* tiveram os seus genomas completamente sequenciados e depositados no NCBI, totalizando até agora 15 linhagens com genomas completos depositados no genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sendo 9 do biovar ovis e 6 do biovar Equi, e mais aproximadamente 20 genomas em fase de seuquenciamento e/ou montagem pelo nosso grupo.

Apesar da distinção entre os dois biovares em relação redução de nitrato, até o momento não havia sido encontrado nenhum dos genes responsáveis pela codificação de nenhuma das enzimas nitrato-redutases conhecidas, conseqüentemente, a identidade destes genes e os seus mecanismos genéticos, moleculares e bioquímicos referentes a este processo metabólico permaneciam ainda incompreendidos.

O estudo da enzima Nitrato Redutase associada à membrana a qual atua na respiração anaeróbica, pode estar associada a virulência de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi, proporcionando um via de produção de energia quando a mesma se encontra em ambientes desprovidos de oxigênio, permitindo a persistência do patógeno em seu hospedeiro. Dessa forma o entendimento desse mecanismo irá auxiliar na identificação de potentes alvos tanto para o desenvolvimento de vacinas mais efetivas, tratamento, como também para a realização de diagnósticos mais acurados.

Recentemente, o resequenciamento da linhagem 31 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pertencente ao biovar Equi, isolada a partir de um Búfalo do Egito (Silva et al., 2012), Romel et al (2013) identificaram uma região adicional em que estão incluídos um Corinefago e um operon referente a nitrato redutase, que também estão presentes no genoma de *Corynebacterium diphtheriae* e estão ausentes no genoma depositado no NCBI.

Neste contexto, foi possível evidenciar que as metodologias de seqüenciamento empregadas nos genomas das linhagens pertencentes ao biovar Equi não foi capaz de elucidar as bases genéticas responsáveis pela redução de nitrato neste biovar, apesar da disponibilidade de dados genômicos de 6 linhagens de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi depositados no NCBI. Nós esperamos que a partir dos dados gerados pelo resequenciamento da linhagem 31 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* que teve modificações no seu protocolo de re-sequenciamento seja possível identificar tais genes e a partir dessa informação seja possível idenificar esta região nas demais linhagens do mesmo biovar.

1.2. Redução do Nitrato

Nitrato é um dos componentes essenciais da biosfera terrestre. Além de servir como nutriente para as plantas e micro-organismos, é utilizado como acceptor de elétrons por muitas bactérias e arqueobactérias. Devido à ampla distribuição e padrões filogenéticos das enzimas envolvidas, tem-se argumentado que a respiração por nitrato já era um processo comum em microrganismos, anterior ao desenvolvimento da respiração de oxigênio gerado pelo aumento da concentração do mesmo na atmosfera terrestre. Neste contexto, vários processos microbianos utilizam nitrato, tais como a desnitrificação e a redução dissimilatória de nitrato a amônio. Tais vias respiratórias, juntamente com outras vias interconectadas constituem o ciclo de nitrogênio. Neste ciclo, o nitrogênio sofre várias reações de oxidação e redução gerando diferentes compostos com estados de oxidação que variam entre +5 e -3 (Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a).

Uma das reações chaves deste ciclo é a redução de nitrato para nitrito, uma vez que a mesma é sempre o primeiro passo na utilização do nitrato, sendo que tal reação é catalisada pelas enzimas nitrato redutases. Dependendo do micro-organismo e das condições ambientais, o nitrito pode ser liberado ou ainda mais reduzido de diferentes maneiras. Na redução de nitrato assimilatória, o nitrato é reduzido via nitrito a amônio, que é utilizada para a síntese de glutamina. A glutamina é então doadora de nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos e moléculas (González et al., 2006; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a).

Os íons nitrato podem também ser incorporados pelas células e atuar como aceptores de elétrons para eliminar o excesso de poder redutor através da desnitrificação ou redução dissimilatória de nitrato ou ainda respiração pelo nitrato. Através da desnitrificação os íons nitrato, em condições anaeróbicas, são reduzidos a nitrito e subsequentemente em: óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) e finalmente em dinitrogênio (N₂). Devido à excreção de gases pelos microrganismos os termos redução de nitrato dissimilatória, respiração de nitrato ou desnitrificação tem sido usados equivalentemente na literatura para denominar esta via. A respiração é utilizada pela célula para gerar uma força próton motiva (PMF) através da membrana citoplasmática (González et al., 2006; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a). Um processo respiratório alternativo é o de amonificação conhecido também na literatura como redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA), que pode ocorrer em algumas enterobactérias e corresponde à redução do nitrato a amônio (NH₄⁺), que é então excretado. Em ambos os processos de respiração e amonificação há a conservação de energia e podem ser, portanto, utilizados como um dissipador de elétrons. Além disso, a

amonificação pode desempenhar um papel importante na desintoxicação celular (González et al., 2006; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a)..

Quatro tipos de nitrato redutases catalizam a redução de dois elétrons de nitrato a nitrito ($\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$): a assimilatória eucariótica e três enzimas procarióticas. Neste contexto, os procariotos podem metabolizar o nitrato de três diferentes formas dependendo do tipo de nitrato redutase que cada espécie possui. Estas variam tanto em relação à localização celular, estrutura química e propriedades bioquímicas como também na organização e regulação gênica. Tais enzimas procarióticas podem ser subagrupadas em: nitrato redutase respiratória ligada à membrana (Nar), nitrato redutase periplasmática (Nap) e nitrato redutase assimilatória (Nas) (González et al., 2006; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a).

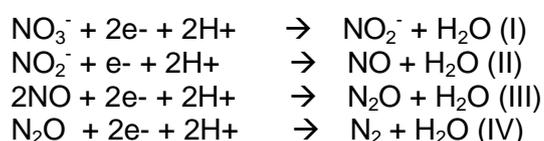
Em comum, as três diferentes nitrato redutases contêm como cofator dois grupos molibdopterina guanina dinucleotídeo (MGD) coordenados a um átomo de molibdênio. Análises de genomas de procariotos mostram que essas três enzimas são filogeneticamente muito difundidas. Entretanto, nem sempre as três nitrato redutases estão presentes em uma mesma bactéria (González et al., 2006; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a).

Nas sessões seguintes, serão descritas em detalhes as vias respiratórias de redução de nitrato através da desnitrificação e redução dissimilatória de nitrato a amônio, assim como as enzimas envolvidas em cada etapa de ambas as vias.

1.2.1. Desnitrificação

Entre as diferentes vias de redução de nitrato microbiana, desnitrificação bacteriana está mais extensivamente descrita e vários estudos têm sido realizados para elucidar esta via. A desnitrificação é um processo redutivo e, portanto, uma forma de respiração no qual o nitrato (NO_3^-) é reduzido gradualmente a nitrogênio gasoso (N_2). Em bactérias, este é um processo respiratório alternativo utilizado sob baixas concentrações de oxigênio ou na ausência do mesmo. Tal como na respiração aeróbica, a cadeia de reações é dividida sobre o compartimento periplasmático e citoplasmática, e permite a geração de uma força próton motriz através da membrana bacteriana, que é então utilizada para a síntese de ATP (Kraft et al., 2011; Rodionov et al., 2005; Simon and Klotz, 2013a).

A reação global da desnitrificação, redução do nitrato a nitrogênio molecular com a participação de 10 elétrons e 12 prótons ($2\text{NO}_3^- + 10\text{e}^- + 12\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$), é realizada por quatro classes de metaloenzimas diferentes :



Na equação (I), a redução de nitrato a nitrito é catalisada tanto pela nitrato redutase ligada à membrana (NarGHI), como também pela nitrato redutase periplasmática (Nap); a reação apresentada na equação (II), redução do nitrito a óxido nítrico, pode ser catalisada por dois tipos de redutase do nitrito, citocromo *cd1* (cNIR) ou uma enzima contendo dois centros de cobre (cuNIR); em (III), duas moléculas de óxido nítrico são conjugadas para formar óxido nitroso e água, reação que é catalisada pela enzima redutase do óxido nítrico, que podem ser dependentes de citocromo *c* (cNOR) ou dependentes de quinol (qNOR); por fim, a última reação da desnitrificação, correspondente à equação (IV), redução do óxido nitroso a nitrogênio molecular, é catalisada pela redutase do óxido nitroso (NosZ), a qual possui dois centros de cobre distintos (centro CuA e centro CuZ) (Figura 1) (Kraft et al., 2011; Nojiri et al., 2009; Rodionov et al., 2005; Simon and Klotz, 2013a).

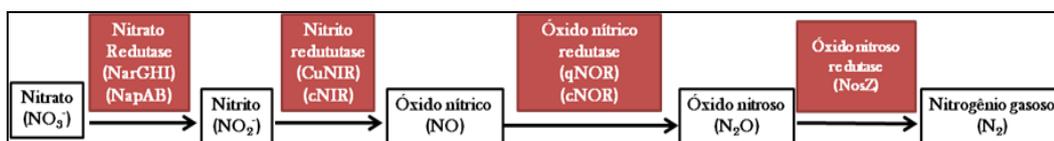


Figura 1 - Via de desnitrificação e as suas respectivas enzimas responsáveis por cada uma das quatro etapas de redução.

A seguir, são descritas cada uma das sete enzimas que podem compor a via completa de desnitrificação conforme descrito nas equações I a IV.

1.2.1.1. Nitrato redutase respiratória ligada à membrana NarGHI

A redução de nitrato através da nitrato redutase respiratória associada à membrana plasmática, está acoplada com a geração de um gradiente de prótons através da membrana, o que dirige a formação de ATP através da ATPase. Esta enzima é encontrada tanto em bactérias desnitrificantes, como também em não desnitrificantes que a utilizam para respiração por nitrato em ambientes anaeróbicos (Bertero et al., 2003; González et al., 2006; Jormakka et al., 2004; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a).

Esta enzima possui o sítio ativo voltado para o citoplasma e é usualmente composta por três subunidades NarGHI, sendo que a estrutura tridimensional da mesma é conhecida apenas por *Escherichia coli*, uma bactéria não desnitrificante, mas pode ser facilmente explorada por suas homólogas desnitrificantes. A estrutura desta enzima consiste em um heterotrímero composto pelas subunidades citoplasmáticas α e β e pela subunidade transmembrana γ . A subunidade catalítica α , codificada pelo gene *narG*, contém um cluster [4S-4Fe] e um cofator molibdopterina (Mo-bisMGD) que é o sítio de redução de nitrato (Bertero et al., 2003; González et al., 2006; Jormakka et al., 2004; Simon and Klotz, 2013a).

O gene *narH* codifica a subunidade β , uma proteína globular que contém três clusters [4Fe-4S] e um cluster [3Fe-4S]. Já a subunidade γ , codificada pelo gene *narI*, apresenta cinco hélices transmembranares, dois grupos hemes (b_p e b_D) e o 'sítio-Q', onde quinol se liga e é oxidado. NarI ancora NarGH no lado citoplasmático da membrana celular (Figura 2). O produto do gene *narJ* (NarJ) atua como uma chaperona específica requerida para inserção do cofator Mo-bisMGD em NarG (Bertero et al., 2003; González et al., 2006; Jormakka et al., 2004; Simon and Klotz, 2013a).

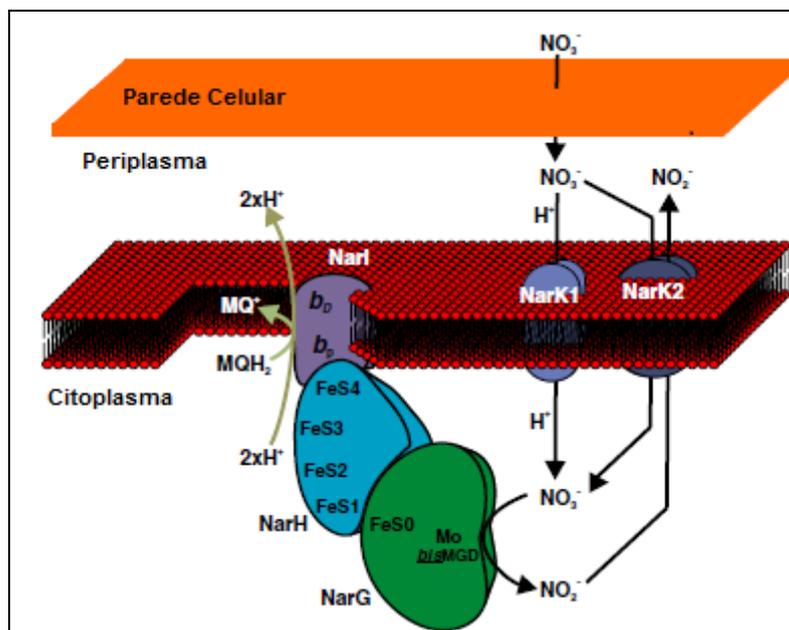


Figura 2: Nitratase respiratória ligada à membrana. É mostrada a organização da enzima e o transporte de elétrons para a respiração de nitrato na membrana plasmática. A enzima utiliza o “pool de quinonas” como doador de elétrons fisiológicos e produz uma força próton motriz. NarI oxida o quinol presente na membrana e libera dois prótons para o periplasma. Os elétrons são passados para NarG através do centro Fe-S de NarH para reduzir o nitrato, com o consumo de dois prótons citoplasmáticos. O nitrito produzido pela redução de nitrato é exportado para fora da célula através da proteína de transporte NarK ancorada à membrana plasmática. Fonte: González et al (2006)

Tanto ubiquinol como menaquinol podem ser utilizados como doadores fisiológicos de elétrons para NarGHI. Após a oxidação do quinol no sítio-Q, os elétrons são transferidos dos grupos heme da subunidade γ para os grupos Fe-S da subunidade β . Esta, por sua vez, transfere os elétrons para o sítio catalítico da subunidade α , onde nitrato será reduzido. A oxidação do quinol no lado periplasmático da membrana interna e o lançamento de dois prótons no compartimento periplasmático leva a formação de um gradiente de prótons transmembrana, que dirige a formação de ATP (Bertero et al., 2003; González et al., 2006; Kraft et al., 2011).

Como o sítio ativo de NarGHI (subunidade α) está localizado no citoplasma, o nitrato deve ser transportado para dentro da célula para ser reduzido. Esta função é

desempenhada por NarK, uma proteína transmembrana membro da superfamília dos facilitadores principais (MFS). Os membros desta família caracterizam-se por serem polipeptídeos únicos, os quais transportam pequenas moléculas em resposta ao gradiente químiosmótico. Análises genéticas e fisiológicas revelam que as proteínas NarK podem ser divididas em dois tipos. Os membros do tipo 1 realizam antiporte nitrato/nitrito e simporte nitrato/próton e os do tipo 2 estão envolvidos no efluxo de nitrito (Jia and Cole, 2005; Jia et al., 2009; Yan et al., 2013).

A proteína NarK foi primeiramente identificada em *E. coli* e se localiza a montante dos genes estruturais do complexo da nitrato redutase (operon *narGHJI*). Estudos demonstraram que no mutante *narK-* de *E. coli* a taxa de transporte de nitrato não foi significativa quando comparada à linhagem selvagem, o que sugeriu o envolvimento da proteína NarK no transporte de nitrato nesta bactéria (Jia and Cole, 2005; Jia et al., 2009; Yan et al., 2013). Outro transportador, denominado NarU, foi identificado posteriormente em *E. coli*. Esta proteína possui altíssimo grau de similaridade com a proteína NarK e sua função está ligada à captação de nitrato e nitrito para o meio intracelular bem como a exportação de nitrito para o meio extracelular. (Clegg, 2006; Jia and Cole, 2005; Jia et al., 2009; Yan et al., 2013).

Em *E. coli*, a expressão de *narGHJI* e *nark* é ativada pela proteína Fnr em resposta à anaerobiose, o qual é encontrado em várias bactérias gram-negativas e em algumas bactérias gram-positivas. Fnr é um regulador de transcrição global que ativa a expressão de genes que codificam muitas das enzimas necessárias para o metabolismo anaeróbico. A ativação de Fnr exige a formação de um aglomerado sensível ao oxigênio Fe-S, sendo que na presença de oxigênio, ocorre a desmontagem do conjunto instável Fe-S, o que impede desta forma, a ativação da transcrição dos genes alvo (Bertero et al., 2003; Crack et al., 2008; Jarvis et al., 2009).

E. coli apresenta outra nitrato redutase ligada à membrana: a NarZYV, que apresenta propriedades muito semelhantes à NarGHI. Entretanto, NarZYV é expressa em níveis muito baixos e de modo independente de oxigênio (FNR) e nitrato/nitrito, estando presente nas células apenas em níveis basais. Essa expressão constitutiva sugere que NarZYV poderia auxiliar a bactéria na transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio (González et al., 2006; Simon and Klotz, 2013a).

Entre as actinobactéria os organismos mais estudados a respeito da atividade desta enzima são *Corynebacterium glutamicum* e *Mycobacterium tuberculosis*, os quais são capazes de realizar a respiração por nitrato em ambientes anaeróbicos através da enzima nitrato redutase ligada à membrana. No entanto, tais organismos não possuem as demais

enzimas presentes nas vias de desnitrificação e redução dissimilatória de nitrato a amônio (Sohaskey, 2008; Takeno et al., 2007).

Estudos com *C. glutamicum*, demonstraram que a mesma cresce anaerobicamente utilizando nitrato como aceptor final de elétrons e que essa propriedade é atribuída pela presença do operon *narKGHJI*, o qual apresenta grandes similaridades de sequências com o gene *narK* e o operon *narGHJI* de *E. coli* que codificam um transportador nitrato/nitrito e os componentes do complexo nitrato redutase, respectivamente. O Nitrito é excretado para o exterior da célula como um produto final da redução anaeróbica do nitrato, e, além disso, nem sequer nitrato quanto nitrito são utilizados como fonte de nitrogênio para o seu crescimento, sugerindo que este microrganismo carece de um aparelho enzimático eficiente para reduzir o nitrito obtido de tal reação (Bott and Niebisch, 2003; Nishimura et al., 2011, 2014; Takeno et al., 2007)

O operon *narKGHJI* de *C. glutamicum* é induzido por anaerobiose e pela presença de nitrato, assim como em outras bactérias redutoras de nitrato. Porém, em *C. glutamicum* uma nova proteína reguladora transcricional do operon *narKGHJI* chamada de ArnR (aerobic repressor of nitrate reductase) foi identificada. ArnR reprime a expressão do operon *narKGHJI* se ligando a uma região específica do promotor, em condições aeróbicas. A repressão é aliviada pela mudança para condições anaeróbicas através da respiração por nitrato, resultando em uma elevada expressão genes *nar*. Esta função desempenhada por ArnR como um repressor aeróbio em *C. glutamicum* contrasta com o regulador transcricional global sensível a oxigênio FNR de *E. coli*, que ativa ou reprime a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo aeróbio e anaeróbio, incluindo aqueles envolvidos na respiração do nitrato (Nishimura et al., 2008, 2014).

Já em *M. tuberculosis*, a privação de oxigênio induz a redução respiratória de nitrato para nitrito. Esta atividade respiratória é catalisada pela enzima nitrato redutase codificada pelo operon *narGHIJ*. Além disso, a análise do genoma sequenciado revelou a presença de quatro cópias de *narK*, nomeados de *narK1*, *narK2*, *narK3* e *narU*. Neste microrganismo, nenhum dos *narK* homólogos estão localizados à montante de *narGHIJ*. Porém, *narK2* está localizado a montante do gene denominado *narX*, que foi proposto para codificar uma “nitrato redutase fundida”. Esta proposta foi feita porque o produto previsto de *narX* seria uma proteína com homologia para partes de *NarG*, *NarI* e *NarJ*, embora a sua função seja desconhecida. Uma mutação em *narG* eliminou por completo a atividade de nitrato redutase, a qual foi restabelecida com a inserção de um plasmídeo contendo tal gene. Já uma mutação em *narX*, nenhum efeito em relação à atividade de redução de nitrato foi encontrado, o que indica que apenas *narGHJI* é responsável pela atividade de nitrato redutase (Giffin et al., 2012; Sohaskey, 2008; Sohaskey and Wayne, 2003).

Além disso, em *M. tuberculosis*, a expressão do operon *narGHJI* é constitutiva, independentemente da presença de oxigênio. Neste micro-organismo, a atividade celular da enzima nitrato redutase é regulada por controle do nível de transcrição do gene *narK2* que codifica um transportador de nitrato/nitrito (NarK2). A transcrição do gene *narK2* é induzida pela ausência de oxigênio ou quando os níveis deste se encontram muito baixos, enquanto que a atividade deste transportador é controlada pelo estado redox da célula, permitindo que o nitrato seja transportado sob condições redutoras e não oxidantes. Mesmo na presença de oxigênio, NarK2 permanece ativo se a respiração é inibida, por exemplo, pela ação do óxido nítrico (Giffin et al., 2012, 2012; Khan and Sarkar, 2012; Sohaskey, 2005a; Sohaskey and Wayne, 2003). O óxido nítrico produzido por células do sistema imunológico, tais como o macrófago, é um composto nocivo para bactérias, devido à sua capacidade de formar intermediários reativos de nitrogênio (Watmough et al., 2009; Zumft, 2005).

M. tuberculosis utiliza a nitrato redutase para se adaptar a um ambiente intracelular de mudança. O óxido nítrico inibe a respiração aeróbia em *M. tuberculosis*, por competição com o oxigênio para a disponibilidade do citocromo c oxidase. No entanto, o óxido nítrico não inibe a enzima nitrato redutase. (Khan and Sarkar, 2012; Sohaskey, 2005b, 2008) A inativação do citocromo oxidase pela falta de oxigênio ou pela presença de óxido nítrico resulta em um aumento do nível de componentes reduzidos da cadeia de transporte de elétrons. Como resultado, uma diminuição do fluxo de elétrons pode fazer parte do sinal necessário para a atividade de NarK2. Por ser uma proteína de membrana, NarK2 está idealmente localizada para sentir os componentes da cadeia de transporte de elétrons. As quinonas/quinols de *M. tuberculosis* que são componentes não proteicos de transporte de elétrons e se apresentam livremente difusíveis na membrana, podem servir não só como fonte de elétrons para a nitrato redutase, mas também como um indicador dos níveis de oxigênio (Giffin et al., 2012; Khan and Sarkar, 2012; Sohaskey, 2005b; Sohaskey and Wayne, 2003).

O nitrato como um substrato para a atividade da enzima em *M. tuberculosis* pode ser fornecido em quantidades suficientes nos pulmões, fígado e rins de indivíduos infectados (Khan and Sarkar, 2012). Dentro do tecido, o nitrato é principalmente um produto da degradação espontânea do óxido nítrico, sendo que este último apresenta uma elevada instabilidade e se decompõe rapidamente produzindo nitrato como um dos produtos finais estáveis de tal decomposição. Já a síntese de óxido nítrico é obtida a partir da reação de oxidação do aminoácido L-arginina catalisada principalmente pela óxido nítrico sintase indutiva (iNOS), sendo a mesma expressa em resposta a mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios (Khan and Sarkar, 2012; Zumft, 2005). Uma variedade de células, incluindo hepatócitos, podem ser induzidas para sintetizar o óxido nítrico. Quantidades significativas

de nitrato são detectados na urina de ratos infectados com as bactérias, o que sugere que o nitrato está disponível no rim, especialmente nos animais submetidos a um processo inflamatório. Partanto, tem sido proposto que o processo inflamatório, devido à infecção micobacteriana nos pulmões, no fígado e nos rins pode aumentar a quantidade de nitrato dentro dos granulomas e, assim, proporcionar uma fonte adicional deste nutriente para o metabolismo anaeróbico do patógeno (Figura 3Quadro 3).

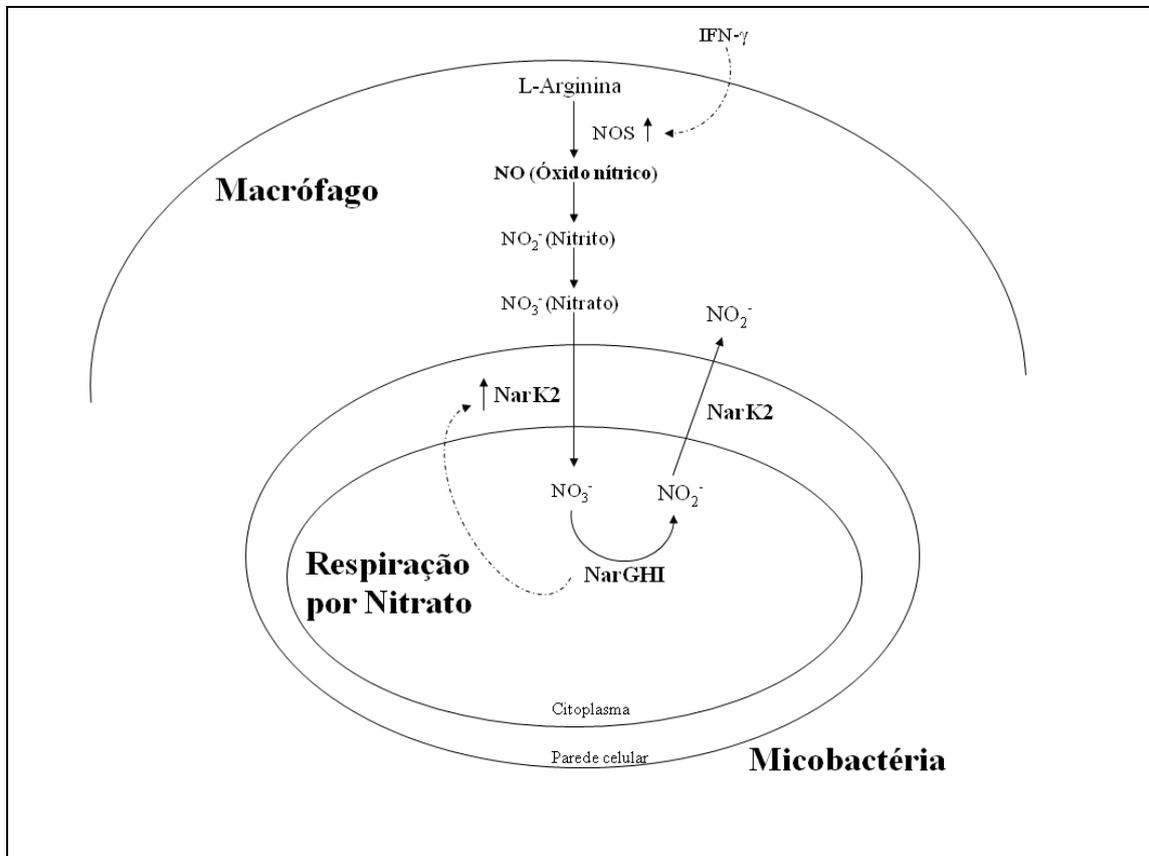


Figura 3 - Modelo hipotético para o papel do óxido nítrico em macrófagos humanos infectados por micobactérias. O tratamento com interferon-gama (IFN-γ) e L- Arginina aumentou a expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Estes macrófagos produzem NO e conduz a disponibilidade de nitrato. O nitrato pode ser adquirido por micobactérias através do transportador NarK2, que é regulado por NO e pela disponibilidade de oxigênio em macrófagos humanos. O nitrato é então reduzido a nitrito pelas bactérias, sendo que este último é transportado para fora das bactérias através de NarK2. Figura adaptada a partir de JUNG et al (2013).

1.2.1.2. Nitrato redutase periplasmática

A nitrato redutase periplasmática (NAP) é um complexo enzimático que participa da via dissimilatória do nitrogênio. As enzimas NAP estão localizadas no periplasma e foram primeiramente identificadas em *R. sphaeroides*. São dímeros que consistem em uma subunidade catalítica (NapA), contendo um cofator bis-molibdopterina guanina dinucleotídeo (bis-MGD) e um cluster [4Fe-4S] que formam um complexo juntamente com NapB, um pequeno citocromo c, uma proteína de membrana (NapC), envolvida na transferência de elétrons da membrana para o complexo NapAB que se localiza no periplasma e uma chaperona NapD responsável pela maturação de NapA (González et al., 2006; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a; Sparacino-Watkins et al., 2014) Outros genes *nap* foram descritos em algumas bactérias tais como *napF*, *napG* e *napH*, codificando diferentes proteínas ferro-enxofre, e *napE* e *napK* codificando proteínas transmembranas sem função definida (Figura 4) (González et al., 2006).

Diferentes funções fisiológicas tem sido propostas para o sistema Nap, incluindo balanceamento redox, desnitrificação e adaptação ao crescimento anaeróbico. Por ter diferentes funções, há diversos níveis de controle de expressão dos genes *nap* de acordo com o organismo e função fisiológica. Em geral a atividade da NAP ocorre em baixas condições aeróbicas e não é afetada por amônio (González et al., 2006; Kraft et al., 2011; Rodionov et al., 2005; Simon and Klotz, 2013b). Em *E. coli*, as nitrato redutases periplasmáticas são altamente expressas em baixas concentrações de nitrato, condições anaeróbicas e são reguladas pelo produto dos genes *fnr* e *narP*. Em *Ralstonia eutropha* a máxima expressão dos genes *nap* ocorre em condições aeróbicas, na fase estacionária de crescimento e não é induzida por nitrato. Já em *Paracoccus pantotrophus* expressão máxima de *nap* ocorre durante o crescimento aeróbico com a presença de butirato e na ausência de nitrato. Em razão a toda esta disparidade do sistema Nap, não há uma função comum sugerida (González et al., 2006; Kraft et al., 2011; Rodionov et al., 2005; Simon and Klotz, 2013b).

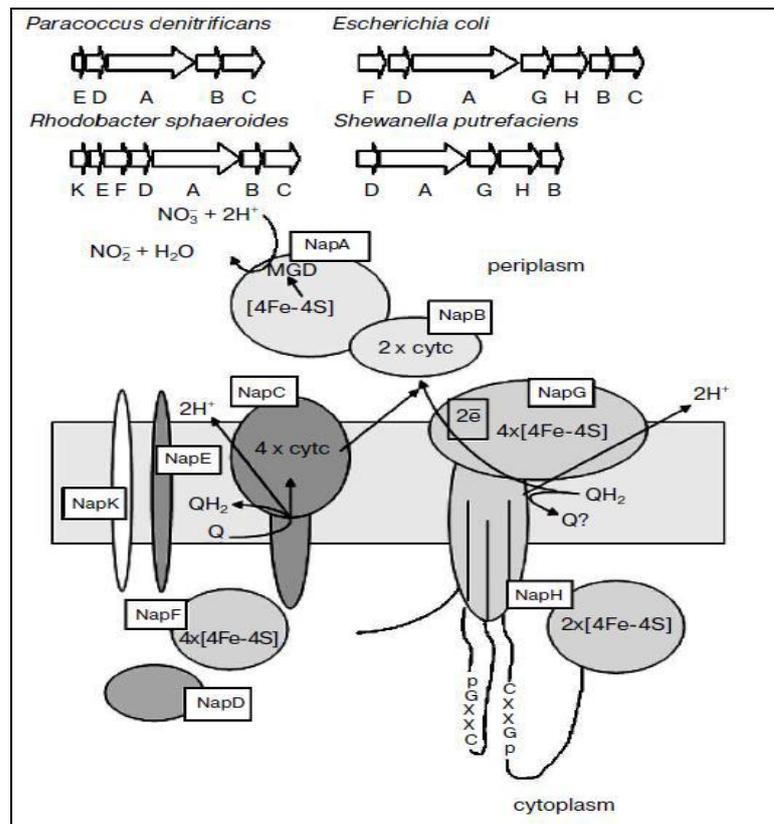


Figura 4: Organização das proteínas da via dissimilatória de nitrato codificadas por genes presentes em *E. coli*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, e *Shewanella putrefaciens*. Fonte: Morozkina; Mvyagilskaya, 2009.

1.2.1.3. Nitrito redutases

A redução de nitrito para óxido nítrico é catalisada por duas diferentes enzimas nitrito redutases, as quais são evolutivamente independentes e estão localizadas no periplasma de bactérias Gram-negativas: um homodimérico citocromo cd_1 nitrito redutase (cd_1 NIR) e uma homotrimérica nitrito redutase dependente de cobre (CuNIR), as quais são comumente conhecidas pelo nome do produto de seus genes NirS e NirK, respectivamente. O fluxo de elétrons para tais enzimas ocorre por meio de proteínas periplasmáticas de transferência de elétrons que consistem em: pequenas proteínas que contêm cobre nomeadas de azurinas, pseudoazurinas ou cupredoxinas; e citocromos c , tais como citocromos c_{550} e c_{551} (Kraft et al., 2011; Nojiri et al., 2009; Simon and Klotz, 2013b).

Em NirS, cada um dos dois monômeros possuem dois grupos protéticos heme, heme c e heme d_1 . Os elétrons são transferidos através do citocromo c_{551} para o heme c e posteriormente para heme d_1 , onde ocorre a ligação do nitrito e este é reduzido para óxido nítrico. Estudos *in vitro* demonstraram que NirS também aceita elétrons de diferentes

doadores, tais como citocromo c_{550} e azurinas (Kraft et al., 2011; Nojiri et al., 2009; Simon and Klotz, 2013b).

Já em NirK, cada monômero contém dois centros de cobre, tipo 1(T1Cu) e tipo 2 (T2Cu). Esta enzima é classificada em dois subgrupos de acordo com as propriedades espectroscópicas de T1Cu, que são azul e verde. Em geral, CuNIR verde recebe elétrons de pseudoazurinas (Paz), enquanto que para CuNIR azul, tem sido sugerido que os doadores de elétrons são azuín (Az) ou citocromo *c*. Em ambos os casos, um elétron é transferido através de T1Cu para T2Cu, onde ocorre a redução de nitrito para óxido nítrico(Fukuda et al., 2014a; Kraft et al., 2011; Leferink et al., 2014; Nojiri et al., 2007, 2009; Simon and Klotz, 2013b).

Tanto para CuNIR quanto para cd_1 NIR, as proteínas de transferência de elétrons são reduzidas pelo complexo de citocromo bc_1 via quinol. A oxidação do quinol permite a translocação de prótons do citoplasma para o periplasma, sendo, portanto, uma reação eletrogênica (Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013b).

Em algumas espécies do gênero *Neisseria* foi identificada uma nitrito redutase nomeada de AniA, que encontra-se localizada na membrana externa e a estrutura de cristal revelou que tal enzima é homóloga à NirK (Boulangier and Murphy, 2002; Kraft et al., 2011) Já em *Bacillus azotoformans*, uma bactéria Gram-positiva desnitrificante, foi detectada a presença de uma nitrito redutase dependente de cobre que se encontra ligada à membrana. Foi proposto que tal enzima em *B. azotoformans* desempenha uma função dupla, na qual pode utilizar tanto menaquinol quanto um reduzido citocromo *c* como doadores de elétrons (Heylen and Keltjens, 2012; Kraft et al., 2011; Suharti and de Vries, 2005).

1.2.1.4. Óxido nítrico redutase

Em bactérias, a redução de óxido nítrico (NO) para óxido nitroso (N_2O) é catalisada pela enzima óxido nítrico redutase (NOR), a qual se encontra ligada à membrana, sendo que esta é uma enzima envolvida no processo de desnitrificação microbiana (Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013b; Watmough et al., 2009; Zumft, 2005). Para além do seu papel na desnitrificação, bactérias patogênicas utilizam NOR como um mecanismo de defesa contra o sistema imune do hospedeiro, uma vez que os macrófagos utilizam o óxido nítrico como uma arma química contra agentes infecciosos. Sendo assim, inibidores específicos desta enzima podem representar uma estratégia potencialmente importante para combater infecções bacterianas (Philippot, 2005; Watmough et al., 2009). O estudo de NORs também é uma área de interesse para as ciências ambientais, uma vez que o N_2O produzido por tais enzimas é um gás que provoca tanto a destruição da camada de ozônio como também

contribui para o efeito estufa e aquecimento global, sendo cerca de 310 vezes mais potente do que o dióxido de carbono (Ravishankara et al., 2009; Watmough et al., 2009).

A análise de sequências de aminoácidos conhecidas de NORs bacterianas evidencia a existência de dois subgrupos, os quais consistem em combinações distintas de subunidades e cofatores. O primeiro subgrupo de NORs bacterianas, conhecidas como cNOR são compostas por duas subunidades (NorB e NorC) e são encontradas apenas em bactérias desnitrificantes. O segundo subgrupo conhecido como qNOR (NorZ) são enzimas compostas por uma única subunidade são encontradas em bactérias patogênicas não desnitrificantes como também em bactérias desnitrificantes e arqueas (Kraft et al., 2011; Matsumoto et al., 2012; Simon and Klotz, 2013b; Watmough et al., 2009).

A subunidade grande NorB apresenta elevada similaridade e traços característicos com a principal subunidade catalítica da superfamília heme/cobre oxidases (HCOs) Os membros desta superfamília são também conhecidos na literatura citocromo *c* oxidase terminal ou complexo IV oxigênio redutases. (Gao et al., 2012; Ravishankara et al., 2009; Simon and Klotz, 2013b; Watmough et al., 2009). HCOs catalisam a redução de quatro elétrons do oxigênio molecular à água e finalizam as cadeias respiratórias aeróbias de bactérias e mitocôndrias. Grande parte da energia libertada nesta reação exergônica é conservada movendo prótons através da membrana celular, contribuindo assim para o gradiente electroquímico de prótons que é subseqüentemente utilizado para dirigir a síntese de ATP (Gao et al., 2012). No entanto, não há nenhuma evidência de que NORs contribuem, para a geração do gradiente de prótons através da membrana (Gao et al., 2012; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013b). HCOs são enzimas transmembrana que possuem na subunidade I uma heme de baixa rotação e um sítio ativo bimetálico composto por um heme de alta rotação e um íon de cobre chamado Cu_B. Apenas a subunidade I é comum a todas as enzimas HCOs (Gao et al., 2012).

Já nas enzimas óxido nítrico redutases, a posição de átomo de cobre é geralmente ocupada por um íon de ferro (Fe_B). Ambos os grupos heme de NorB são do tipo *b*, no qual os elétrons são transferidos através do heme *b* de baixa rotação para o centro catalítico binuclear. NorC é um citocromo *c* ancorado à membrana e o gene responsável por codificar tal subunidade (*norC*) encontra-se localizado à montante do gene *norB*, os quais, juntamente com outros genes, foram um operon. Tal complexo NorBC é conhecido como cNOR, pois os elétrons doados através de um citocromo *c* solúvel ou por cupredoxinas, tais como pseudoazurinas (Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013b; Watmough et al., 2009).

A primeira estrutura de cristal de uma NOR foi publicada em 2010 a partir de cNor de *Pseudomonas aeruginosa*. A estrutura revela que a subunidade NorC é uma proteína ancorada à membrana contendo heme *c* no seu domínio hidrofílico, orientado para o

periplasma, e que a subunidade NorB é uma proteína com 12 hélices transmembranares contendo heme *b* e um centro catalítico binuclear (heme *b*₃ e um ferro não-heme Fe_B) (Shiro et al., 2012).

O segundo subgrupo de NOR consiste de uma única subunidade que utiliza menaquinol ou ubiquinol como doadores de elétrons e, por este motivo, foi nomeada de qNOR. Comparada a NorB, qNOR apresenta uma extensão N-terminal que foi proposta como responsável pela ligação ao quinol. A análise da sequência indica que tal região N-terminal pode dobrar-se em duas α -hélice transmembrana conectadas por um domínio periplasmático hidrofílico. A sequência desta extensão é similar à NorC e é sugerido que qNOR é uma fusão de NorB e NorC no qual durante a evolução, foi perdido o centro heme *c* e obtido um sítio de ligação ao quinol (Matsumoto et al., 2012; Simon and Klotz, 2013b; Watmough et al., 2009).

Recentemente a estrutura de cristal da qNOR pertencente à bactéria Gram-positiva *Geobacillus stearothermophilus* foi caracterizada. A estrutura revelou um canal de água do citoplasma que pode servir de entrega de prótons. Assim, não pode ser excluída a possibilidade de que qNor possa catalisar a oxidação do quinol acoplada à redução de óxido nítrico ser eletrogênica (Matsumoto et al., 2012).

Um tipo incomum de enzima NOR pertencente ao subgrupo qNOR foi purificada a partir da bactéria Gram-positiva *Bacillus azotoformans*. Tal enzima consiste de duas subunidades, a subunidade maior NorB e uma subunidade menor que possui um átomo de cobre em sua estrutura, sendo por esta razão, denominada como qCu_ANOR. Esta enzima é capaz de utilizar tanto menaquinol como um citocromo *c*₅₅₁ ligado à membrana como doadores de elétrons (Heylen and Keltjens, 2012; Suharti and de Vries, 2005).

1.2.1.5. Óxido nítrico redutase

A enzima óxido nítrico redutase é uma das quatro enzimas necessárias para a desnitrificação completa, sendo a mesma uma enzima periplasmática em bactérias gram-negativas e ligada à membrana na bactéria gram-positiva *B. azotoformans*. Esta enzima denominada NosZ, é um homodímero com dois centros de cobre por monômero, denominados Cu_A (centro de cobre dinuclear) e Cu_Z (centro de cobre tetranuclear). Cu_A o local de entrada de elétrons em cada monômero, é um centro de cobre binuclear. A localização dos centros de cobre no dímero NosZ sugere que a transferência eletrônica de recursos provenientes Cu_A de uma subunidade para Cu_Z de outra subunidade, em que o óxido nítrico está reduzido a nitrogênio gasoso. Para várias espécies, tais como *Paracoccus denitrificans* e *R. sphaeroides*, foi demonstrado que a transferência de elétrons para NOS ocorre através do citocromo *c*, e que o citocromo complexo bc1 está também envolvido no

processo de redução de óxido nitroso, o que implica transferência de prótons através da membrana citoplasmática. No entanto, em muitos micro-organismos desnitrificantes esta enzima não está presente devido à ausência de um gene *nosZ*, sendo nestes casos o N_2O o produto final na via de desnitrificação. Na prática, um "verdadeiro desnitrificante" converte, pelo menos, 80% do nitrato ou nitrito consumido para a N_2O ou N_2 . (Heylen and Keltjens, 2012; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013b) .

1.2.2. Redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA)

A redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA) ocorre quando o carbônico orgânico de um determinado ambiente é limitante. A redução de nitrato para nitrito através da redução DNRA é descrita como sendo catalisada principalmente pelo sistema Nap da redução de nitrato periplasmático, embora a nitrato redutase ligada à membrana NarGHI pode também estar presente no mesmo organismo (Kraft et al., 2011; Richardson, 2000; Simon, 2002; Simon and Klotz, 2013a).

Em DNRA, a energia é obtida através da geração de um potencial eletroquímico de prótons através da membrana. Os elétrons são transportados a partir do substrato (por exemplo, hidrogênio, sulfureto, formiato) para o nitrito. A cadeia de transporte de elétrons é constituída por uma enzima que oxida o doador de elétrons, por exemplo, uma NADH desidrogenase ou formato desidrogenase. Em seguida, os elétrons são transferidos para uma menaquinona respiratória e posteriormente transferidos para o citocromo *c* nitrito reductase (Kraft et al., 2011; Richardson, 2000; Simon, 2002; Simon and Klotz, 2013a).

A redução de seis elétrons de nitrito para amônio é realizado pelo sistema Nrf, no qual a enzima nitrito reductase é um citocromo *c* penta-heme chamado NrfA, sendo que, dependendo do organismo, a mesma apresenta-se como uma proteína periplasmática solúvel (em *E. coli*, por exemplo) ou como uma subunidade de um complexo menaquinol reativo associado à membrana, o qual é composto por NrfA e um citocromo *c* tetra-heme chamado de NrfH, sendo que este último, é membro da família de citocromos *c* multi-hemes NapC/NrfH (Kern et al., 2008; Kraft et al., 2011; Rodrigues et al., 2006; Simon, 2002; Simon and Klotz, 2013b). As proteínas pertencentes a esta família são citocromos *c* tetra ou penta-hemes que se encontram associadas à membrana e apresentam na sua estrutura uma hélice transmembranar na região N-terminal, assim como um domínio globular de citocromo *c* situado no lado de fora da membrana. Tal família NapC/NrfH foi referida anteriormente como NapC/NirT, pois a primeira proteína identificada foi a NirT de *Pseudomonas stutzeri* (Kern et al., 2008; Simon, 2002; Simon and Klotz, 2013b; Simon et al., 2002).

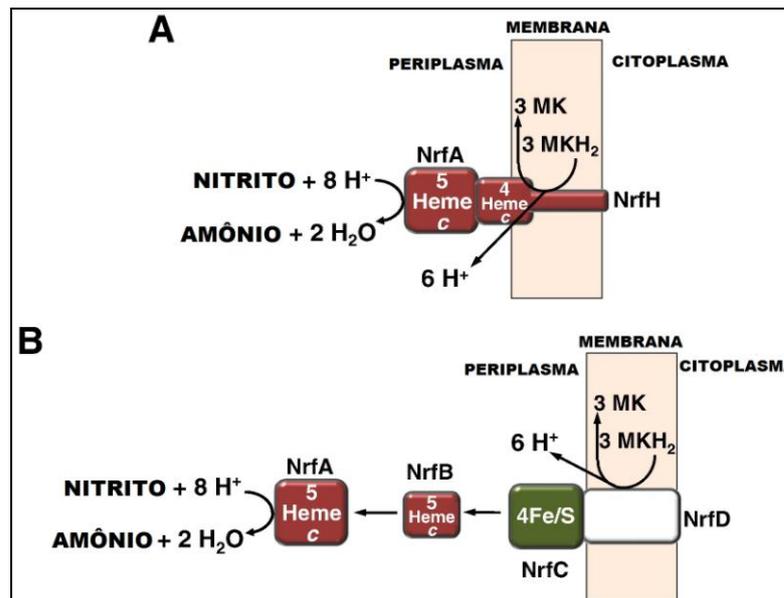


Figura 5 - Modelo de sistemas Nfr respiratórios. (A) Sistema Nfr de *Wolinella succinogenes* formado por um complexo menaquinol reativo associado à membrana, o qual é composto por NrfA e um citocromo c tetra-heme chamado de NrfH; **(B)** Sistema Nfr de *Escherichia coli*. NrfA é uma proteína solúvel no periplasma a qual NrfB atua como doadora de elétrons a partir de um “pool” de menaquinol através da oxidação de um complexo proteico integrado a membrana NrfC-NrfD. Fonte: Simon; Klotz, 2013.

Tais complexos NrfHA estão presentes em Delta- e Epsilonproteobacteria, como por exemplo em *Wolinella succinogenes*, no qual NrfH ligado a membrana medeia o transporte de elétrons a partir de menaquinonas para NrfA, a qual esta última por sua vez, apresenta o sítio catalítico orientado para o periplasma (Figura 5A) (Kern et al., 2008; Kraft et al., 2011; Rodrigues et al., 2006; Simon, 2002; Simon and Klotz, 2013b). Em tal bactéria, NrfA e NrfH são codificadas pelo operon *nrfHAIJ* juntamente com o gene *nrfI* que está envolvido na biogênese do citocromo c, sendo necessário para a maturação da proteína NrfA. Tal NrfI é similar a proteína CcsA de *Helicobacter pylori* (Einsle et al., 2000; Kraft et al., 2011; Simon and Klotz, 2013b) Proteínas semelhantes a CcsA são também deduzidas das seqüências genômicas de várias bactérias Gram-positivas, tais como *Bacillus subtilis* (ResC protein) e espécies do gênero *Mycobacterium*. A biogênese do citocromo c em bactérias é dividido em dois sistemas que diferem em seus componentes enzimáticos (Allen et al., 2003; Kranz et al., 2009a). Conforme Kranz et al (2009), o sistema II está presente em bactérias Gram-positivas assim como em cyanobactérias, enquanto o sistema I foi descrito em *E. coli*. Pelo menos quatro proteínas (CcsA, Ccs1, ResA and CcdA) estão envolvidas no sistema II, sendo que algumas destas, tais como CcsA, estão provavelmente envolvidas na entrega do heme através da membrana e/ou na sua ligação ao apocitocromo (Allen et al., 2003; Kern and Simon, 2009; Kranz et al., 2009a).

Por outro lado, em Gammaproteobacterias entericas, como por exemplo, *E. coli*, uma proteína pentaheme periplasmática nomeada de NrfB atua como doadora de elétrons para NrfA. Tal proteína NrfB transfere elétrons de um “pool” de menaquinol através da oxidação de um complexo proteico integrado a membrana NrfC-NrfD (Figura 5B) (Clarke et al., 2008; Einsle et al., 2000; Kraft et al., 2011; Simon, 2002; Simon and Klotz, 2013b).

Além de catalisar a redução de nitrito para amônio, foi comprovado que NrfA também é capaz de converter substratos alternativos, tais como óxido nítrico, hidroxilamina, peróxido de hidrogênio e sulfito. Tal versatilidade reativa de NrfA indica que a mesma apresenta uma função desintoxicante na fisiologia celular sob condições de estresse correspondentes (Clarke et al., 2008; Kern and Simon, 2009; Kern et al., 2011; Simon and Klotz, 2013a).

1.2.3. Respiração de nitrato e virulência

Levando em consideração as características microbianas envolvidas na interação entre microrganismos patogênicos e seus hospedeiros, foi sugerido que a respiração de óxidos de nitrogênio fornece energia para o metabolismo bacteriano em ambientes anaeróbicos, permitindo a persistência de bactérias patogênicas em seu hospedeiro (Philippot, 2005).

Em *M. tuberculosis* a respiração por nitrato tem sido identificada como um importante fator de virulência. Foi sugerido que os níveis elevados de atividade da nitrato redutase de algumas linhagens pode ter aumentado a sua virulência, e assim, o seu sucesso evolutivo. Sohaskey (2008) verificou que a presença de nitrato no meio aumentou a sobrevivência de *M. tuberculosis* quando a mesma foi submetida à anaerobiose súbita indicando que a nitrato redutase pode desempenhar um papel importante durante a interrupção brusca da respiração aeróbia causada pela falta de oxigênio ou por óxido nítrico *in vivo* (Sohaskey, 2008). Além disso, a respiração de nitrato também poderia ajudar a *M. tuberculosis* a gerar resistência a condições ácidas. Na ausência de nitrato durante a privação de oxigênio, condições moderadamente ácidas promoveram a dissipação da força próton motriz, a diminuição rápida dos níveis de ATP e a morte celular. A sobrevivência de *M. tuberculosis* foi restaurada quando o nitrato, um efetivo receptor terminal de elétrons para a respiração anaeróbica, foi adicionado ao meio (Tan et al., 2010).

A respiração por nitrato foi encontrada para ser igualmente importante na proteção de *M. tuberculosis* contra as espécies reativas de nitrogênio que são susceptíveis de serem encontradas pelo patógeno no hospedeiro infectado. Quanto a isso, é proposto que a proteção contra o estresse pela respiração nitrato é mediada pela manutenção do potencial

de membrana e altos níveis de ATP, sendo este último necessário para os mecanismos de reparação induzidos por nitrosilação. Recentemente, estudos *in vitro* realizados com macrófagos humanos infectados com *M. tuberculosis* demonstraram que o óxido nítrico produzido por tais macrófagos não mostrou ser bactericida ou bacteriostático para o patógeno. Em vez disso, o número de micobactérias viáveis foi aumentado em macrófagos que produzem óxido nítrico, e isso requer a utilização da nitrato redutase e a expressão de *narK2*. Linhagens mutantes que não possuíam a enzima nitrato redutase foram incapazes de crescer em tais macrófagos humanos. Os autores concluem que na presença de óxido nítrico, a redução de nitrato pode permitir que *M. tuberculosis* utilize esse substrato para produzir energia. Isto sugere que uma via respiratória anaeróbia é ligada dentro do macrófago e talvez seja um ponto crítico para o crescimento da bactéria. Assim, a redução de nitrato pode desempenhar um papel importante no crescimento intracelular e sobrevivência do patógeno em macrófagos humanos (Jung et al., 2013).

Em estudos utilizando um mutante de *Mycobacterium bovis* sem a enzima nitrato redutase ligada à membrana (NarGHI), Fritz et al., (2002) revelou que a redução anaeróbia de nitrato é essencial para o metabolismo das bactérias nos pulmões, no fígado e nos rins de camundongos imunocompetentes.

Já em estudos investigativos onde se analisou o conjunto de genes necessários pela virulência de *Brucella suis*, um patógeno que reside e se multiplica dentro de um vacúolo fagocítico de sua célula hospedeira, o macrófago, foi relatado que a enzima respiratória nitrato redutase ligada à membrana está associada à multiplicação intramacrofágica deste microrganismo. Mutantes *narG* foram incapazes de produzir nitrito a partir de nitrato e a exigência de um *narG* funcional para o crescimento intracelular indica que o vacúolo existente em *B. suis* é desprovido de oxigênio e pode ser interpretado como a capacidade de *B. suis* em utilizar o nitrato para a respiração durante o crescimento intracelular (Philippot, 2005)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar e propor a via de redução de nitrato de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi e identificar as enzimas que constituem a cadeia de transporte de elétrons através de análises *in silico*.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar os repertórios de proteínas relacionadas à redução de nitrato
- Correlacionar os resultados obtidos com o genoma de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi.
- Analisar e propor a via de redução de nitrato através de abordagens *in silico*.
- Identificar as enzimas responsáveis pela cadeia respiratória aeróbica e anaeróbica de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- Analisar a conservação dos resíduos envolvidos na ligação a cofatores através de alinhamento múltiplo.
- Realizar validação experimental por fenotipagem da reação de redução de nitrato para nitrito.
- Confirmar a presença dos genes envolvidos na redução de nitrato por PCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises *in silico*

3.1.1. Dados genômicos do resequenciamento das linhagens 31 e 258 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Estes dados foram obtidos a partir do novo sequenciamento da linhagem 31 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pertencente ao biovar Equi, isolada a partir de uma lesão em um búfalo alo no Egito (Silva *et al.*, 2012). Esta linhagem foi sequenciada na plataforma Ion Torrent PGM com bibliotecas genômicas mate-paired, após sequenciamento e análise dos contigs, foi encontrada uma região adicional de aproximadamente 91 kb de sequência, na qual consiste em 248 sequências codificadoras (CDS), representando um Corinefago e um operon contendo genes da nitrato redutase, este operon também está presente em *Corynebacterium diphtheriae* e estavam ausentes na sequência genômica de *C. pseudotuberculosis* 31 depositada do NCBI (Ramos *et al.*, 2013).

Recentemente, a linhagem 258 de *C. pseudotuberculosis* que pertence ao biovar Equi também foi resequenciada (dados não publicados) e possui no seu genoma os mesmos genes referentes a nitrato redutase que foram encontrados na linhagem 31 de *C. pseudotuberculosis*, e assim como esta, tais genes estão ausentes no genoma atualmente depositado no NCBI. As análises dos genes envolvidos com a redução de nitrato foram realizadas usando os genes presentes no genoma de *C. pseudotuberculosis* 31.

3.1.2. Identificação *in silico* da Nitrato Redutase

Para analisar o conteúdo e a disposição dos genes de nitrato redutase no operon foi utilizado o programa Artemis, disponível para download em (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>). Esse programa é um algoritmo desenvolvido para visualização de genomas e realização da anotação e curadoria manual. O Artemis permite a visualização de diversas características das sequências genômicas, como: produto codificado pelo gene predito; busca por similaridade proteica e nucleotídica em bancos de dados biológicos; visualização de prováveis domínios e famílias protéicas conservadas; visualização de conteúdo G+C, entre diversas outras funções (Rutherford *et al.*, 2000).

3.1.3. Predição das vias metabólicas e enzimas envolvidas na cadeia respiratória, redução de nitrato

Para predição computacional das vias metabólicas de *C.pseudotuberculosis* 31 foi utilizado o *software Pathway Tools* desenvolvido pelo SRI International (Karp et al., 2002). O *Pathway Tools* utiliza como referência para suas predições uma base de dados de vias metabólicas e enzimas, conhecida por *MetaCyc* (Caspi et al., 2008). As vias metabólicas contidas no *MetaCyc* são extraídas da literatura e elucidadas experimentalmente. Para predição das vias metabólicas, o *Pathway Tools* oferece um componente conhecido como *Pathologic* no qual foi utilizado um arquivo no formato *Genbank*, o que permitiu a criação de um banco de dados do organismo modelo chamado *Pathway/Genome Database (PGDB)*.

Na primeira etapa, conhecida como *trial parse*, o arquivo foi preliminarmente analisado no intuito de se validar o formato. Nessa fase, além de serem exibidas mensagens para cada campo que foi localizado durante o processo, e exibido um pequeno relatório que nos indica o número de genes encontrados, de *EC numbers* e de produtos. Na segunda etapa, conhecida como *automated build*, o banco de dados de vias metabólicas foi efetivamente construído utilizando-se basicamente os atributos *EC number* e produto. O processo de predição das vias metabólicas ocorre através da inferência da presença das reações catalisadas com base no produto dos genes anotados. Se um *EC number* foi atribuído ao produto do gene, então o software infere a presença da reação com base neste identificador. Caso contrário, o software compara o produto do gene com um extenso dicionário de nomes de enzimas para, então, inferir a presença da reação. Após esse processo, as vias metabólicas de redução de nitrato que continham enzimas ausentes (*holes*), ou seja, enzimas que não foram localizadas através de seus atributos foram submetidas ao *Hole Filler* (Green et al., 2004). O *Hole Filler* é um módulo do *Pathologic* utilizado para localizar enzimas ausentes nas vias metabólicas através de análise de similaridade de sequência.

Para inferir a presença de tais enzimas, esse módulo gera um arquivo contendo todas as sequências de proteínas obtidas do UNIPROT (UniProt Consortium, 2008) que se referem ao *EC number* das enzimas ausentes, independentemente do organismo a que elas pertencem. Utilizando o software BLAST (Altschul et al., 1997), as sequências de enzimas do UNIPROT são comparadas com todas as enzimas contidas no arquivo de anotação. Ao final desse processo, é exibida uma janela contendo todas as inferências feitas pelo *Hole Filler* para que sejam manualmente confirmadas.

3.1.4. Análise de similaridade

A análise de similaridade dos genes envolvidos na via de redução de nitrato foi efetuada utilizando o banco de dados UNIPROTKB na categoria BLASTp.

3.1.5. Análise dos domínios proteicos e das famílias das proteínas estudadas

As famílias das proteínas assim como os domínios protéicos conservados, presentes no operon e em genes adjacentes, foram analisados através do banco de dados InterProScan, que pode ser acessado através do endereço (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>).

3.1.6. Alinhamento Múltiplo de Sequências

3.1.6.1. Coleta de dados biológicos

Para ter acesso às sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas referentes às subunidades da enzima nitrato redutase respiratória (NAR), foi utilizada a base de dados Uniprot, que pode ser acessada por: <http://www.uniprot.org/>. Para tal foi utilizado o “BlastP” para procurar os mesmos polipeptídeos nas demais espécies do gênero *Corynebacterium*. Em adição, foram acrescentadas as sequências obtidas das espécies *E. coli* pois é a única enzima do tipo NAR que possui a estrutura de cristal determinada até o presente momento, *M. tuberculosis* e *M. bovis* por serem bactérias patogênicas filogeneticamente próximas à *C. pseudotuberculosis* as quais já possuem vários estudos referentes redução de nitrato respiratória por meio desta enzima e também *Bacillus subtilis* representar um dos organismos gram-positivos já bem caracterizados na literatura quanto a presença desta enzima. No Quadro 1, podem ser visualizadas as espécies usadas nesta etapa do trabalho.

As sequências homólogas de aminoácidos de cada organismo em estudo correspondentes ao mesmo polipeptídeo foram salvas em um documento multifasta que serviram como arquivos de entrada para realizar a próxima etapa, o alinhamento múltiplo de sequências.

Quadro 1 - Espécies utilizadas no alinhamento múltiplo de sequências.

Espécies	Genes	Referências
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	narG; narH; narI;	Ruiz et al., 2011
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	narG; narH; narI;	Cerdeño-Tárraga et al., 2003
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	narG; narH; narI;	Ikeda & Nakagawa, 2003
<i>Corynebacterium striatum</i>	narG; narH; narI;	Qin X et al., 2009
<i>Corynebacterium efficiens</i>	narG; narH; narI;	Nishio et al., 2003
<i>Corynebacterium casei</i>	narG; narH; narI;	Monnet et al., 2012
<i>Mycobacterium bovis</i>	narG; narH; narI;	Garnier et al., 2003
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	narG; narH; narI;	Cole et al., 1998; Sohaskey & Wayne, 2003
<i>Escherichia coli</i>	narG; narH; narI;	Blasco et al., 1989
<i>Bacillus subtilis</i>	narG; narH; narI;	Hoffmann et al., 1995; Kunst et al., 1997

3.1.6.2. Clustal W

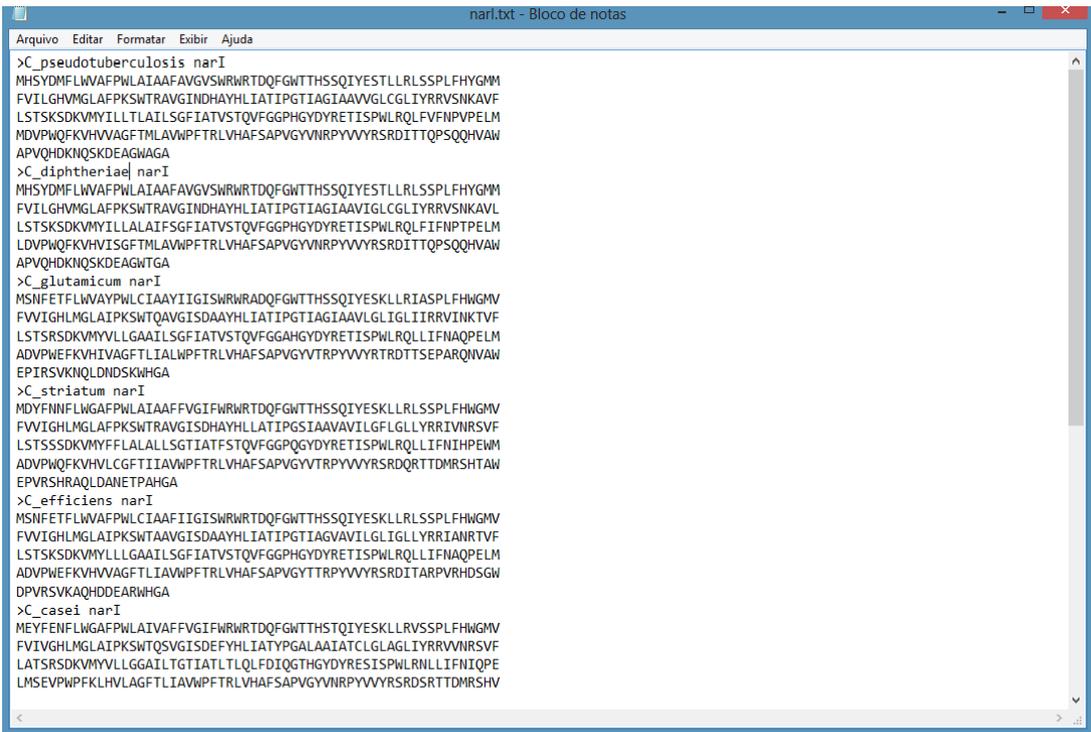
ClustalW é uma ferramenta para alinhar três ou mais sequências em conjunto de uma maneira computacionalmente eficiente.

O acesso à ferramenta Clustal W foi realizado pelo site da EMBL – Europe Molecular Biology Laboratory, a partir do site: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalW/>

Executar a ferramenta a partir do formulário on-line é um processo simples de etapas múltiplas, que se resumem em:

Etapa 1: Arquivo de entrada contendo as sequências no formato FASTA;

Exemplo:



```
narI.txt - Bloco de notas
Arquivo  Editar  Formatar  Exibir  Ajuda
>C_pseudotuberculosis narI
MHSYDMFLWVAFPLAIAAFVGVSWRWRDQFGWTTTHSSQIYESTLLRLSSPLFHYGMM
FVILGHVMGLAFPKSWTRAVGINDHAYHLIATIPGTIAGIAAVVGLGLIYRRVSNKAVF
LSTSKSDKVMYLLTLLAILSGFIATVSTQVFGGPHGYDYRETI SPWLRQLFVFNPELM
MDVPWQFKVHVAGFTMLAVWPFTRLVHAFSAPVGVVIRPYVWYRSRDIITQPSQQHVAW
APVQHDKNQSKDEAGNAGA
>C_diphtheriae narI
MHSYDMFLWVAFPLAIAAFVGVSWRWRDQFGWTTTHSSQIYESTLLRLSSPLFHYGMM
FVILGHVMGLAFPKSWTRAVGINDHAYHLIATIPGTIAGIAAVVGLGLIYRRVSNKAVL
LSTSKSDKVMYLLLALAILSGFIATVSTQVFGGPHGYDYRETI SPWLRQLFVFNPELM
LDVPWQFKVHVISGFTMLAVWPFTRLVHAFSAPVGVVIRPYVWYRSRDIITQPSQQHVAW
APVQHDKNQSKDEAGNAGA
>C_glutamicum narI
MSNIFETFLWVAFPLCIAAIIIGISWRWRDQFGWTTTHSSQIYESKLLRIASPLFHGMV
FVITGHLMLAIPKSWTQAVGISDAAYHLIATIPGTIAGIAAVVGLGLIIRRVINKTVF
LSTSRSDKVMYLLGAAILSGFIATVSTQVFGGPHGYDYRETI SPWLRQLLIFNAQPELM
ADVPWQFKVHVIVAGFTLIALWPFTRLVHAFSAPVGVVTRPYVWYRSRDIITQPSQQHVAW
EPVRSVKNQLDNDKMHGA
>C_striatum narI
MDYFNNFLWVAFPLAIAAFVGVIFWRWRDQFGWTTTHSSQIYESKLLRLSSPLFHGMV
FVITGHLMLAIPKSWTRAVGINDHAYHLIATIPGSIAAVAVILGFLGLYRRVIRNSVF
LSTSSDKVMYFFLALALLSGTIATFSTQVFGGPHGYDYRETI SPWLRQLLIFNIHPEWM
ADVPWQFKVHVLGGFTIIVWPFTRLVHAFSAPVGVVTRPYVWYRSRDIITQPSQQHVAW
EPVRSVKNQLDNDKMHGA
>C_efficiens narI
MSNIFETFLWVAFPLCIAAIIIGISWRWRDQFGWTTTHSSQIYESKLLRLSSPLFHGMV
FVITGHLMLAIPKSWTAAVGISDAAYHLIATIPGTIAGVAVILGFLGLYRRVIRNSVF
LSTSKSDKVMYLLGAAILSGFIATVSTQVFGGPHGYDYRETI SPWLRQLLIFNAQPELM
ADVPWQFKVHVIVAGFTLIALWPFTRLVHAFSAPVGVVTRPYVWYRSRDIITQPSQQHVAW
DPVRSVKAQHDDEARHGA
>C_casei narI
MEYFENFLWVAFPLAIAVAFVGVIFWRWRDQFGWTTHTSTQIYESKLLRVSSPLFHGMV
FVITGHLMLAIPKSWTQVSGISDEFYHLIATYPGALAAIATCLGLAGLIYRRVIRNSVF
LATSRSKVMYLLGGAILTGTIATLTLQLFDIQGTHGYDYRESI SPWLRQLLIFNIQPE
LMSEVPWPFKLVLAGFTLIAVWPFTRLVHAFSAPVGVVIRPYVWYRSRDIITQPSQQHVAW
```

Figura 6 - Formato multifasta do arquivo de entrada para alinhamento múltiplo no CLUSTALW.

Etapa 2: Definição dos parâmetros. Os parâmetros utilizados para gerar o alinhamento não foram alterados, foram realizados na definição padrão, como sugeridos pelo site e pelos autores da ferramenta. Somente o formato do arquivo de saída foi alterado para formato FASTA;

Etapa 3: Submissão e execução do alinhamento.

3.1.6.3. Edição do alinhamento e análise de similaridade

Para tal, foi utilizado o software Jalview (<http://www.jalview.org/>). Os resíduos foram coloridos de acordo com as suas propriedades físico-químicas, como se segue:

Quadro 2 - Correlação entre as propriedades físico-químicas dos resíduos e as cores utilizadas no alinhamento múltiplo de sequências.

Propriedades Físico-Químicas	Resíduos
Alinfático/Hidrofóbico	ILVAM
Aromático	FWY
Positivo	KRH
Negativo	DE
Hidrofílico	STNQ
Conformacionalmente especial	PG
Cisteína	C

O índice de conservação em cada posição do alinhamento foi avaliado pela modificação na intensidade de cor em cada posição. As colunas mais conservadas em cada grupo apresentaram as respectivas cores em um tom mais forte, enquanto que as colunas com resíduos menos conservados apresentam as cores mais desbotadas dos seus respectivos resíduos.

3.2. Análises *in vitro*

3.2.1. Obtenção das amostras

3.2.1.1. Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens bacterianas utilizadas neste estudo para avaliação fenotípica e genotípica foram provenientes da bacterioteca do LGCM e estão apresentadas no Quadro 3. As referidas linhagens foram cultivadas em aerobiose a 37° C em meio - Infusão Cérebro-Coração (BHI), por 48 horas, após esse tempo foram testadas quanto a capacidade de redução de nitrato.

Quadro 3 - Linhagens utilizadas nas análises fenotípicas e genotípicas referentes à atividade da nitrato redutase.

Espécie	Animal/ Hospedeiro	País de origem	Laboratório referência	Acesso NCBI
<i>C. pseudotuberculosis</i> 31*	Bufalo	Egito, <i>Cairo University</i>	Mohammad Salah / Selim, S.A.	NC_017730.1
<i>C. pseudotuberculosis</i> 162*	Camelo	UK, <i>Veterinary Laboratories Agency</i>	Prof. Christopher G. Dowson (University of Warwick)	NC_018019.1
<i>C. pseudotuberculosis</i> 1002*	Cabra	Brazil, UFBA	UFBA	NC_017300.1
<i>C. pseudotuberculosis</i> 258*	Cavalo	Belgium, <i>University of Ghent</i>	Prof. Christopher G. Dowson (University of Warwick)	NC_017945.1
<i>C. pseudotuberculosis</i> 1/06 A*	Cavalo	USA, <i>University of California</i>	Dr Richard Walker (University of California)	NC_017308.1
<i>C. pseudotuberculosis</i> FRC41*	Humano	França, Hospital Necker-Enfants Malades	Dr. Samer Kayal	NC_014329.1
<i>C. pseudotuberculosis</i> C231*	Ovelha	Austrália, CSIRO	Robert Moore	NC_017301.1
<i>C. pseudotuberculosis</i> PAT10	Ovelha	Argentina, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco	Dra. Silvia Belchior	NC_017305.1
<i>C. pseudotuberculosis</i> 262	Bovino	Belgium, University of Ghent	Prof. Christopher G. Dowson (University of Warwick)	Não sequenciada
<i>C. pseudotuberculosis</i> I37	Bovino	Israel, The Hebrew University of Jerusalem	Dr. Nahum Shpigel	Não sequenciada
<i>C. pseudotuberculosis</i> EG37	Bufalo	Egito, Cairo University	Mohammad Salah / Selim, S.A.	Não sequenciada
<i>C. pseudotuberculosis</i> EG42	Bufalo	Egito, Cairo University	Mohammad Salah / Selim, S.A.	Não sequenciada
<i>C. pseudotuberculosis</i> CIP5297*	Cavalo	Kenia	Institut Pasteur, França.	Não sequenciada

*Linhagens testadas genotipicamente

3.2.2. Avaliação fenotípica das linhagens de *C. pseudotuberculosis*

3.2.2.1. Prova de redução de Nitrato

A redução de nitrato foi determinada semeando-se o microrganismo em caldo BHI contendo nitrato. Este meio é um caldo nutritivo suplementado com 0,5% de nitrato de potássio (KNO₃) como fonte de nitrato. Foi adicionado 0,1% de ágar o que lhe permitiu ser semi-sólido de modo a impedir a difusão do oxigênio para o meio e assim favorecer um ambiente anaeróbico necessário para a redução do nitrato. Após a incubação (48h a 37°C), a cultura foi examinada para verificar a presença de íons nitrito no meio. A capacidade do microrganismo para reduzir o nitrato a nitrito foi testada pela adição de dois reagentes: solução A (ác. Sulfanílico) e solução B (α-naftilamina). O nitrito, quando presente no meio, reagiu com esses reagentes produzindo uma mudança de cor imediata para vermelho (Figura 7).

Nos meios que continham as linhagens que não apresentaram nenhuma alteração da cor quando adicionados os dois reagentes (solução A e B), foi adicionado uma pequena quantidade de zinco em pó, com a finalidade de averiguar se havia presença de nitrato no meio. O princípio desta metodologia é devido à capacidade natural do zinco em reduzir o nitrato para nitrito. Sendo assim, após a adição do zinco, este irá reduzir o nitrato presente no meio para nitrito, o qual este último, por sua vez, irá reagir com os reagentes A e B, havendo, portanto, uma mudança imediata da cor do meio para vermelho. Isto comprova que apesar do nitrato estar presente no meio, as linhagens não foram capazes de reduzir o nitrato para nitrito, o que sugere a incapacidade das mesmas em produzir a enzima nitrato redutase essencial para a catálise de tal reação.

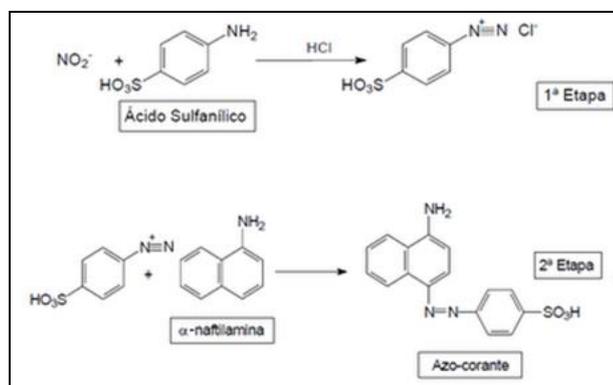


Figura 7 - Esquema de reações de duas etapas consecutivas no processo de análise dos resultados quanto à capacidade de redução de nitrato pelas linhagens estudadas. O composto formado (azo-corante) apresenta uma ligação entre os dois átomos de nitrogênio que ligam seus anéis.

3.2.3. Avaliação genotípica das linhagens de *C. pseudotuberculosis*

3.2.3.1. Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi feita da mesma maneira para todas as linhagens utilizadas nesse estudo. As amostras foram cultivadas em tubos Falcon de 50 ml (com 30 ml de caldo BHI). Esse material foi centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm. O pellet foi ressuspenso uma vez com 600 µL de Solução1 (EDTA – pH:8.0 – 10mM; Tris- HCl – pH : 7.0 - 10mM; NaCl – 300mM; água destilada q.s.p. 100 ml). A suspensão foi transferida para tubos de 2ml contendo *beads* que foram homogeneizados (Precellys) por 2 ciclos de 20 segundos a 6500rpm com intervalos de 30 segundos.

Posteriormente, nos tubos contendo *beads* foram adicionado fenol até completar o volume, em seguida foram agitados no vortex e centrifugados a 13000rpm por 7 minutos. A parte superior foi transferida para novos tubos, o qual foi adicionado 1 ml do fenol, foi agitado no vortex e centrifugado a 13000rpm por 7 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos o qual foi adicionado 1 ml de clorofórmio, agitado no vortex e centrifugado a 13000 rpm por 7 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos, em uma quantidade 500 µL, foi adicionado 1250 µL de etanol etílico, 50 µL de NaAc 3M e 5 µL de Glicogênio 20mg/ml. Foi deixado precipitar no freezer -20°C overnight. Após a precipitação, foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos, foi desprezado o sobrenadante e foi adicionado 1000 µL de etanol 70% gelado, e deixado no freezer por 15 minutos e centrifugado a 13000 rpm por 20 minutos, novamente o sobrenadante foi descartado e deixado secar na estufa a aproximadamente 60°C por 1 hora. Finalmente, o pellet foi ressuspenso em 50 µL de tampão BE.

3.2.3.2. Eletroforese em Gel de Agarose

Para checar a qualidade e presença do DNA total extraído cada amostra foi, aplicada em gel de agarose horizontal 1%, conforme descrito por Sambrook (1989).

3.2.3.3. Primer design

Para confirmar a presença dos genes responsáveis pela redução de nitrato nas espécies pertencentes ao biovar Equi, foram desenhados pares de primers para identificação do operon NAR.

Os primers usados neste estudo estão listados no Quadro 4. Todos os primers foram obtidos a partir das sequências dos genes correspondentes do novo genoma sequenciado de *C. pseudotuberculosis* 31 (Ramos et al., 2013). Para a construção dos mesmos, foi utilizado o software Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).

Quadro 4 - Primers e seus respectivos genes utilizados neste trabalho.

Genes	Primers	Sequencias (5' -> 3')	Tamanho PCR produtos (bp)	Fonte/Referência
narT	NART-F	GCTGAAGCAAGTTCGTGTCT	202	Presente trabalho
	NARK-R	GTAACGGTCAGAGAACCATCC		
narK	NARK-F	GCTGAAGCAAGTTCGTGTCT	202	
	NARK-R	GTAACGGTCAGAGAACCATCC		
narG	NARG-F	CAACGTGGTACCTGGTATCTG	200	
	NARG-R	CATAGGGAGAGCCGAGAACAA		
narH	NARH-F	GATTCTACTGACCGCCATCTC	196	
	NARH-R	ATCAGTACCTGTCATGCCTACC		
narJ	NARJ-F	CGTGATGGTATAGAGGTGCTG	198	
	NARJ-R	GTTGGAAGCAGTAGGGAAGGGAG		
narI	NARI-F	CTGTATCCACACAGGTGTTTCG	215	
	NARI-R	GTATCCTACAGGCGCTGAGA		

3.2.3.4. PCR

Foi realizado um PCR de gradiente para determinar a temperatura ideal de cada primer. Para amplificação de fragmentos contendo regiões do genoma foram utilizados os iniciadores citados no Quadro 4. As reações foram efetuadas da seguinte maneira: para amplificações de fragmentos de no máximo 200pb, utilizou-se 1 pmoles/ μ L de cada iniciador; 0,25 mM de dNTPs; 0,1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria); tampão IVB (Phoneutria) e 20 ng do DNA genômico extraído, para um volume final de 25 μ L. A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 95°C durante 4 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos; A temperatura de anelamento foi variável dependendo da combinação de

primers, durante 30 segundos; extensão a 72°C durante 5 minutos; e extensão final por 8 minutos a 72°C. Para amplificação de fragmentos com tamanho superior à 2000pb foi utilizada uma Taq DNA polimerase Long-Range (Quiagen). Todo o volume da reação foi aplicado em gel de agarose a 1% e realizada a resolução eletroforética. Após identificação da melhor temperatura de anelamento foi realizada amplificação sob as mesmas condições descritas, variando apenas a temperatura de anelamento quando necessário. Os produtos foram amplificados em gel de agarose 1% (p/v) e visualizados por coloração usando brometo de etídio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I – Análises *in silico* para identificação da cadeia respiratória de *C. pseudotuberculosis*

4.1. Identificação e caracterização do operon *nar* de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi através de análises *in silico*

4.1.1. Alinhamento múltiplo

As sequências de proteínas dos genes do operon *nar* usadas para identificação deste operon em *C. pseudotuberculosis* 31 foram obtidas a partir dos genomas de *C. diphtheriae*, *C. glutamicum* e *M. tuberculosis*. Outros organismos como *C. efficiens*, *C. striatum*, *C. casei*, *B. subtilis* e *E. coli*, que também apresentaram o operon *nar* em seus genomas, foram usados a fim de se observar a vizinhança e conservação gênica das mesmas (Figura 8).

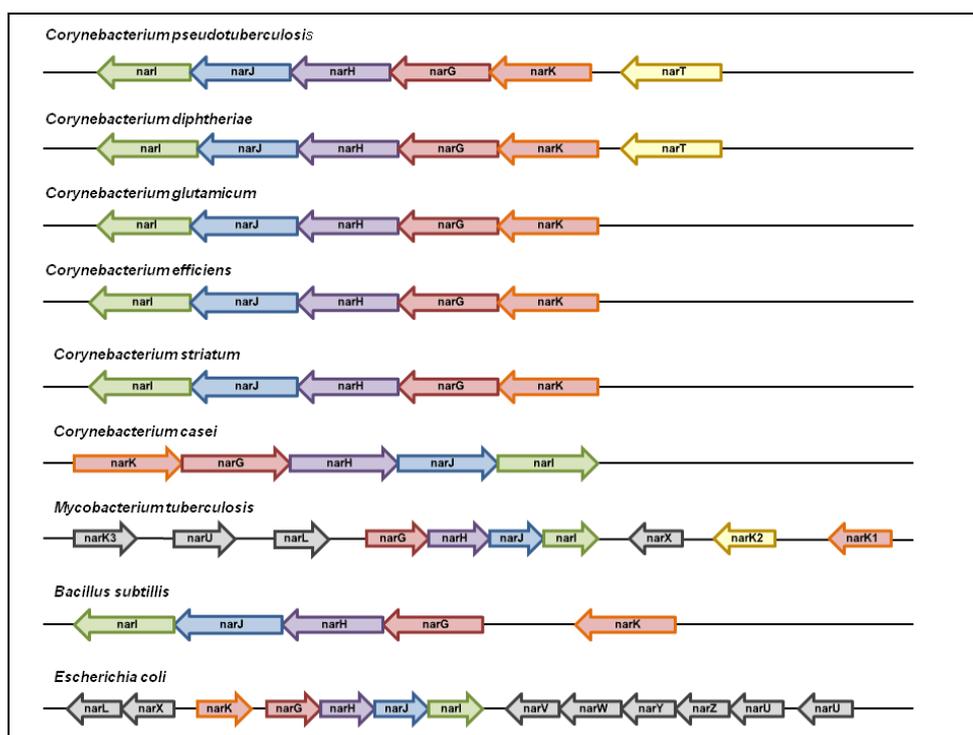


Figura 8 - Organização dos genes associados à redução de nitrato entre as linhagens utilizadas para o alinhamento múltiplo.

Pode-se observar a partir desta figura, que dentre os organismos pertencentes ao gênero *Corynebacterium* que possuem o cluster *narKGHJI*, somente *C. pseudotuberculosis* e *C. diphtheriae* possuem a montante deste operon o gene *narT* envolvido no transporte de nitrato e/ou nitrito. Além disso, apesar de estarem presentes em *C. diphtheriae*, tais genes ainda não tiveram sua função descrita na literatura. Por outro lado, estudos e análises genômicas de *C. glutamicum* revelaram que o cluster *narKGHJI* é potencialmente relevante na redução e transporte de nitrato, sendo esta bactéria capaz de utilizar nitrato como um aceptor final de elétrons.

Já em *M. tuberculosis* Malm *et al.* (2009) identificaram que o *narGHJI* media a redução de nitrato, não somente sobre condições anaeróbicas mas também sobre condições aeróbicas. Isto está de acordo com dados de Sohaskey & Wayne (2003), que relataram que a expressão de *narGHJI* não era dependente de anaerobiose (Malm *et al.*, 2009; Sohaskey & Wayne, 2003). Além disso, pode-se observar através da análise do genoma sequenciado a presença de quatro cópias de *narK*, nomeados de *narK1*, *narK2*, *narK3* e *narU*. Neste microrganismo, nenhum dos *narK* homólogos estão localizados à montante de *narGHJI*. Porém, *narK2* que está diretamente envolvido na regulação do nível de atividade da enzima, está localizado a montante do gene denominado *narX*, que foi proposto para codificar uma “nitrato redutase fundida”.

Já *E. coli* apresenta um conjunto extra de genes responsáveis por codificar uma segunda enzima nitrato redutase ligada à membrana, a qual é expressa em níveis muito baixos e de modo independente de oxigênio (FNR) e nitrato/nitrito, estando presente nas células apenas em níveis basais. Essa expressão constitutiva sugere que NarZYV poderia auxiliar a bactéria na transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio, representando assim, um mecanismo extra de adaptação a ambientes variáveis quanto aos diferentes níveis de oxigênio encontrados em ambientes variados.

As sequências foram alinhadas contra o genoma de *C. pseudotuberculosis* usando blastp, todos os genomas usados como referência apresentaram similaridade ao nível de aminoácidos entre os genes *narKGHJI*, através do programa ARTEMIS pôde-se estudar a disposição dos genes em *C. pseudotuberculosis* (Figura 9)

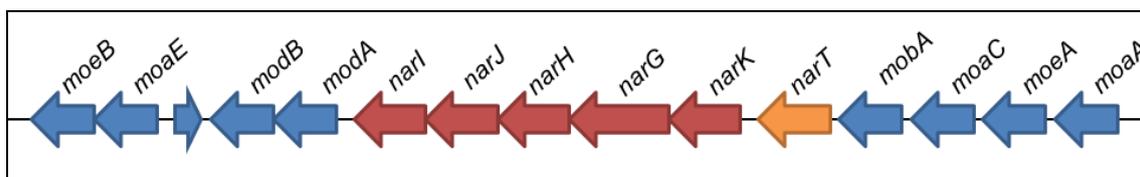


Figura 9 - Vizinhança do operon *narKGHJI* e do gene *narT* identificado no genoma de *C. pseudotuberculosis* 31. A organização gênica do operon *narKGHJI* de *C. pseudotuberculosis* 31 foi obtida a partir do programa ARTEMIS.

A esse respeito, é interessante observar que no genoma de *C. pseudotuberculosis* 31 são encontrados tanto a jusante como a montante dos genes envolvidos na redução de nitrato (*narKGHJI* e *narT*), genes envolvidos na biossíntese e transporte do cofator de molibdênio, sendo este cofator essencialmente importante para catálise enzimática da enzima nitrato redutase ligada à membrana, o qual representa o sítio ativo enzimático. Porém, a maneira pela qual tais genes são expressos e regulados nesta bactéria permanece ainda não compreendido e mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos de utilização dos mesmos sob determinadas condições específicas que podem ser encontradas por essa bactéria patogênica em seus hospedeiros.

4.1.2. Confirmação *in silico* do operon

A análise das sequências dos genes codificadores das subunidades protéicas, integrantes do operon *narKGHJI* de *C. pseudotuberculosis*, foi realizada através da ferramenta FGENESB disponível no site www.softberry.com, através dessa análise pôde ser observado que estes genes fazem parte de um operon e que são transcritos em uma única unidade transcricional (**Figura 10**).

Prediction of potential genes in microbial genomes							
Time: Tue Jan 1 00:00:00 2005							
Seq name: Cp31							
Length of sequence - 8262 bp							
Number of predicted genes - 5							
Number of transcription units - 1, operons - 1							
N	Tu/Op	Conserved pairs (N/Pv)	S		Start	End	Score
1	1 Op	1	.	-	CDS	1 -	780 277
2	1 Op	2	.	-	CDS	793 -	1470 234
3	1 Op	3	.	-	CDS	1474 -	3075 681
4	1 Op	4	.	-	CDS	3075 -	6797 1795
5	1 Op	5	.	-	CDS	6840 -	8171 553

Figura 10 - Resultado da análise das sequências dos genes codificadores das subunidades proteicas pertencentes ao operon *narKGHJI* de *C. pseudotuberculosis*, através da ferramenta FGENESB. Em torno do círculo vermelho está a indicação de que os genes são transcritos juntos, em uma única unidade transcricional.

4.1.3. Caracterização e análises *in silico* do metabolismo respiratório de *C. pseudotuberculosis* usando como modelo a via respiratória da nitrato redutase

A análise completa da cadeia respiratória e de cada uma das enzimas pertencentes a mesma pode ser visualizada nos anexos, daqui em diante será discutida com mais detalhes a via respiratória da nitrato redutase.

4.1.4. Nitrato redutase respiratória ligada à membrana de *C. pseudotuberculosis*

O cluster *narKGHI* e o gene *narT* foram identificados em *C. pseudotuberculosis*, a estrutura de cristalografia das proteínas NarG, NarH e NarI que formam o heterotrîmero da *narKGHI* presente em *E. coli* foi usada para verificar a conservação dos resíduos presentes no sítio catalítico e de ligação aos cofatores. A presença de domínios conservados permite inferir que a função destes genes em *C. pseudotuberculosis* se mantém conservada.

4.1.4.1 NarG

NarG é um membro de uma superfamília de enzimas bem definida, que utiliza um cofator de Mo-bisMGD para a atividade catalítica. A subunidade NarG de *E. coli* apresenta um aglomerado [4Fe-4S], designado FeS0 que é ligado por três cadeias laterais de Cisteínas (Cys 53 , Cys 57 , e Cys 92) e por uma histidina (His 49) (Figura 11A). A posição do FS0, entre o Mo-bisMGD e o cluster FS1 em NarH sugere um papel direto no mecanismo de transferência de elétrons. Arg94, que está perto de um dos centros de pterina da porção Mo-bisMGD, também faz uma ligação de hidrogênio com o ligante Cys93 de FS0, sugerindo um caminho para a transferência de elétrons de FS0 ao átomo de molibdênio (Mo) no sítio ativo. A importância da FS0 na transferência de elétrons para o sítio ativo é apoiada por estudos de mutagênese: uma mutação H49 leva à perda de atividade da enzima (Bertero et al., 2003; Fedor et al., 2014; Jormakka et al., 2004; Rothery et al., 2008).

O molibdênio é coordenado por seis ligantes: quatro átomos de enxofre do Mo-bisMGD e uma interação bidentado de ambos os lados dos átomos de oxigênio da cadeia do grupo carboxilato do resíduo aspartato 22 (Asp222) (Figura 11 B). Este, por sua vez, é altamente conservado em subunidades NarG de espécies bacterianas gram-negativas e gram-positivas e se encontra completamente enterrado dentro do sítio ativo, com o lado da face da cadeia carboxilato exposto a um ambiente relativamente hidrófobo (Val578 e Tyr220) e com uma surpreendente falta de ligações de hidrogênio a outros átomos de proteínas. Assim, a carga negativa do ligando

carboxilato neste ambiente é focado para uma interação ótima com o átomo de molibdênio do cofator (Bertero et al., 2003; Fedor et al., 2014; Jormakka et al., 2004; Rothery et al., 2008).

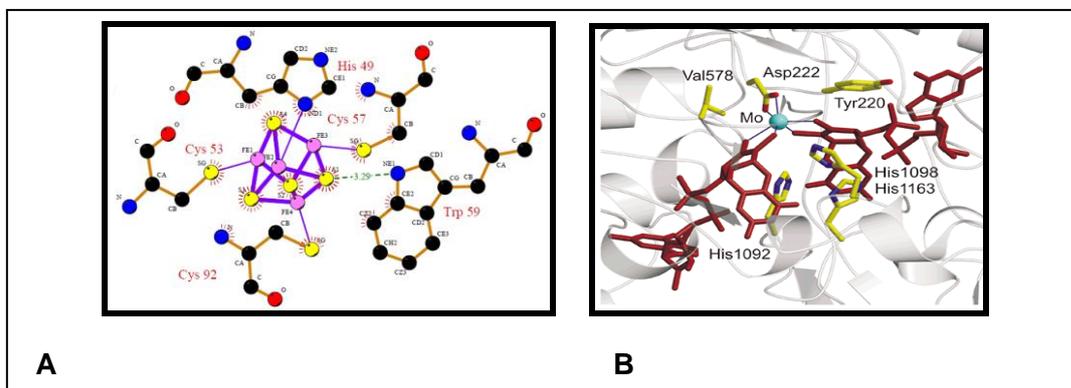


Figura 11 - Subunidade NarG de *E. coli*. Em **(A)** agrupamento [4Fe-4S] (FS0) de NarG coordenado por três Cisteínas e uma Histidina, todas altamente conservadas. Em **(B)** sítio ativo de NarG. O átomo de molibdênio é mostrado em azul e o Mo-bisMGD em marrom.

Em *C. pseudotuberculosis* linhagens 31 e 258 pertencentes ao biovar *equi*, NarG é composta por 1240 resíduos e a análise de similaridade realizada através do BLAST, a qual se encontra resumida no Quadro 5, evidenciou que a mesma é altamente conservada em termos de sequência com a proteína ortóloga de *C. diphtheriae*, apresentando 97% de identidade e 99% de similaridade com a mesma. Foram encontrados também altos valores de identidade com as subunidades NarG de outras espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, tais como, 80%, 79%, 77% e 75% com *C. striatum*, *C. casei*, *C. glutamicum* e *C. efficiens*, respectivamente. Além disso, foram encontrados também os valores de identidade de 56% com *M. tuberculosis* e 46% com *E. coli*.

Quadro 5: Resultados da busca por seqüências similares à *C. pseudotuberculosis* linhagem 31.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/Uniprot
Nitrate reductase alpha subunit NarG	<i>C. diphtheriae</i>	1.240	97%	99%	100%	Q6NJA9
	<i>C. striatum</i>	1.242	80%	88%	99%	C2CL40
	<i>C. casei</i>	1.258	79%	88%	99%	G710H9
	<i>C. glutamicum</i>	1.248	77%	87%	99%	Q8NR68
	<i>C. efficiens</i>	1.249	75%	86%	99%	Q8FQ39
	<i>M. tuberculosis</i>	1.232	56%	70%	99%	P9WJQ3
	<i>B. subtilis</i>	1.228	46%	64%	99%	P42175
	<i>E. coli</i>	1.247	46%	64%	98%	P09152

Na busca por domínios proteicos conservados na seqüência de NarG de *C. pseudotuberculosis* realizada por meio da ferramenta InterproScan5, foi encontrado, como esperado, que a mesma pertence a família “nitrate reductase, subunidade alfa” (Figura 12). Além disso, foi encontrado também o domínio “molibdopterina oxidoreductase, domínio 4Fe-4S” (resíduos 48 a 112) no qual o aglomerado FeS0 se encontra ligado a estrutura da mesma.

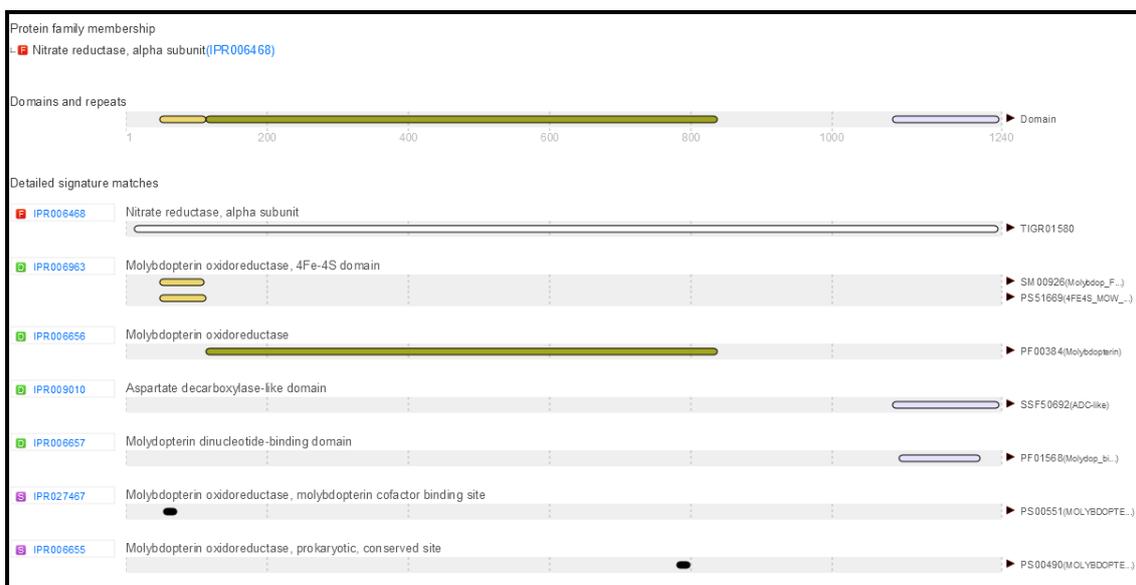


Figura 12 - Resultado da busca por domínios protéicos conservados na seqüência de aminoácidos do gene *narG* de *C. pseudotuberculosis*. A figura mostra que o gene *narG* possui o domínios protéicos molibdopterina oxidoreductase, domínio 4Fe-4S.

Através de um alinhamento múltiplo entre as sequências de NarG de *C. pseudotuberculosis* e as de proteínas ortólogas encontradas pelo BLAST, foi comprovado que os três resíduos de cisteínas e o resíduo de histidina responsáveis pela ligação do aglomerado FS0 em *E. coli*, encontra-se conservado em todas as sequências analisadas, e corresponde aos resíduos C-59, C-63, C-68 e H-55 na sequência de NarG de *C. pseudotuberculosis*. O resíduo de aspartato (Asp222) no qual o átomo de molibdênio se encontra ligado na estrutura de NarG de *E. coli* também apresenta-se conservado em *C. pseudotuberculosis* (corresponde ao resíduo Asp228), assim como também em todas as outras sequências referentes aos outros organismos utilizados no alinhamento múltiplo.

A sequência proteica usada como referência foi a de *E. coli*, pois é a única para a qual uma estrutura de cristal está disponível. O Quadro 6 mostra um resumo referente aos resultados deste alinhamento, no qual são mostrados os resíduos correspondentes na sequência de NarG de *C. pseudotuberculosis*, como também a conservação de tais resíduos entre as sequências alinhadas e a função que cada um desempenha na estrutura da proteína de referência.

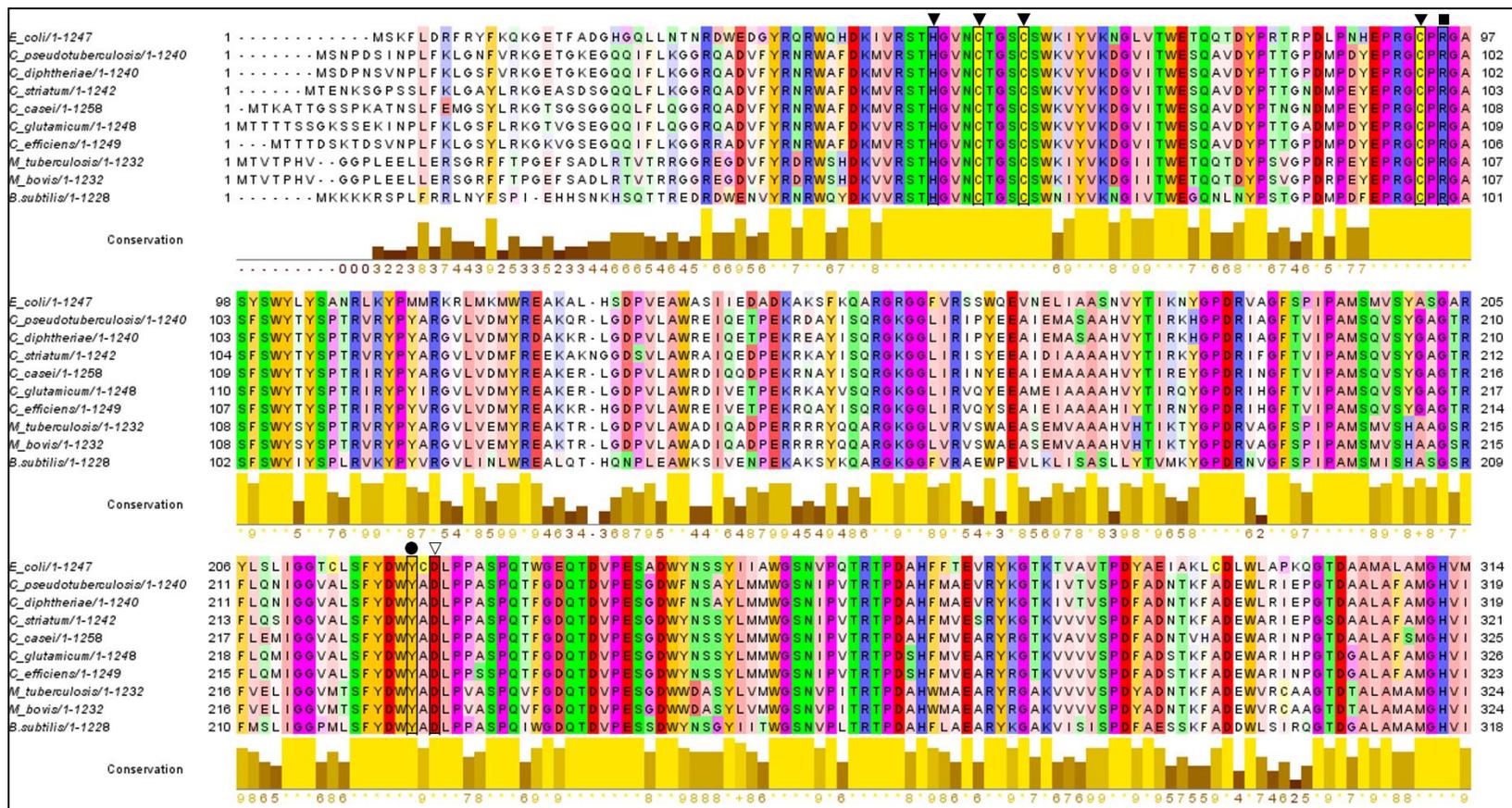


Figura 13 - Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarG de *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, *C. casei*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *B. subtilis*. Os triângulos de cor preta representam os três resíduos de cisteína e o resíduo de histidina responsáveis pela ligação ao aglomerado [4Fe-4S] na estrutura de *E. coli*. O triângulo de cor branca representa o resíduo de aspartato responsável pela ligação do átomo de molibdênio do cofator Mo-bisMGD presente no sítio ativo na estrutura de *E. coli*. Os círculos pretos representam os resíduos de valina e tirosina que conferem ambiente hidrofóbico no sítio ativo. Os círculos brancos representam os três resíduos de histidina presentes no sítio ativo que conferem carga positiva ao sítio ativo. O quadrado preto representa o resíduo de arginina responsável pelo caminho para a transferência de elétrons de FS0 ao Mo átomo no sítio ativo.

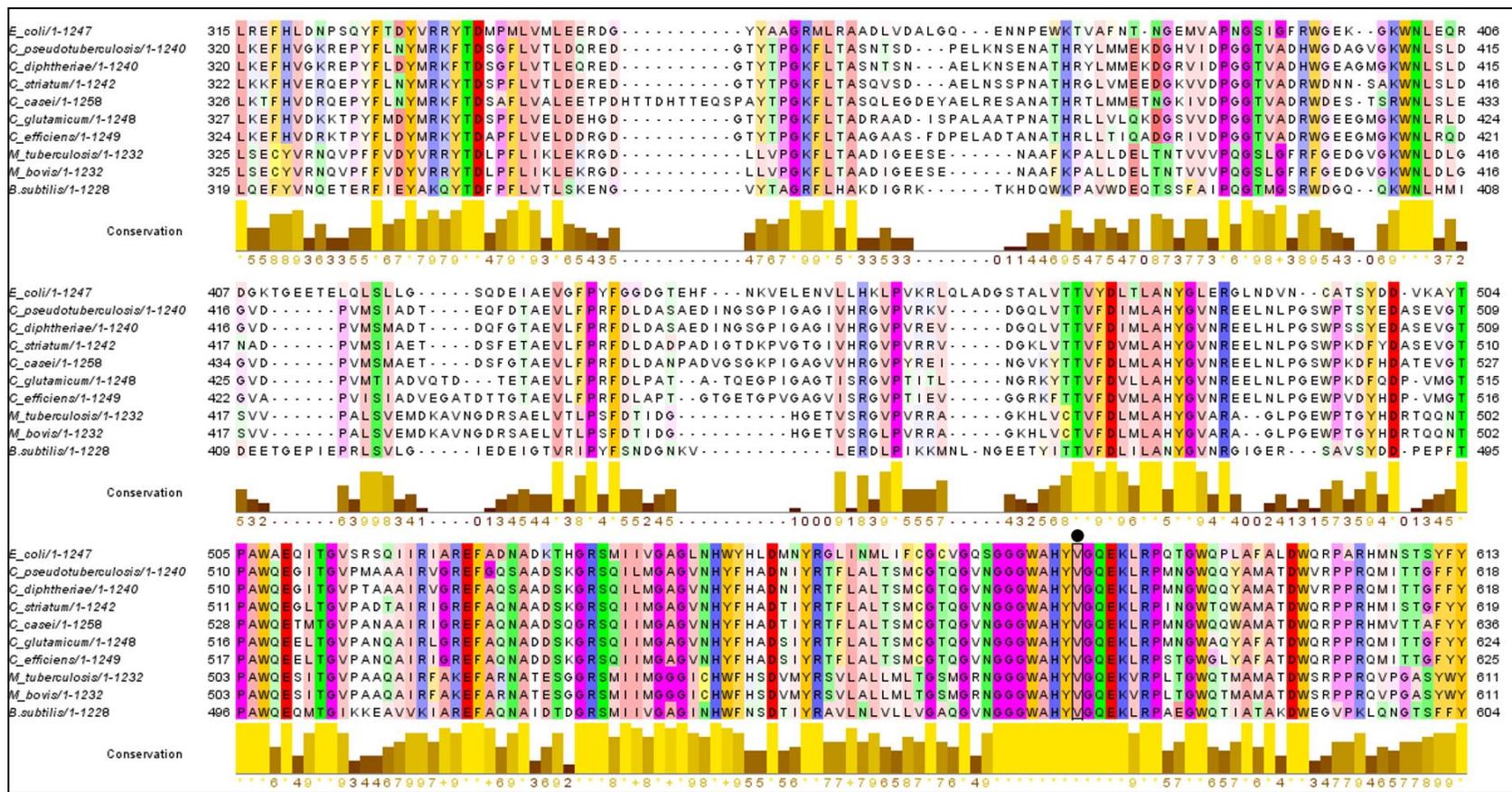


Figura 13 (continuação) - Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarG de *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, *C. casei*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *B. subtilis*. Os triângulos de cor preta representam os três resíduos de cisteína e o resíduo de histidina responsáveis pela ligação ao aglomerado [4Fe-4S] na estrutura de *E. coli*. O triângulo de cor branca representa o resíduo de aspartato responsável pela ligação do átomo de molibdênio do cofator Mo-bisMGD presente no sítio ativo na estrutura de *E. coli*. Os círculos pretos representam os resíduos de valina e tirosina que conferem ambiente hidrofóbico no sítio ativo. Os círculos brancos representam os três resíduos de histidina presentes no sítio ativo que conferem carga positiva ao sítio ativo. O quadrado preto representa o resíduo de arginina responsável pelo caminho para a transferência de elétrons de FS0 ao Mo átomo no sítio ativo.

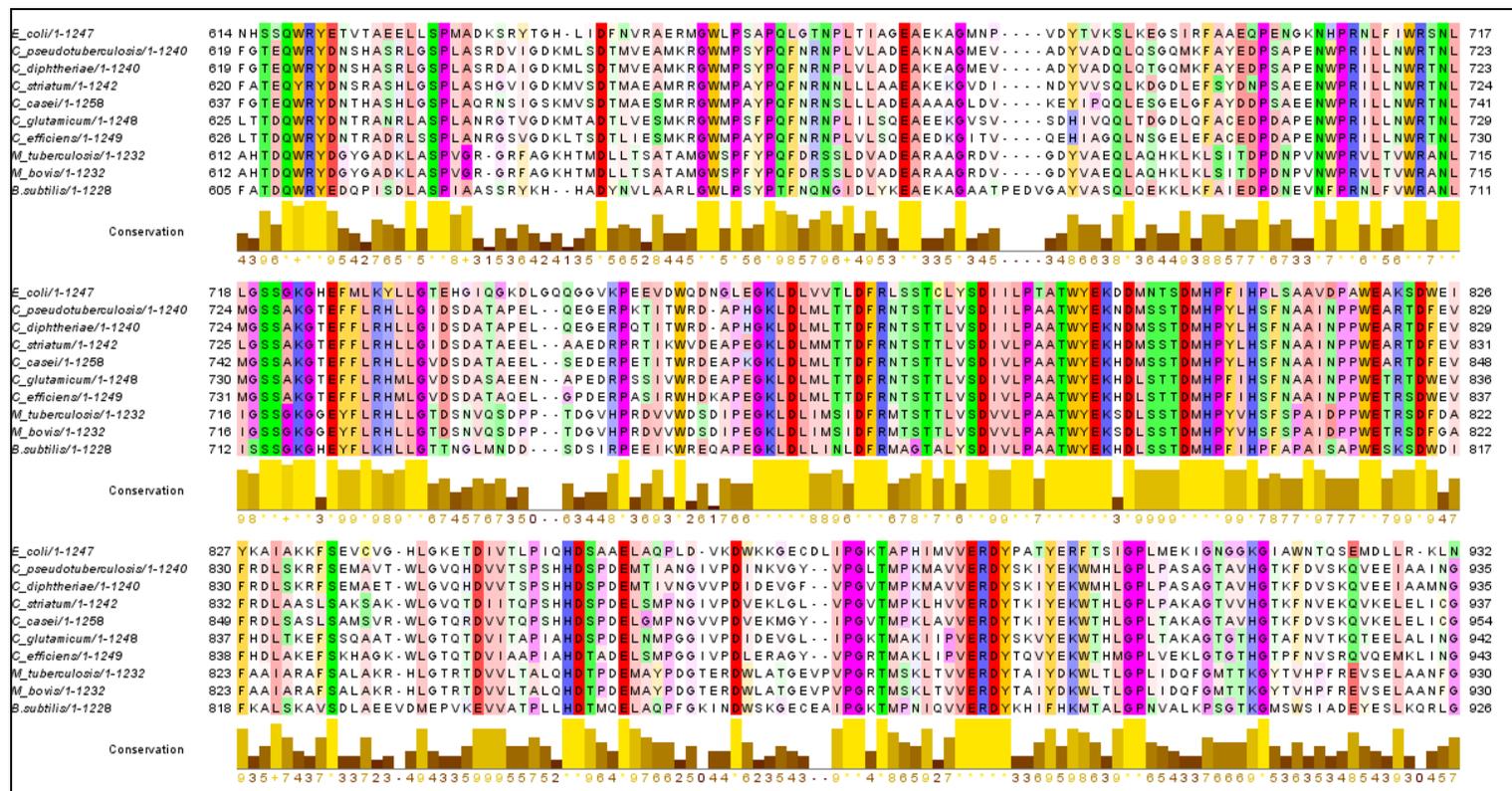


Figura 13 (continuação) - Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarG de *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, *C. casei*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *B. subtilis*. Os triângulos de cor preta representam os três resíduos de cisteína e o resíduo de histidina responsáveis pela ligação ao aglomerado [4Fe-4S] na estrutura de *E. coli*. O triângulo de cor branca representa o resíduo de aspartato responsável pela ligação do átomo de molibdênio do cofator Mo-bisMGD presente no sítio ativo na estrutura de *E. coli*. Os círculos pretos representam os resíduos de valina e tirosina que conferem ambiente hidrofóbico no sítio ativo. Os círculos brancos representam os três resíduos de histidina presentes no sítio ativo que conferem carga positiva ao sítio ativo. O quadrado preto representa o resíduo de arginina responsável pelo caminho para a transferência de elétrons de FS0 ao Mo átomo no sítio ativo.

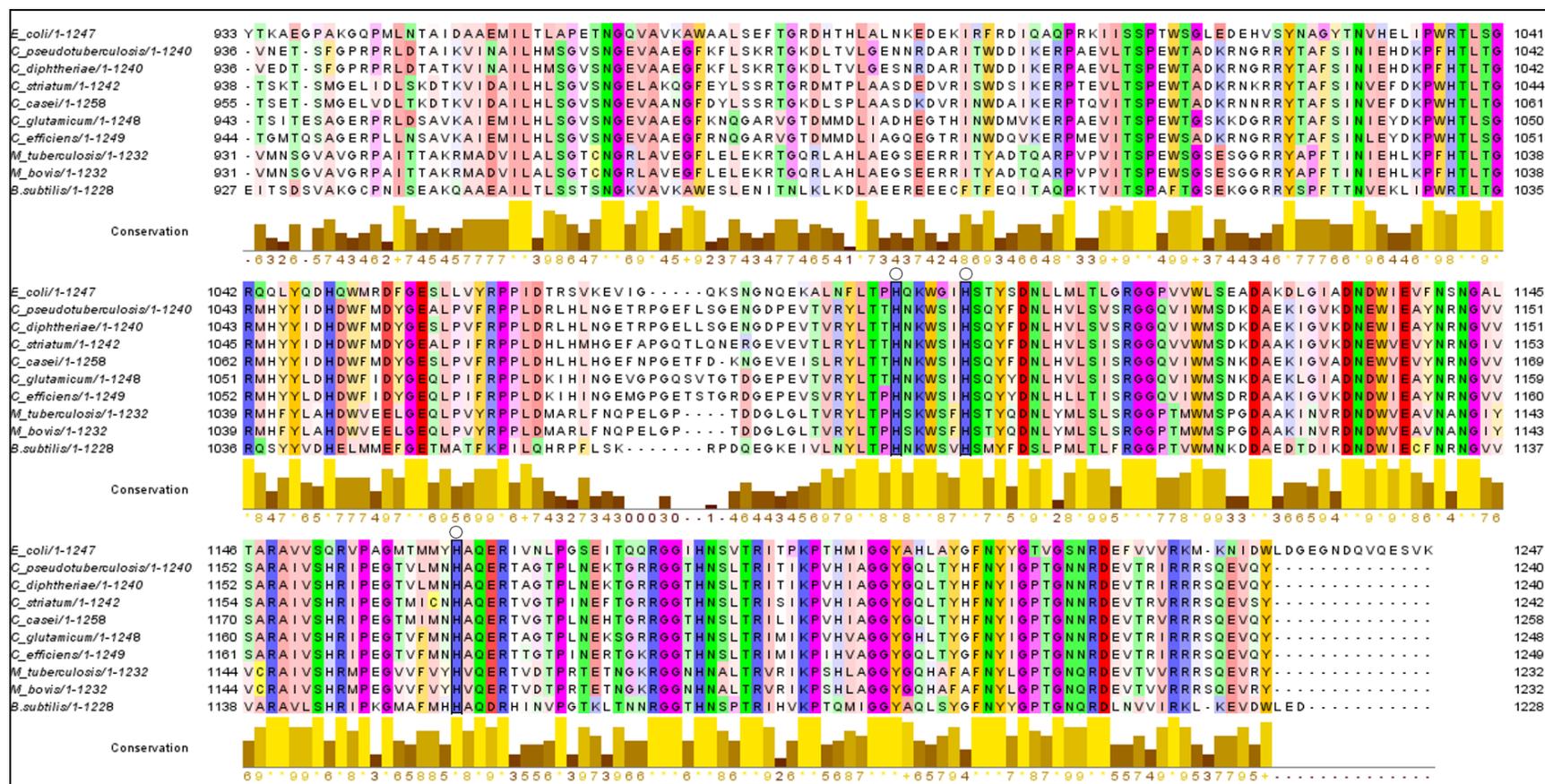


Figura 13 (continuação) - Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarG de *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, *C. casei*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *B. subtilis*. Os triângulos de cor preta representam os três resíduos de cisteína e o resíduo de histidina responsáveis pela ligação ao aglomerado [4Fe-4S] na estrutura de *E. coli*. O triângulo de cor branca representa o resíduo de aspartato responsável pela ligação do átomo de molibdênio do cofator Mo-bisMGD presente no sítio ativo na estrutura de *E. coli*. Os círculos pretos representam os resíduos de valina e tirosina que conferem ambiente hidrofóbico no sítio ativo. Os círculos brancos representam os três resíduos de histidina presentes no sítio ativo que conferem carga positiva ao sítio ativo. O quadrado preto representa o resíduo de arginina responsável pelo caminho para a transferência de elétrons de FS0 ao Mo átomo no sítio ativo.

Quadro 6 - Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NarG de *C. pseudotuberculosis* e *E. coli* utilizadas no alinhamento múltiplo. É mostrada a posição dos resíduos nas sequências de *E. coli* e *C. pseudotuberculosis* como também a função de cada resíduo na estrutura de NarG de *E. coli*, assim como a conservação de tais resíduos entre as sequências de todos os organismos utilizadas no alinhamento múltiplo.

Resíduos		Conservação	Função
<i>E. coli</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>		
His49(H)	His55	100%	Esquema de coordenação de FS0 por uma Histidina e três Cisteínas.
Cys53(C)	Cys 59		
Cys57(C)	Cys 63		
Cys92(C)	Cys 98		
Asp222 (D)	Asp 228	100%	Ligação Mo-bisMGD (O molibdênio é coordenado por seis ligantes: quatro <i>cis</i> -átomos de enxofre do Mo-bisMGD e uma interação bidentado de ambos os lados átomos de oxigênio da cadeia do grupo carboxilato de Asp222.
Val 578 (V)	Val 584	100%	Asp222 está completamente enterrado dentro do sítio ativo, com um lado da face da cadeia carboxilato exposto a um ambiente relativamente hidrófobo
Tyr 220 (Y)	Tyr 226		
His1092(H)	His 1099	100%	Lado positivo do sítio ativo (ajuda na interação do Mo do cofator com a carga negativa do ligando carboxilato).
His1098(H)	His 1105		
His1163(H)	His 1170		
Arg 94(R)	Arg 100	100%	Arg94, que está perto de um dos centros de pterina da porção Mo-bisMGD,

4.1.4. 2. NarH

A subunidade NarH de *E.coli* (512 resíduos) pertence a superfamília de subunidades de transferência de elétrons (denominadas ferredoxinas, pois são proteínas que possuem em sua estrutura aglomerados de ferro-enxofre) de oxidoredutases bacterianas. NarH possui três aglomerados [4Fe-4S] (FS1, FS2 e FS3) e um aglomerado [3Fe-4S] (FS4) os quais são coordenados em sua estrutura por um padrão previamente previsto por análises mutacionais. Tais aglomerados de ferro-enxofre são classificados em duas classes distintas levando-se em consideração as suas propriedades redox. FS1 e FS4 constituem a classe de maior potencial com o potencial médio de +130mV e +180mV, respectivamente. Já a classe de baixo potencial é composta por FS2 e FS3, os quais possuem, respectivamente, o potencial médio de -420mV e -55mV (Bertero et al., 2003; Fedor et al., 2014; Jormakka et al., 2004).

A estrutura geral de NarH é composta por uma região central, uma região "linker", e uma extensão C-terminal. A região central coordena um [3Fe-4S] e três [4Fe-4S] aglomerados, com FS1, FS2 e FS3 coordenados por quatro resíduos de cisteína e FS4 por três resíduos de tal aminoácido (Figura 14).

A estrutura de tal subunidade revela que os aglomerados são dispostos em dois pares, cada qual contendo um baixo e alto potencial (FS3/FS2 e FS4/FS1). No entanto, o modo pelo qual é coordenada a transferência de elétrons entre tais aglomerados tem sido foco de muitos questionamentos e hipóteses. Devido à barreira endergônica, foi inicialmente sugerido que os aglomerados de baixo potencial não podem estar envolvidos na transferência de elétrons ou que pode haver várias vias de transferência dos mesmos através da subunidade NarH. No entanto, a estrutura de cristal de tal subunidade ilustra que os aglomerados de ferro-enxofre são alinhados em uma única cadeia e que a transferência de elétrons seria desfavorável se caso alguns destes aglomerados não estivessem envolvidos na mesma, devido ao aumento da distância de transferência de elétrons. Além disso, um arranjo semelhante de centros de alto e baixo potencial é visto em várias outras oxidoredutases, e tem sido sugerido que a transferência de elétrons endergônica pode ser um componente comum de cadeias de transporte de elétrons. Outra hipótese sugerida é que o potencial redox dos aglomerados ferro-enxofre pode sofrer uma variação durante a transferência de elétrons para níveis que permitam que tal transferência ocorra eficientemente (Bertero et al., 2003; Jormakka et al., 2004; Rothery et al., 2008).

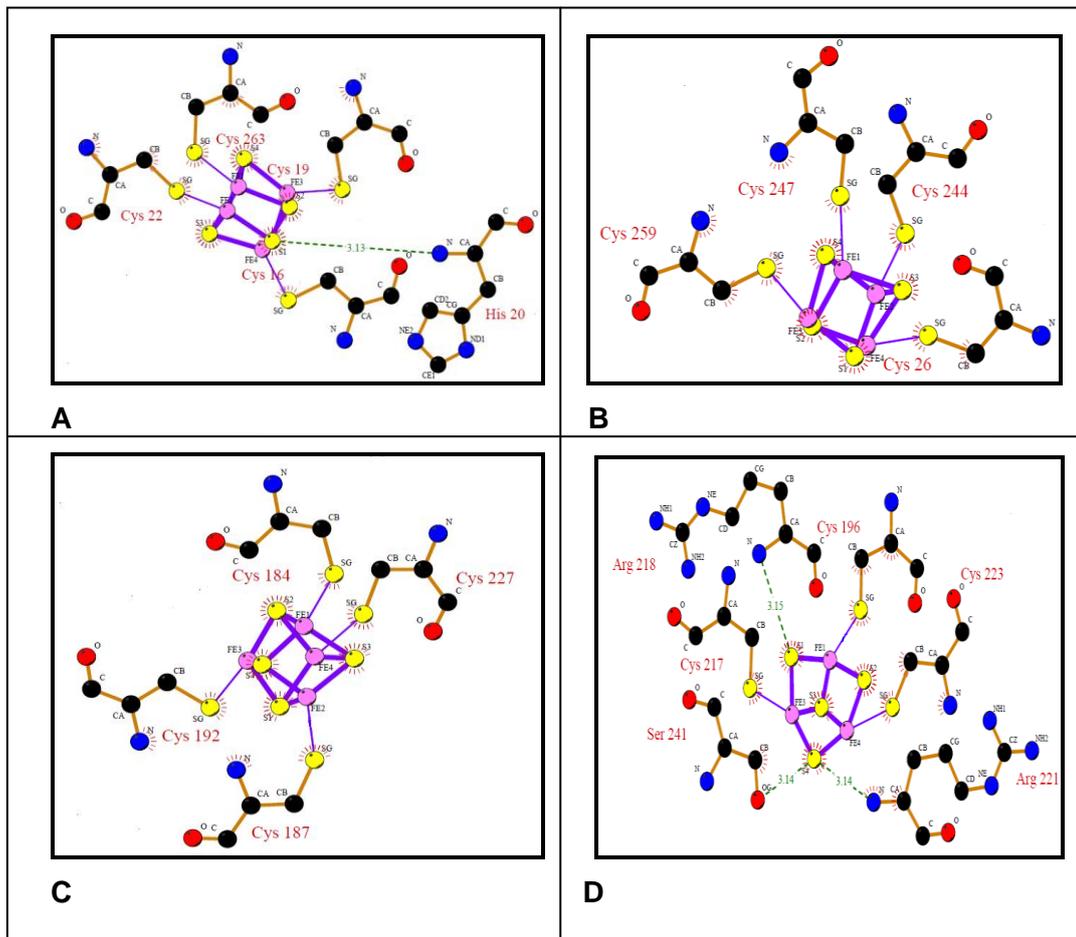


Figura 14 - Aglomerados de ferro-enzofre presentes na estrutura de *narH* de *E. coli*. Em **A**: Aglomerado [3Fe-4S] (FS4) de NarH, com seus átomos de ferro ligados aos resíduos conservados. Em **B**: Aglomerado [4Fe-4S] (FS3) de NarH, com seus átomos de ferro ligados aos resíduos conservados de cisteínas Cys187, Cys 192, Cys 227 e Cys 184. Em **C**: Aglomerado [4Fe-4S] (FS2) de NarH, com seus átomos de ferro ligados aos resíduos conservados de cisteínas Cys26, Cys 244, Cys 247 e Cys 259. Em **D**: Aglomerado [4Fe-4S] (FS1) de NarH, com seus átomos de ferro ligados aos resíduos conservados de cisteínas Cys22, Cys 263, Cys 19 e Cys 16.

A região “linker” é inserida entre os dois subdomínios na coordenação dos aglomerados de ferro-enzofre e forma uma extensa ligação entre as subunidades NarG e NarH. Já a extensão C-terminal forma um grande domínio de forma irregular, com baixa similaridade de sequência entre as proteínas NarH de organismos diferentes. Uma função possível para este domínio pode estar na mediação de contato entre os monômeros em estado oligomérico eficientemente (Bertero et al., 2003; Jormakka et al., 2004; Rothery et al., 2008).

Nas linhagens 31 e 258 de *C. pseudotuberculosis* pertencentes ao biovar Equi, NarH é composta por 533 resíduos e a análise de similaridade realizada através do BLAST mostrou que a mesma é altamente conservada em termos de sequência com as proteínas ortólogas encontradas no gênero *Corynebacterium*, apresentando 95%, 79%, 77% identidade com *C. diphtheriae* e *C. glutamicum*, respectivamente (Quadro 7). Foram encontrados também os valores de 64% e 59% de identidade sequência com as proteínas NarH de *M. tuberculosis* e *B. subtilis*, respectivamente. Em relação à proteína ortóloga de *E. coli*, NarH de *C. pseudotuberculosis* também apresentou um valor de identidade consideravelmente alto entre suas sequências, sendo 54% idêntica à mesma em relação a sua estrutura primária.

Quadro 7: Resultados da busca por sequências similares à linhagem 31.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/Uniprot
Nitrate reductase beta chain (NarH)	<i>C. diphtheriae</i>	533	95%	98%	100%	H2G670
	<i>C. glutamicum</i>	531	79%	89%	100%	S5Y1U5
	<i>C. efficiens</i>	533	77%	88%	99%	Q8FQ40
	<i>C. striatum</i>	531	77%	88%	99%	C2CL39
	<i>C. casei</i>	534	74%	86%	100%	G7I0I0
	<i>M. tuberculosis</i>	538	64%	75%	99%	A0A049E025
	<i>B. subtilis</i>	487	59%	76%	88%	P42176
	<i>E. coli</i>	512	54%	72%	90%	P11349

Na busca por domínios proteicos conservados na sequência de NarH de *C. pseudotuberculosis* (Figura 15) realizada por meio da ferramenta InterproScan5, foi encontrado, como esperado, que a mesma pertence a família “Nitrato redutase, subunidade beta”. Foram identificados também o domínio “ferredoxina do tipo [4Fe-4S], domínio de ligação ao aglomerado ferro-enxofre”, no qual este último se encontra ligado a cadeia polipeptídica através de quatro ligações covalentes entre resíduos de cisteínas conservados, como também o domínio “nitrato redutase respiratória subunidade beta, C-terminal” o qual possivelmente desempenha um papel na interação entre as três subunidades da enzima (Bertero et al., 2003; Jormakka et al., 2004).

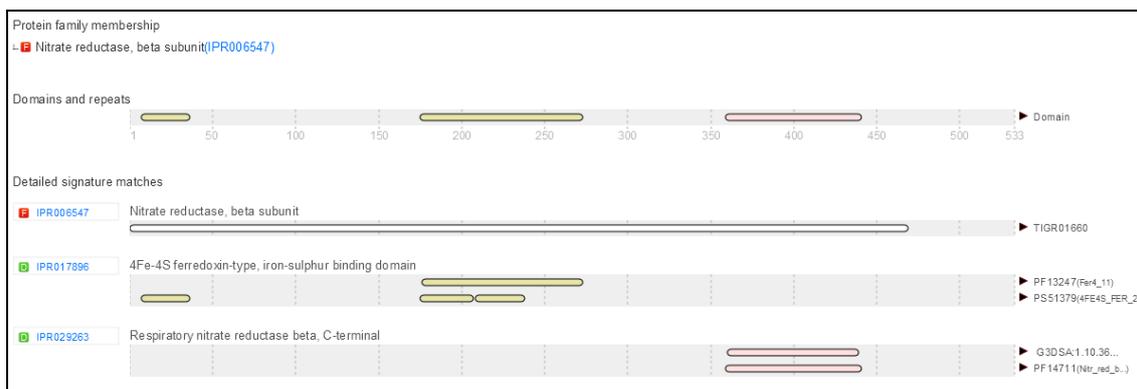


Figura 15 - Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos do gene *narH* de *C. pseudotuberculosis*. A figura mostra que a proteína NarH possui o domínios proteicos ferredoxina do tipo [4Fe-4S], o qual pode estar relacionado com a interação entre as três subunidades da enzima.

Através de um alinhamento múltiplo entre as sequências de NarH de *C. pseudotuberculosis* e as de proteínas ortólogas encontradas pelo BLAST, foi comprovado que os nove resíduos de cisteínas responsáveis por coordenar três aglomerados [4Fe-4S] e um aglomerado [3Fe-4S] são conservados em todas as sequências analisadas (Figura 16). A sequência proteica usada como referência foi a de *E. coli*, pois é a única para a qual uma estrutura de cristal está disponível.

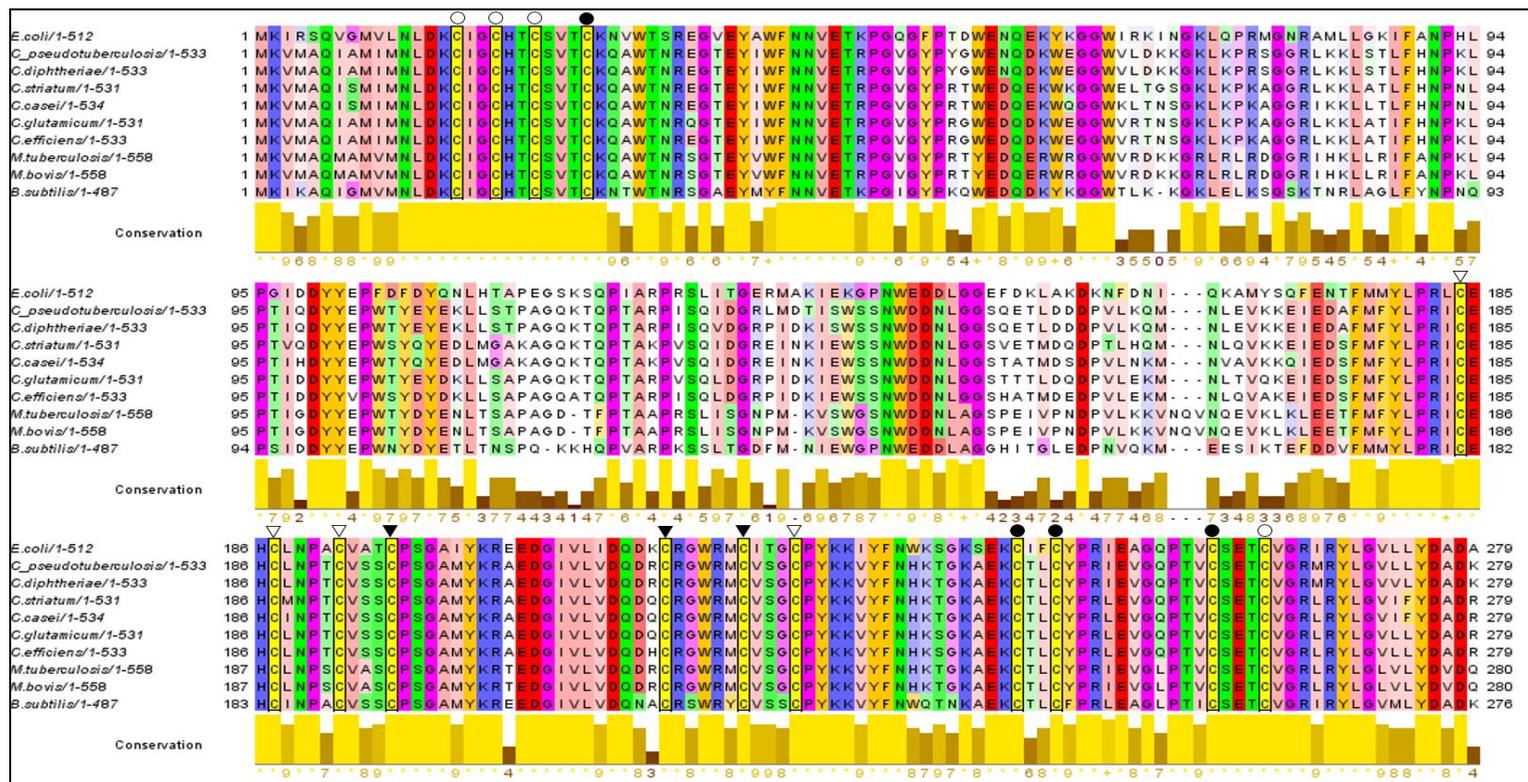


Figura 16 - Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarH de *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, *C. casei*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *B. subtilis*. Os triângulos pretos representam os resíduos responsáveis pela ligação de Ferro do agrupamento FS4. Os triângulos brancos representam os resíduos responsáveis pela ligação de Ferro do agrupamento FS3. Os círculos pretos representam os resíduos responsáveis pela ligação de Ferro do agrupamento FS2. Os círculo brancos representam os resíduos responsáveis pela ligação de Ferro do agrupamento FS1.

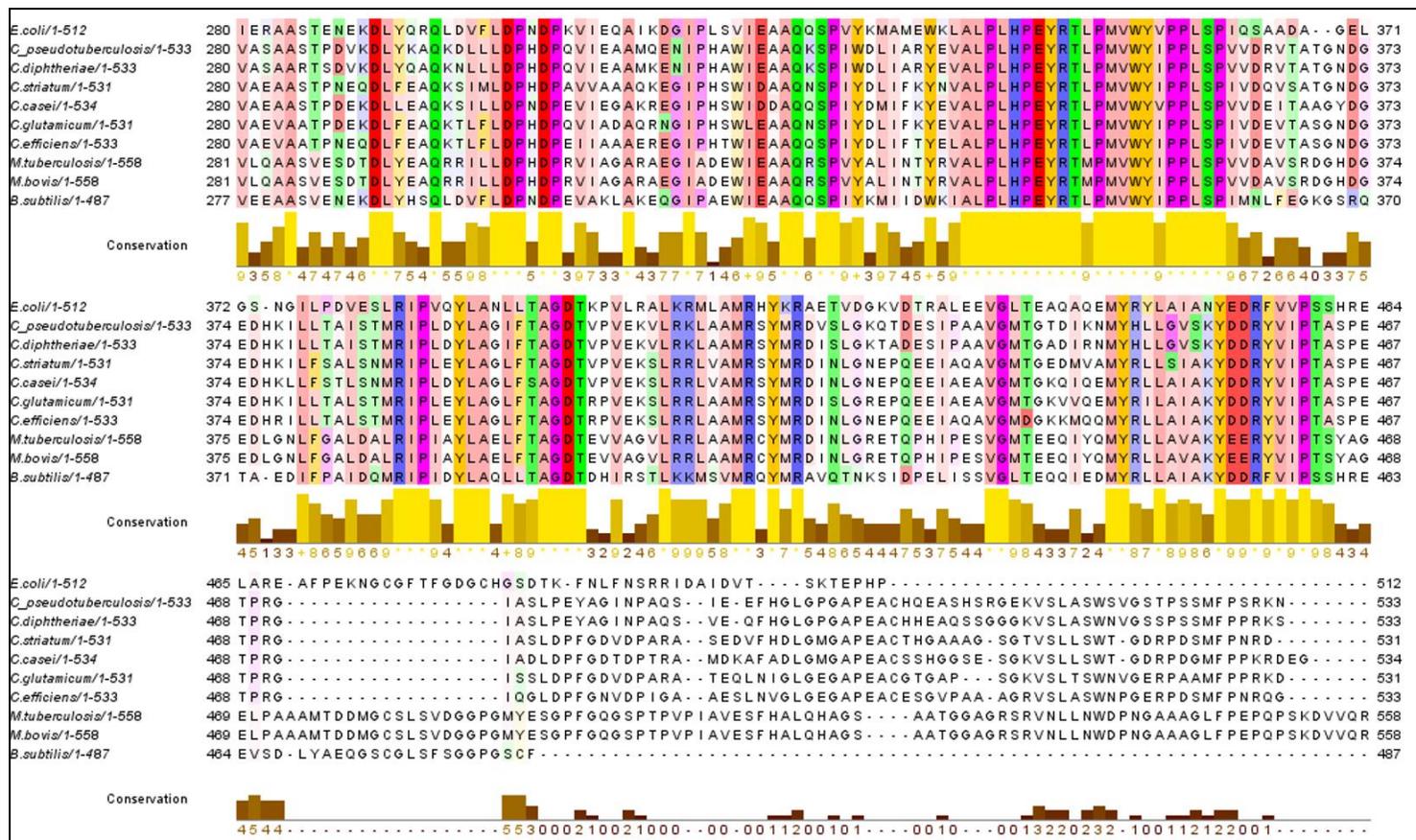


Figura 16 (continuação) - Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarH de *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, *C. casei*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *B. subtilis*. Os triângulos pretos representam os resíduos responsáveis pela ligação de Ferro do agrupamento FS4. Os triângulos brancos representam os resíduos responsáveis pela ligação de Ferro do agrupamento FS3. Os círculos pretos representam os resíduos responsáveis pela ligação de Ferro do agrupamento FS2. Os círculo brancos representam os resíduos responsáveis pela ligação de Ferro do agrupamento FS1.

O Quadro 8 mostra um resumo referente aos resultados deste alinhamento, no qual são mostrados os resíduos correspondentes na sequência de NarH de *C. pseudotuberculosis*, como também a conservação de tais resíduos entre as sequências alinhadas e a função que cada um desempenha na estrutura da proteína de referência.

Quadro 8 - Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NarH de *C. pseudotuberculosis* e *E. coli* utilizadas no alinhamento múltiplo. É mostrada a posição dos resíduos nas sequências de *E. coli* e *C. pseudotuberculosis* como também a função de cada resíduo na estrutura de NarH de *E. coli*, assim como a conservação destes resíduos nas sequências primárias de todas as espécies utilizadas no alinhamento múltiplo.

Resíduos		Conservação	Função
<i>E. coli</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>		
Cys196(C)	Cys 196	100%	Ligação aos átomos de Ferro do agrupamento FS4 [3Fe-4S]
Cys217(C)	Cys 217		
Cys223(C)	Cys 223		
Cys184(C)	Cys 184	100%	Ligação aos átomos de Ferro do agrupamento FS3 [4Fe-4S]
Cys187(C)	Cys 187		
Cys192(C)	Cys 192		
Cys 227(C)	Cys 227		
Cys26(C)	Cys 26	100%	Ligação aos átomos de Ferro do agrupamento FS2 [4Fe-4S]
Cys244(C)	Cys 244		
Cys247(C)	Cys 247		
Cys259(C)	Cys 259		
Cys16(C)	Cys 16	100%	Ligação aos átomos de Ferro do agrupamento FS1 [4Fe-4S]
Cys19(C)	Cys 19		
Cys22(C)	Cys 22		
Cys263 (C)	Cys 263		

4.1.4.3. NarI

A subunidade transmembranar NarI ancora NarGH para o lado citoplasmático da membrana e fornece a ligação entre a quinona e o local de oxidação, referido como "sítio Q". Esta subunidade coordena dois hemes, um dos quais está localizado em direção ao lado citoplasmático de NarI e é referido como heme proximal (heme b_P), enquanto que o outro está localizado em direção ao lado periplasmático da mesma e é referido como o heme distal (heme b_D). Tais hemes funcionam como mediadores na transferência de elétrons a partir do sítio Q para os clusters [Fe-S] em NarH. Cada heme tem um átomo de ferro coordenado por dois grupos de histidina: His56 e His205 coordenam b_P (Figura 17A); His66 e His187 coordenam heme b_D (Figura 17B) (Bertero et al., 2003; Fedor et al., 2014; Jormakka et al., 2004).

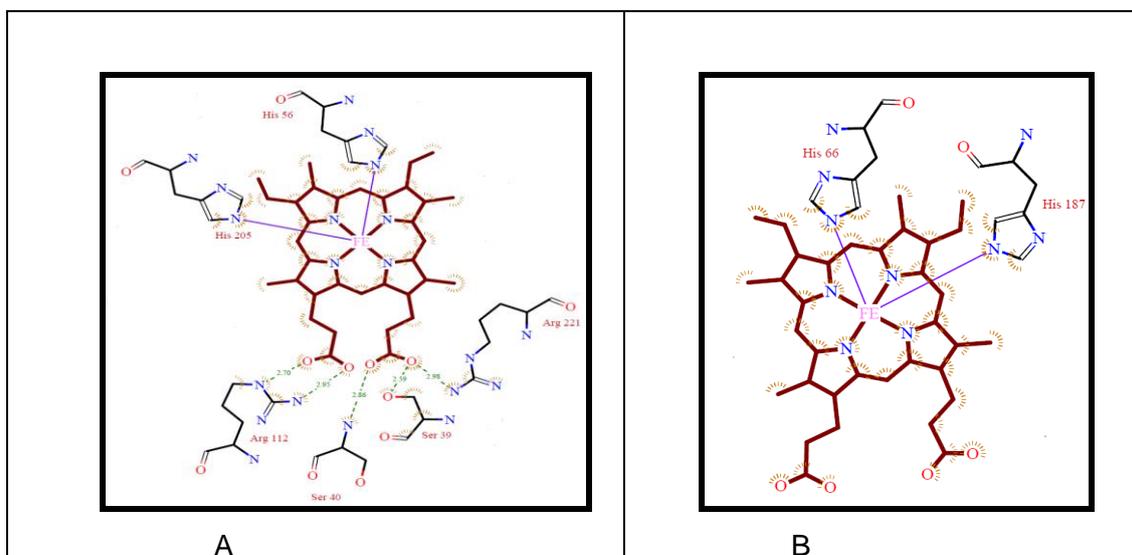


Figura 17: Grupamentos heme presentes na estrutura de NarI de *E. coli*. Em **A**: Heme b_P de NarI de *E. coli*. O átomo de Fe de heme está ligado aos resíduos His66 e His187 *schematic LigPlot representation*

NarI contém cinco hélices transmembrânicas e uma cauda C-terminal se estende em direção ao citoplasma, interagindo com tanto NarH e NarG. Este segmento C-terminal apresenta resíduos altamente conservados na família de proteínas NarI: Tyr213, Arg216 e Arg222 estão todos envolvidos em interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, subjacente a importância desta extensão para formação heterotrímero NarGHI (Bertero et al., 2003; Fedor et al., 2014; Jormakka et al., 2004).

Em *C. pseudotuberculosis* as hélices foram preditas através do programa TMHMM2 (Figura 18). NarI de *C. pseudotuberculosis* apresentou cinco hélices transmembrânicas, o que está de acordo com a literatura quando comparado à estrutura de cristal de *E. coli*.

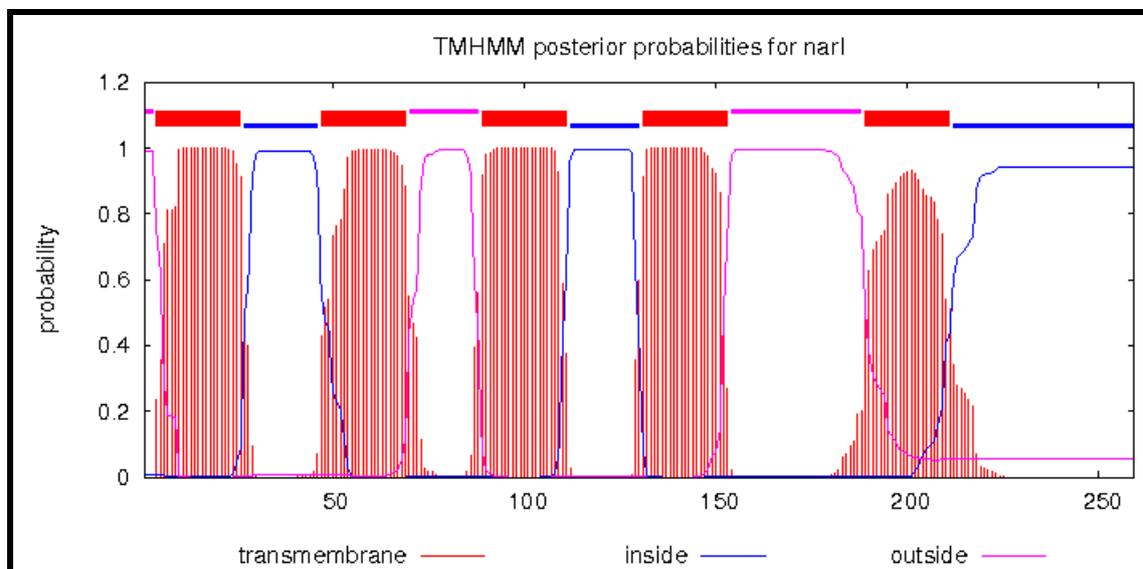


Figura 18 - Predição de localização subcelular da proteína NarI de *C. pseudotuberculosis*, feita com o software de predição de proteínas de membrana TMHMM 2.0. A probabilidade referente ao fato de determinado aminoácido estar em regiões transmembranas, na face citoplasmática ou extracelular, é registrada em vermelho, azul e rosa, respectivamente.

Em linhagens de *C. pseudotuberculosis* pertencentes ao biovar Equi, a NarI é composta por 259 resíduos de aminoácidos e os resultados das análises realizadas através do BLAST são apresentados no Quadro 9. Neste contexto, é interessante observar que tal proteína encontra-se consideravelmente conservada em relação à sua sequência primária entre as proteínas ortólogas encontrados nas espécies do gênero *Corynebacterium*, principalmente em relação a *C. diphtheriae* a qual apresenta 96% de identidade e 98% de similaridade. Esses resultados sugerem que o complexo enzimático NarGHI é provavelmente muito semelhante em relação a sua estrutura tridimensional entre as espécies de *C. pseudotuberculosis* pertencentes ao biovar *equi* e *C. diphtheriae*, tendo em vista os elevados valores de identidade encontrados entre as subunidades NarG, NaH e NarI de tais espécies. Foram encontrados também, 48% e 43% de identidade em relação às proteínas ortólogas de *M. tuberculosis* e *B. subtilis*, respectivamente.

Quadro 9 - Resultados da busca por sequências similares à *C. pseudotuberculosis* linhagem 31 através do BLAST.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/ Uniprot
Nitrate reductase gamma chain (NarI)	<i>C. diphtheriae</i>	259	96%	98%	100%	H2HVN2
	<i>C. efficiens</i>	259	77%	87%	100%	Q8FQ42
	<i>C. matruchotii</i>	259	77%	88%	100%	E0DI81
	<i>C. glutamicum</i>	259	75%	89%	100%	S5YHX1
	<i>C. striatum</i>	260	75%	85%	96%	C2CL37
	<i>C. casei</i>	304	70%	83%	98%	G710I2
	<i>M. tuberculosis</i>	241	48%	68%	86%	Q7D8Q6
	<i>B. subtilis</i>	233	43%	60%	97%	P42177
	<i>E. coli</i>	225	28%	51%	85%	P11350

Já em relação à NarI de *E. coli* para a qual uma estrutura de cristal está disponível, tal proteína mostrou ser somente 28% idêntica em sua sequência. Apesar desse baixo valor de identidade encontrado em relação a *E. coli*, algumas importantes propriedades podem ser deduzidas através da comparação entre as sequências primárias dessas proteínas. Para tal, foi realizado um alinhamento múltiplo entre as sequências de NarI de *C. pseudotuberculosis* e as demais sequências das proteínas ortólogas encontradas pelo BLAST (Figura 19).

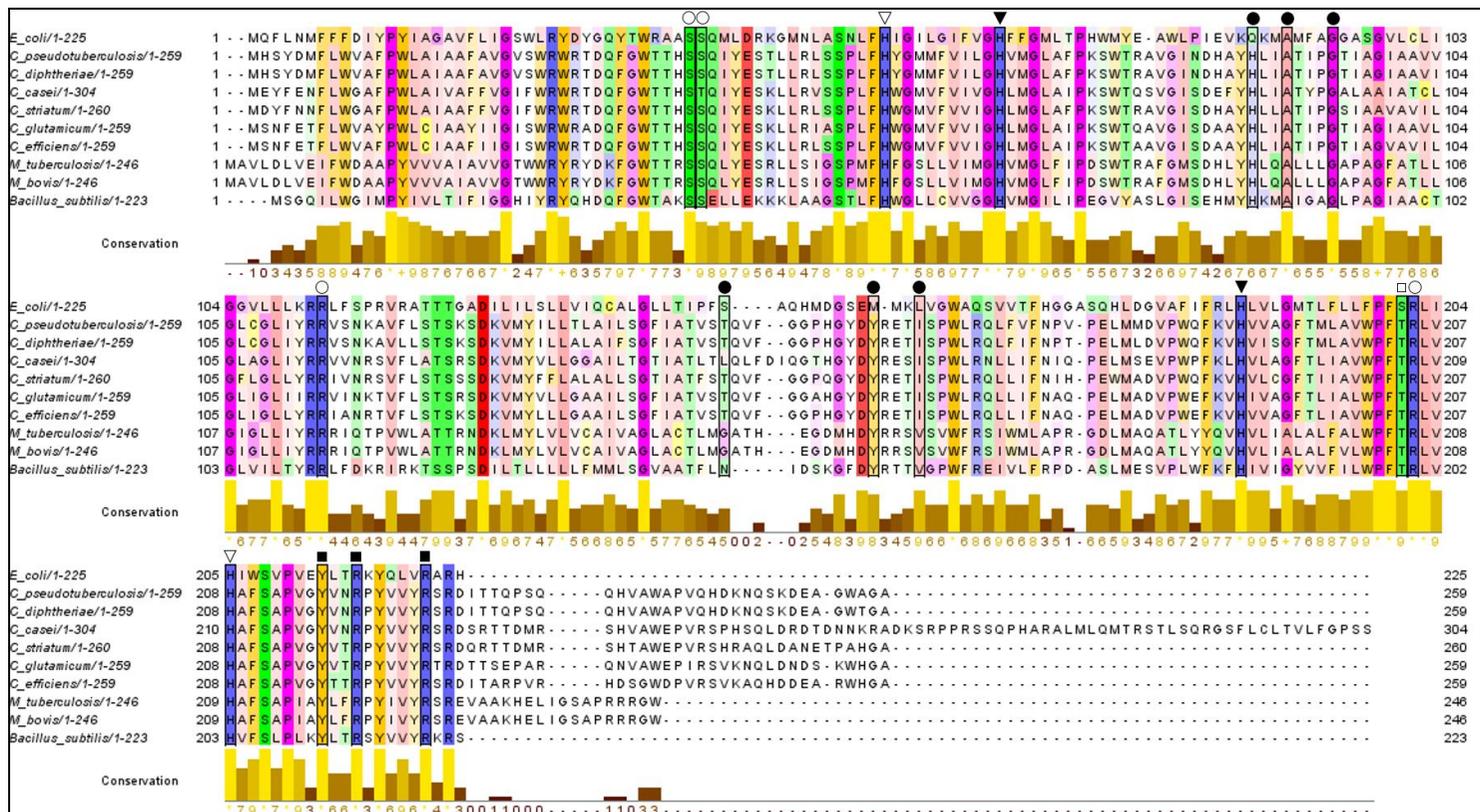


Figura 19 - Alinhamento múltiplo entre as subunidades NarL de *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, *C. casei*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *B. subtilis*. O triângulo cor preta representam os três resíduos de cisteína e o resíduo de histidina responsáveis pela ligação ao aglomerado [4Fe-4S] na estrutura de *E. coli*. O triângulo de cor branca representa o resíduo de aspartato responsável pela ligação do átomo de molibdênio do cofator Mo-bisMGD presente no sítio ativo na estrutura de *E. coli*. Os círculos pretos representam os resíduos de valina e tirosina que conferem ambiente hidrofóbico no sítio ativo. Os círculos brancos representam os três resíduos de histidina presentes no sítio ativo que conferem carga positiva ao sítio ativo.

O Quadro 10 mostra um resumo referente aos resultados desse alinhamento, no qual são mostrados os resíduos correspondentes na sequência de NarI de *C. pseudotuberculosis*, como também a conservação de tais resíduos entre as sequências alinhadas e a função que cada um desempenha na estrutura da proteína de referência, ou seja, NarI de *E. coli*.

Nesse contexto, pode-se notar que todos os quatro resíduos de histidina responsáveis pela ligação ao átomo de ferro nos dois grupos heme estão conservados em todas as sequências analisadas. Tais resíduos em *C. pseudotuberculosis* correspondem a His66 e His190 para heme b_D e His 56 e His208 para heme b_P.

Quadro 10 - Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas narI de *C. pseudotuberculosis* e *E. coli* utilizadas no alinhamento múltiplo. É mostrada a posição dos resíduos nas sequências de *E. coli* e *C. pseudotuberculosis* como também a função de cada resíduo na estrutura de narG de *E. coli* e a conservação dos mesmos nas sequências de todas as espécies utilizadas no alinhamento.

<i>E. coli</i> NarI	<i>C.</i> <i>pseudotuberculosis</i> NarI	Conservação	Função
His66 (H)	His66	100%	Coordenação do átomo de ferro no heme b _D
His187 (H)	His190		
His56 (H)	His56	100%	Coordenação do átomo de ferro no heme b _P
His205 (H)	His208		
Arg112	Arg113	100%	Os grupos de propionato de b _P formam ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas com as cadeias laterais dos resíduos Arg112, Arg202, Ser39 e Ser40 em NarI e Arg221 em NarH. Esta rede de ligações de hidrogênio se estende ao aglomerado FS4, proporcionando um caminho plausível para a transferência de elétrons intersubunidade entre o centro redox b _P , FS4 e NarG.
Arg202	Arg205		
Ser39	Ser39		
Ser40	Ser40	Mudou para (T) em <i>C. casei</i> , mas continua com as mesmas propriedades físico-químicas. (Hidrofílico). Todas as outras continuam com (S) nessa posição.	
Tyr213(Y)	Tyr216	100%	Resíduos da cauda C-terminal altamente conservados na família de proteínas NarI, envolvidos em interações eletrostáticas e ligação de hidrogênio, participam na formação do heterotrímero NarGHI.
Arg216(R)	Arg219		
Arg222(R)	Arg225		
Ser201(S)	Ser204	Mudou para (T) em <i>C. casei</i> , mas continua com as mesmas propriedades físico-químicas.(Hidrofílico). Todas as outras continuam com (S) nessa posição.	A presença de uma torção forte no resíduo Ser201 de NarI permite distâncias mais curtas entre os dois grupos hemes em NarI.

Na busca por domínios proteicos conservados na sequência de NarI de *C. pseudotuberculosis* (**Figura 20**) foi encontrado, como esperado, que a mesma pertence à família Nitrato redutase, subunidade gama.

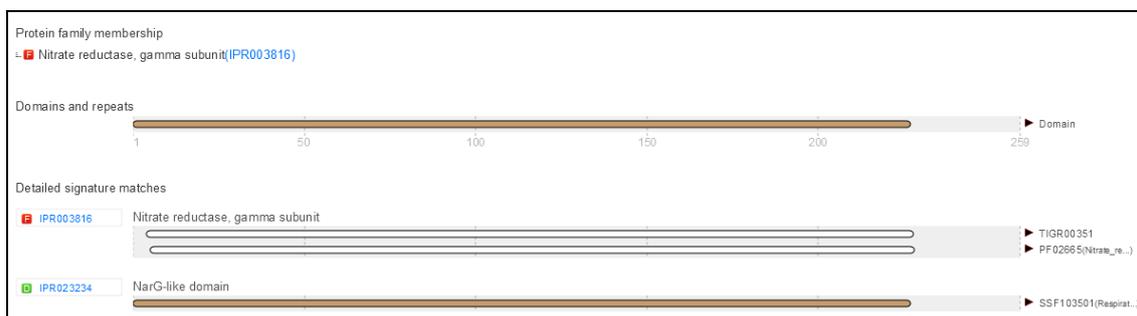


Figura 20 - Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos da proteína NarI de *C. pseudotuberculosis*.

4.1.4. 4. NarJ

NarJ é uma proteína chaperona que auxilia a montagem das subunidades da enzima NarGHI e na inserção do cofator molibdênio em NarG (Vergnes et al., 2006; Zakian et al., 2010). Nas linhagens 31 e 258 de *C. pseudotuberculosis* pertencentes ao biovar Equi, a sequência deduzida através dos genomas revelou que NarJ é composta por 209 resíduos de aminoácidos e os resultados das análises realizadas através do BLAST estão apresentados no Quadro 11. De um modo geral, os valores de identidade encontrados entre esta e as demais sequências de proteínas ortólogas encontradas pelo BLAST, incluindo as de espécies do gênero *Corynebacterium*, foram um pouco mais baixos do que aqueles encontrados para as outras proteínas (NarG, NarH e NarI) que compõem as três subunidades da enzima nitrato redutase. Assim como para estas últimas, o maior valor de identidade encontrado foi com a proteína ortóloga de *C. diphtheriae*, apresentando 89% identidade de sequência. Além disso, foram encontrados também valores de identidade relativamente altos com NarJ de outras espécies do gênero *Corynebacterium*, tais como 63% e 62% com *C. glutamicum* e *C. matruchotii*, respectivamente.

Além disso, foi encontrado 37% de identidade com NaJ de *M. tuberculosis* e apenas 30% com NarJ de *E. coli*.

Quadro 11 - Resultados da busca por sequências similares à NarJ de *C. pseudotuberculosis* linhagem 31 através do BLAST.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/ Uniprot
Nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone (NarJ)	<i>C. diphtheriae</i>	209	89%	96%	100%	H2H309
	<i>C. glutamicum</i>	228	63%	80%	100%	Q6M5Z0
	<i>C. matruchotii</i>	230	62%	78%	98%	E0DI80
	<i>C. efficiens</i>	230	61%	78%	100%	C8NKY8
	<i>C. striatum</i>	272	58%	73%	98%	C2CL38
	<i>C. casei</i>	290	55%	71%	100%	G7I0I1
	<i>M. tuberculosis</i>	206	37%	49%	91%	Q7D8Q7
	<i>B. subtilis</i>	184	30%	53%	83%	P42178
	<i>E. coli</i>	236	30%	46%	55%	P0AF26

A análise da sequência realizada através da ferramenta InterproScan5 foi comprovado que a mesma pertence a família “Nitrato redutase chaperona, NarJ”, estando, deste modo, de acordo com a literatura (Figura 21).

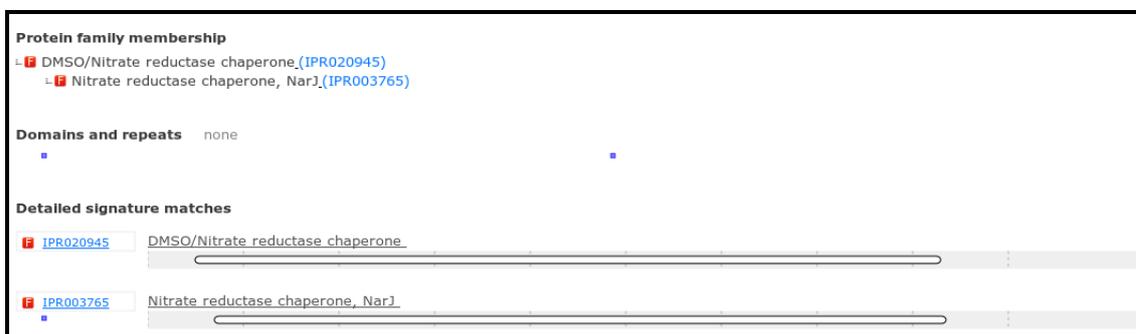


Figura 21 - Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos da proteína NarJ de *C. pseudotuberculosis*. A figura mostra que tal proteína pertence à família Nitrato redutase chaperona NarJ.

4.1.4.5. Transportadores de nitrato e nitrito

A absorção de nitrato e a exportação de nitrito são mediadas por transportadores de nitrato/nitrito os quais são membros da superfamília dos facilitadores principais (MFS) (Jia and Cole, 2005; Yan et al., 2013; Zheng et al., 2013a). Em bactérias, tais transportadores constituem a família NarK, exemplificadas pelas proteínas NarK e NarU em *E. coli*, sendo que as mesmas compartilham 76% de identidade de sequência e transportam tanto nitrato quanto nitrito. Todavia, o gene responsável por codificar NarK é expresso em níveis maiores, sendo que esta proteína, por sua vez, é duas vezes mais eficiente no transporte de nitrato do que NarU (Jia et al., 2009; Yan et al., 2013; Zheng et al., 2013b).

No entanto, mecanismo de transporte de NarK e NarU permanece incompreendido em sua totalidade, sendo que, até a data, ainda não está claro se NarK é um nitrato/nitrito antiporter ou symporter. No entanto, recentemente a estrutura de cristal de NarK foi determinada, e semelhante a outros transportadores MFS, NarK é composta por 12 hélices transmembranares e é estruturalmente dividido em dois domínios, a metade N-terminal e a metade C-terminal, cada qual constituído em seis domínios transmembranares, no qual acredita-se, que o transporte do substrato está localizado na interface entre estes dois domínios (Zheng et al., 2013a).

Neste contexto, as análises estruturais e bioquímicas na estrutura de NarK de *E. coli* permitiram a identificação de aminoácidos importantes envolvidos na captação do substrato e no transporte do mesmo. É proposto que o mecanismo de transporte de nitrato e nitrito é formado por uma via composta por resíduos altamente carregados positivamente. Esta via de carga positiva facilita o transporte destes substratos com carga negativa, mas ao mesmo tempo, representa uma barreira para a translocação de prótons, sugerindo assim, que estes últimos não são cotransportados com o substrato.

O sítio de ligação ao substrato ocorre pelos resíduos de arginina carregados positivamente, (R89 e R305), os quais são invariáveis entre as sequências de NarK e seus homólogos. Estas argininas são limitadas por dois resíduos de fenilalanina (F267 e F147) acima e abaixo. Juntas, as argininas e as fenilalaninas formam o bolso de ligação ao substrato (Figura 22) (Zheng et al., 2013a).

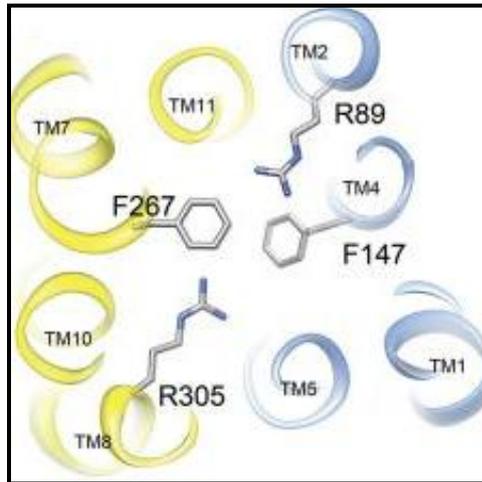


Figura 22 - Sítio de ligação ao substrato na estrutura de NarK de *E. coli* (Zheng et al., 2013a)

Nas linhagens 31 e 258 de *C. pseudotuberculosis* pertencentes ao biovar equi, foram encontrados dois genes responsáveis por codificar dois prováveis transportadores de nitrato e nitrito, os quais estão nomeados como *narK* e *narT*. A posição de tais genes no genoma de tais linhagens é mostrada na Figura 23.

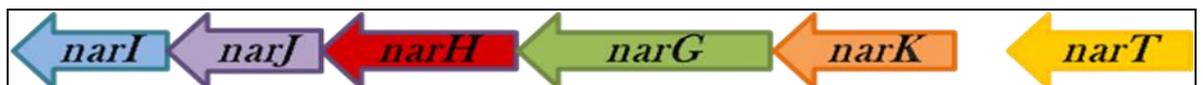


Figura 23 - Posição relativa dos genes envolvidos na redução de nitrato em *C. pseudotuberculosis* biovar Equi.

Como se pode evidenciar através desta figura, o gene *narK* se encontra em estreita proximidade com os genes *narG*, *narH*, *narJ* e *narI*, os quais juntos, foram o operon *narKGHJI* em *C. glutamicum*, mas não em *E. coli*, sendo que nesta última, por sua vez, tal gene *narK* se encontra a montante do operon *narKGHJI* e é transcrito individualmente.

Em *C. pseudotuberculosis*, o gene *narT* se encontra a montante do “cluster” *narKGHJI*, porém, somente através das análises *in silico* realizadas neste presente trabalho, não é possível afirmar como realmente ocorre a transcrição e a regulação de tais genes *in vivo*. No entanto, é possível que tal cluster *narKGHJI* em *C. pseudotuberculosis* biovar Equi possa ser regulado em conjunto, assim como ocorre em *C. glutamicum*. Porém, são necessários estudos investigativos posteriores a fim de desvendar e elucidar os mecanismos genéticos envolvidos na expressão e regulação dos mesmos.

A busca por similaridade realizada através da ferramenta BLASTp, por meio do banco de dados Uniprot é mostrada nos Quadro 12 e Quadro 13, referentes às sequências primárias de aminoácidos codificadas pelos genes *narK* e *narT*, respectivamente. Neste contexto, de acordo com as sequências obtidas por meio dos genomas recentemente resequenciados das linhagens 31 e 258 de *C. pseudotuberculosis*, NarK é uma proteína composta por 443 aminoácidos e apresentou elevada identidade de sequência em relação a proteína homóloga NarK de *C. diphtheriae*, sendo 93% idêntica e 97% similar à mesma.

Foram encontrados também os valores de 66% e 62% de identidade de sequência em relação às proteínas NarK de *C. glutamicum* e *C. efficiens*, respectivamente. Já em relação à *E. coli*, NarK de *C. pseudotuberculosis* apresentou 33% de identidade de sequência com ambas as proteínas NarK e NarU. Por outro lado, um baixo valor de identidade foi encontrado em relação à proteína NarK2 de *M. tuberculosis*, sendo que este organismo, apesar de ser mais próximo filogeneticamente à *C. pseudotuberculosis* do que *E. coli*, apresentou um valor inferior de identidade e similaridade de sequência quando comparado aos resultados encontrados à *E. coli*.

Quadro 12 - Resultados da busca por sequências similares à NarK de *C. pseudotuberculosis* linhagem 31 através do BLAST.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/ UniproT
Nitrate/nitrite transporter NarK	<i>C. diphtheriae</i>	443	93%	97%	100%	H2HGI1
	<i>C. glutamicum</i>	445	66%	78%	100%	I0LIN6
	<i>C. efficiens</i>	477	61%	76%	100%	Q8FQ38
	<i>E. coli</i>	463	33%	51%	97%	P10903
	<i>M. tuberculosis</i>	395	26%	35%	57%	P9WJY7
Nitrate/nitrite transporter NarU	<i>E. coli</i>	462	33%	52%	97%	P37758
	<i>S. typhimurium</i>	462	33%	52%	97%	P37593

Já NarT de *C. pseudotuberculosis* é composta por 432 aminoácidos e foi encontrado, por meio da ferramenta BLASTp, que tal proteína é 88% e 93% idêntica e similar, respectivamente, em termos de sua sequência primária quando comparada à proteína NarT de *C. diphtheriae*. Além disso, foram encontrados os valores de 30% de identidade entre as sequências de proteínas NarT de ambas as bactérias *S. carnosus* e *S. aureus*. Por outro lado, ao contrário dos resultados supracitados encontrados para a proteína NarK, NarT apresentou maior identidade de sequência com a proteína NarK2 de *M. tuberculosis* (31%) do que para ambas as proteínas NarK e NarU de *E. coli* (27%).

Quadro 13 - Resultados da busca por sequências similares à NarT de *C. pseudotuberculosis* linhagem 31 através do BLAST.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/ Uniprot
Nitrate/Nitrite transporter NarT	<i>C. diphtheriae</i>	432	88%	93%	100%	H2HGI2
Nitrate/Nitrite transporter NarK2	<i>M. tuberculosis</i>	395	31%	47%	95%	P9WJY7
Nitrate/Nitrite transporter NarT	<i>S. carnosus</i>	388	30%	50%	88%	O33854
	<i>S. aureus</i>	389	30%	50%	92%	Q7A3U8
Nitrate/Nitrite transporter NarT	<i>E. coli</i>	463	27%	43%	95%	P10903
Nitrate/nitrite transporter NarU	<i>E. coli</i>	462	27%	43%	90%	P37758

Além disso, através da ferramenta InterproScan5, foi encontrados que ambas as proteínas NarK (Figura 24) e NarT (Figura 25) pertencem à superfamília dos facilitadores principais, estando deste modo, de acordo com a literatura.

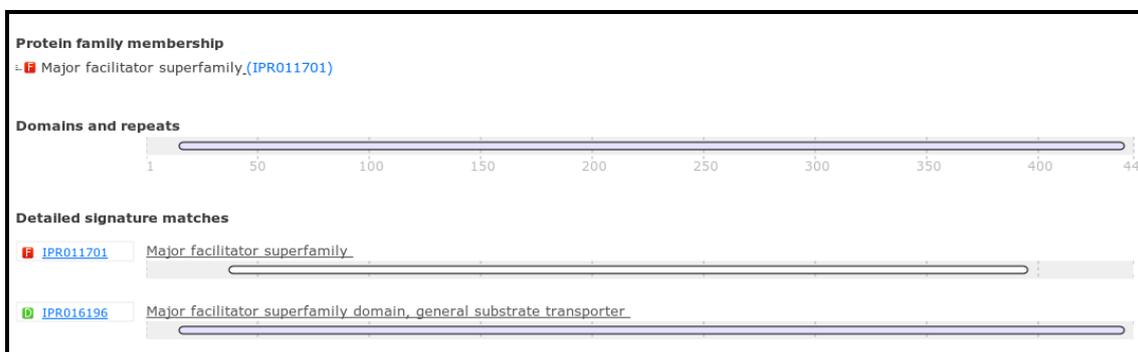


Figura 24 - Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos da proteína NarK de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi, usando o InterproScan5.

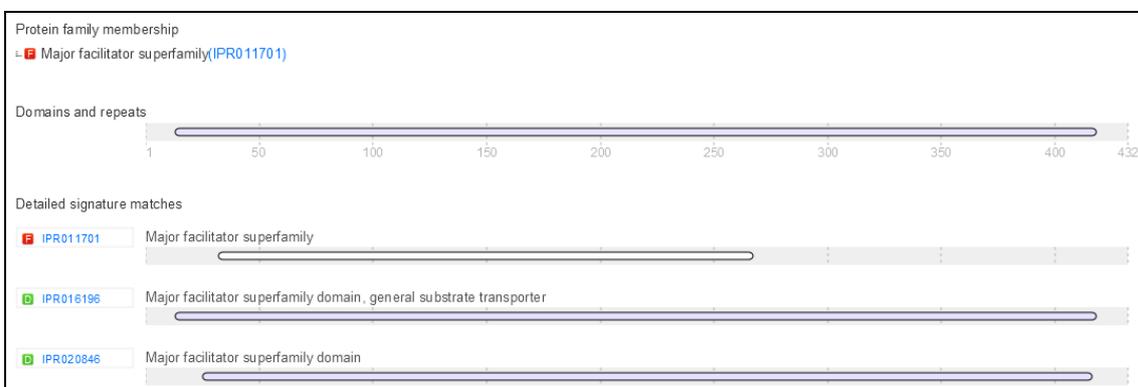


Figura 25 - Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos da proteína NarT de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi, usando o InterproScan5.

Através da predição dos domínios transmembrânicos por meio do programa TMHMM2.0. foi detectado que tanto NarK (Figura 26) como NarT (Figura 27) são compostas por 12 hélices transmembrânicas, sendo semelhante, deste modo, aos outros transportadores membros da superfamília dos facilitadores principais.

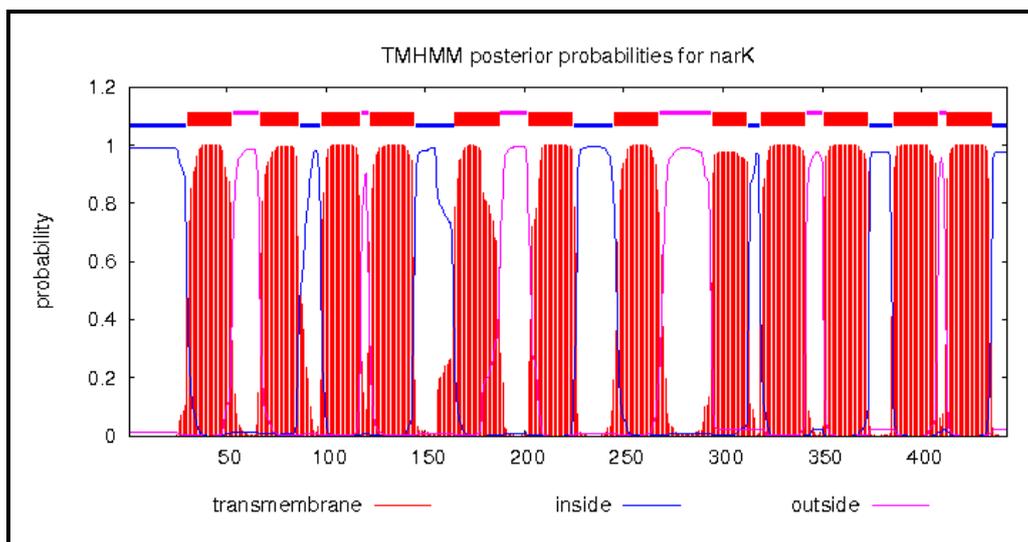


Figura 26 - Predição de localização subcelular de porções da proteína NarK de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi. NarK é composta por 12 hélices transmembrânicas. Predição realizada com o software de predição de proteínas de membrana TMHMM 2.0.

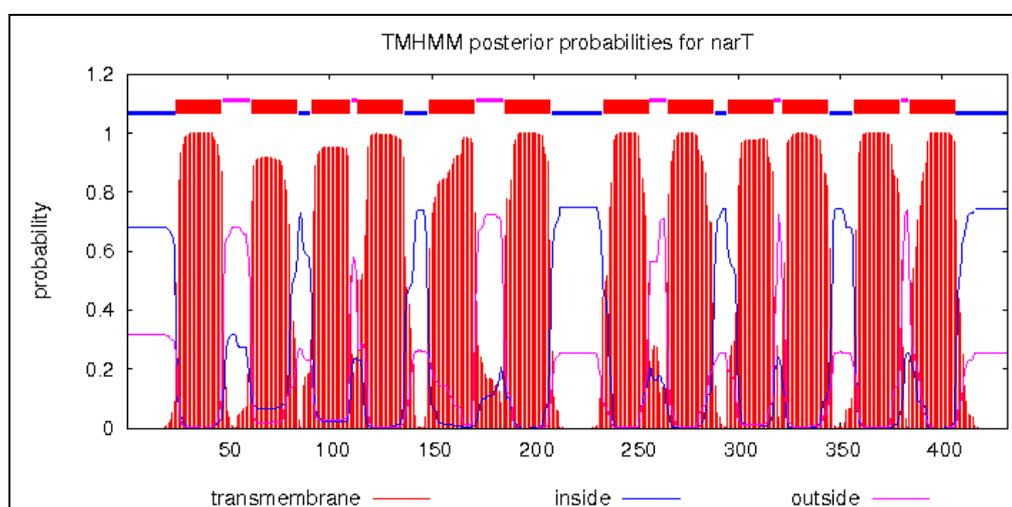


Figura 27 - Predição de localização subcelular de porções da proteína NarT de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi. NarK é composta por 12 hélices transmembrânicas. Predição realizada com o software de predição de proteínas de membrana TMHMM 2.0.

Com o objetivo de analisar a conservação dos resíduos que foram propostos a formar o bolso de ligação ao substrato na estrutura de NarK de *E. coli*, foi realizado um alinhamento múltiplo entre as sequências das proteínas NarK e NarU de *E. coli*; NarK e NarT de *C. pseudotuberculosis*, NarK de *C. glutamicum* e NarK2 de *M. tuberculosis* (Figura 28). As sequências foram alinhadas através do ClustalW e o alinhamento foi visualizado apor meio do programa Jalview.

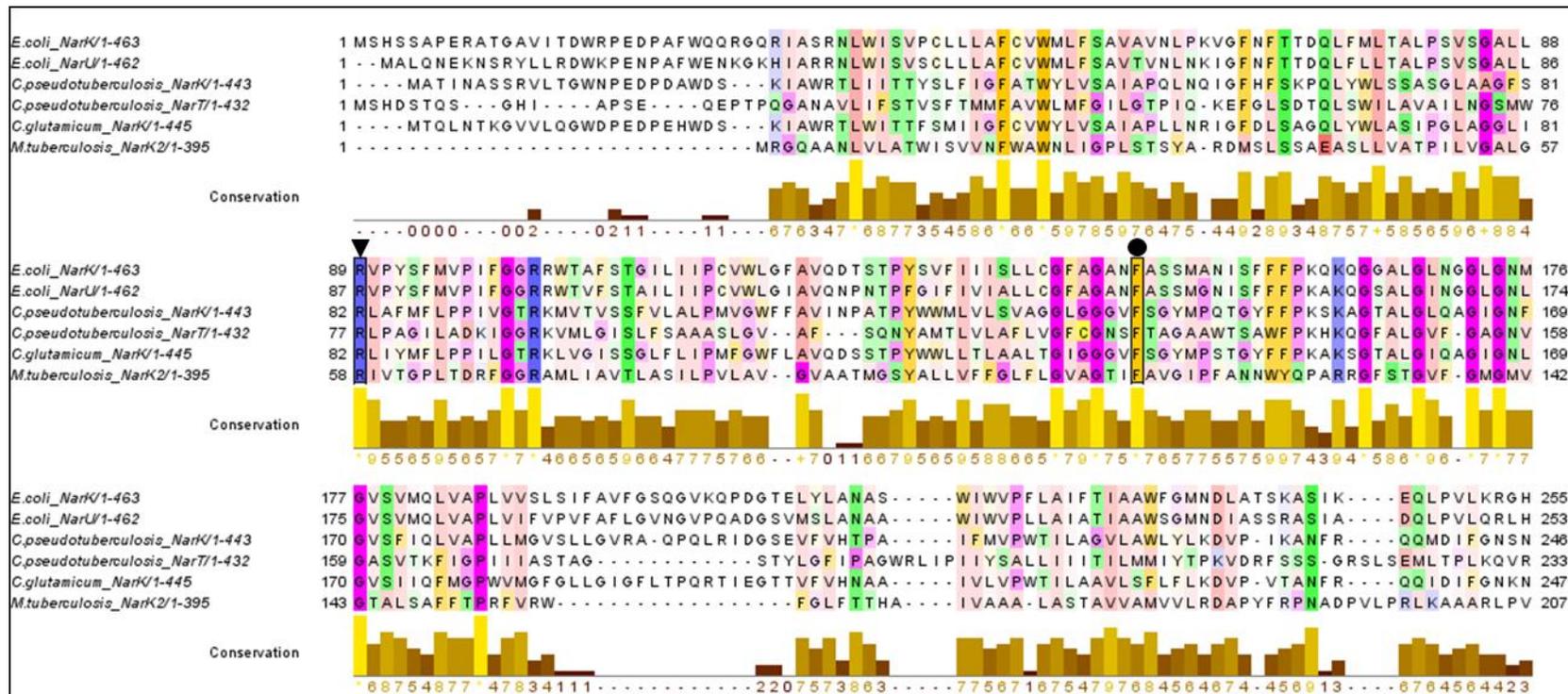


Figura 28 - Alinhamento múltiplo entre as seqüências de aminoácidos das proteínas NarK e NarU de *E. coli*, NarK e NarT de *C. pseudotuberculosis*, NarK de *C. glutamicum* e NarK2 de *M. tuberculosis*. Os triângulos pretos indicam os resíduos de arginina responsável pela ligação ao substrato e os círculos indicam os resíduos de fenilalanina presentes no bolso de ligação ao substrato na estrutura de NarK de *E. coli*.

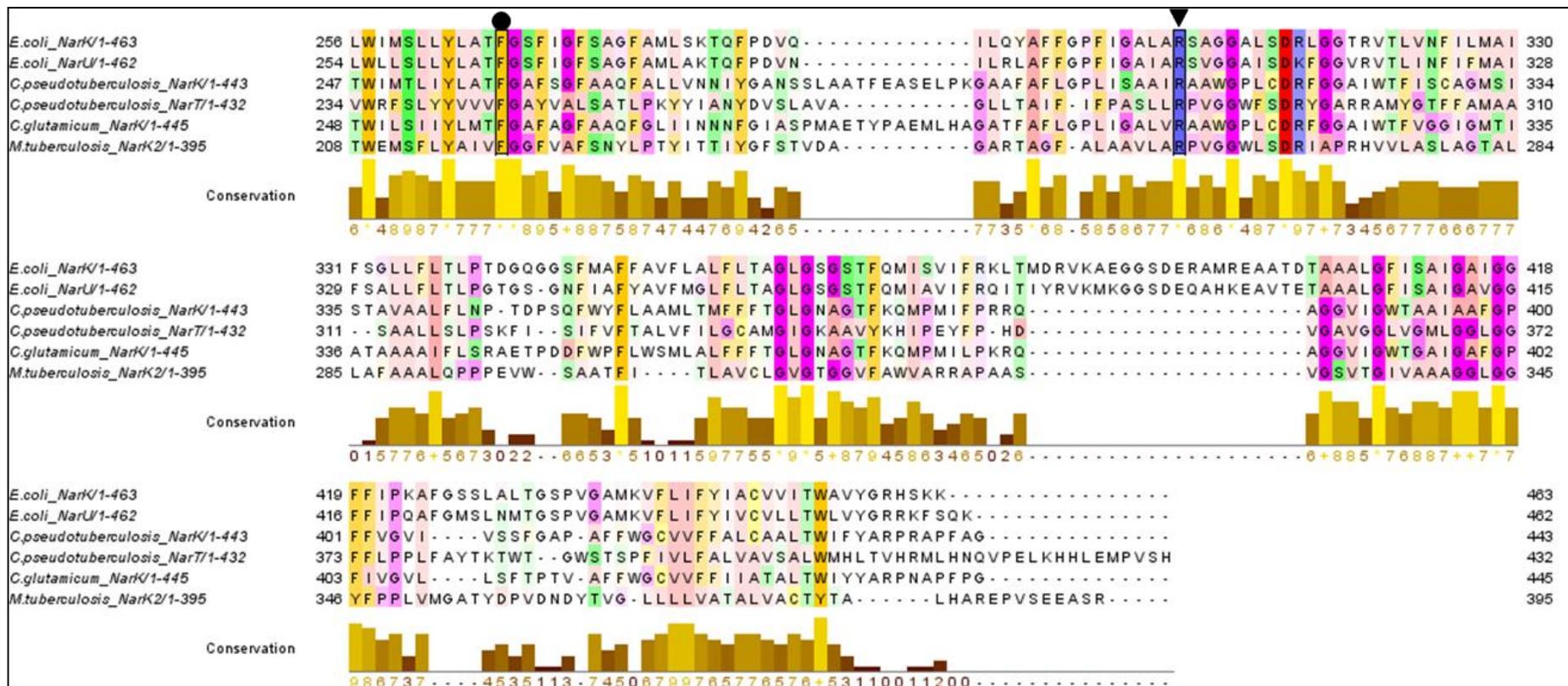


Figura 28 (continuação) - Alinhamento múltiplo entre as seqüências de aminoácidos das proteínas NarK e NarU de *E. coli*, NarK e NarT de *C. pseudotuberculosis*, NarK de *C. glutamicum* e NarK2 de *M. tuberculosis*. Os triângulos pretos indicam os resíduos de arginina responsável pela ligação ao substrato e os círculos indicam os resíduos de fenilalanina presentes no bolso de ligação ao substrato na estrutura de NarK de *E. coli*.

No Quadro 14 é mostrado um resumo dos resultados obtidos desse alinhamento, contendo a posição de cada resíduo nas estruturas de NarK de *E. coli* utilizada como referência, como também a posição dos resíduos nas sequências de NarK e NarT de *C. pseudotuberculosis*, assim como a conservação destes resíduos entre as sequências analisadas.

Como resultado, foi encontrado que todos os resíduos na estrutura de referência (NarK de *E. coli*) encontram-se conservados em todas as sequências analisadas, o que sugere uma possível conservação na função dos mesmos. Porém, mais estudos são necessários para a confirmação desta hipótese, como também a determinação real da função exercida pelas proteínas NarK e NarT de *C. pseudotuberculosis*, uma vez que somente por meio de ferramentas *in silico*, não é possível determinar ao certo o papel que tais proteínas desempenham na via de redução de nitrato de *C. pseudotuberculosis in vivo*.

Quadro 14 - Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NarK de *C. pseudotuberculosis* e *E. coli* utilizadas no alinhamento múltiplo. É mostrada a posição dos resíduos nas sequências de *E. coli* e *C. pseudotuberculosis* como também a função de cada resíduo na estrutura de NarK de *E. coli* e a conservação destes resíduos nas sequências de todos os organismos utilizadas no alinhamento múltiplo.

<i>E. coli</i> NarK	<i>E. coli</i> NarU	<i>C. pseudotuberculosis</i> NarK	<i>C. pseudotuberculosis</i> NarT	Conservação	Função
R 89	R 87	R 82	R 77	100%	Resíduos de ligação ao substrato.
R 305	R 303	R 309	R 285	100%	
F 147	F 145	F 140	F 130	100%	Resíduos de fanilalanina que juntamente com os dois resíduos de arginina, compõem o bolso de ligação ao substrato.
F 267	F 265	F 258	F 245	100%	

4.1.5. Nitrito redutase

Neste item serão apresentados os resultados referentes às análises dos genes e proteínas identificadas em *C. pseudotuberculosis* que estão envolvidas com a redução de nitrito.

4.1.4.6. Nitrito redutase NrfAH

Em todas as 15 linhagens que possuem seus genomas completamente sequenciados e depositados no NCBI, foram encontrados os genes responsáveis por codificar as subunidades NrfA e NrfH do complexo NrfAH nitrito redutase que catalisa a redução de nitrito a amônio. Além de *C. pseudotuberculosis*, tais genes foram encontrados também somente na espécie *C. ulcerans* pertencente ao gênero *Corynebacterium*, as quais compartilham elevados valores de identidade entre suas sequências proteicas correspondentes, estando ausentes, portanto, em todas as outras espécies que constituem esse gênero. Em *C. pseudotuberculosis*, os dois genes (*nrfA* e *nrfH*) encontram-se localizados em um “cluster” de genes responsáveis pela codificação de proteínas do sistema I de biogênese do citocromo c, o que parece ser uma característica comum entre os genomas bacterianos que possuem tais genes, tendo em vista que ambas as proteínas NrfA e NrfH são ricas em moléculas heme c (Kranz et al., 2009b).

4.1.4.6.1. NrfA

Em *C. pseudotuberculosis*, NrfA é composta por 483 resíduos de aminoácidos em todas as 15 linhagens e a busca por similaridade realizada pela ferramenta BLAST (Quadro 15) foi observado que em relação à proteína homóloga de *C. ulcerans* a mesma possui 95% de identidade e 98% de similaridade de sequência levando-se em consideração as trocas positivas a partir dos aminoácidos sinônimos. Por outro lado, quando comparada às proteínas homólogas de organismos já bem caracterizados na literatura, foram encontrados os valores de 34%, 33%, 31%, 32% e 30% de identidade de sequência com as proteínas NrfA de *Parabacteroides distasonis*, *Campylobacter jejuni*, *Wolinella succinogenes*, *Desulfovibrio vulgaris* e *Sulfurospirillum deleyianum*, respectivamente.

Quadro 15 - Resultados da busca por sequências similares à NrfA nitrito redutase de *C. pseudotuberculosis* que catalisa a redução de nitrito a amônio através do BLAST.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/ Uniprot
Ammonia-forming cytochrome c nitrite reductase NrfA	<i>C. ulcerans</i>	483	95%	98%	100%	V6V2X1
	<i>P. distasonis</i>	494	34%	52%	94%	A6L890
	<i>B. fragilis</i>	493	34%	52%	93%	Q64ZA7
	<i>C. jejuni</i>	610	33%	46%	91%	Q5HT55
	<i>W. succinogenes</i>	507	31%	50%	92%	Q9S1E5
	<i>D. vulgaris</i>	524	32%	47%	82%	Q72EF3
	<i>S. deleyianum</i>	514	30%	49%	92%	Q9Z4P4

Através da análise da sequência de aminoácidos por meio da ferramenta InterProScan5, foi constatado que tal proteína pertence a família “Citocromo c552” e possui o domínio “citocromo multiheme” (Figura 29) estando assim, de acordo com a literatura no que diz respeito à classificação de tais enzimas quanto a família e a presença de tal domínio, característicos dessas enzimas. A família “citocromo c552” é formada pela enzima citocromo c nitrito redutase (c552) que catalisa a redução de seis elétrons de nitrito para amônio no ciclo do nitrogênio.

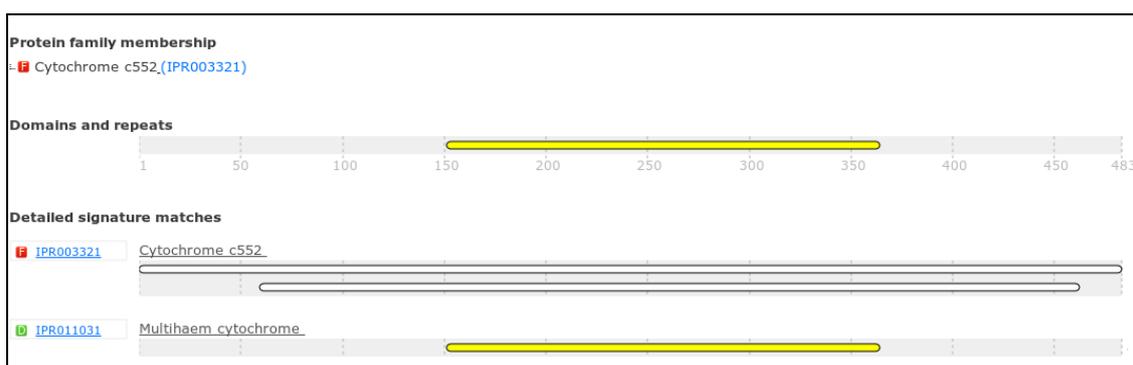


Figura 29: Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos da proteína NrfA de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi, usando o Interproscan5.

Citocromo c552 é um componente de tal enzima, sendo que a mesma é conhecida formalmente como “Ammonia-forming cytochrome c nitrite reductase”. As proteínas NrfA contêm cinco grupos heme ligados de forma covalente, quatro dos quais são coordenados por duas histidinas, com a histidina proximal sendo fornecida pelo motivo CXXCH altamente conservado. Estes hemes são responsáveis pela transferência de elétrons no interior de tais proteínas. O heme restante é o sítio ativo onde ocorre a redução de nitrito e encontra-se ligado por um resíduo de lisina fornecido por um novo motivo de ligação ao heme CXXCK. O sítio ativo do citocromo c nitrito reductase é o único caso conhecido em que uma lisina substitui a histidina dentro de um motivo CXXCH convencional de ligação a hemes c (Einsle et al., 1999; Lockwood et al., 2011; Simon, 2002).

Alguns Campylobacteraceae tais como *Campylobacter jejuni* codificam uma proteína NrfA que apresentam uma variação no qual o novo motivo CXXCK está ausente, sendo que nessas proteínas este novo motivo é substituído pelo motivo convencional CXXCH (Lockwood et al., 2011; Pittman et al., 2007).

Com o propósito de identificar se os resíduos envolvidos na ligação aos cinco grupos hemes e ao íon de cálcio encontram-se conservados na sequência proteica de NrfA de *C. pseudotuberculosis*, foi realizado um alinhamento múltiplo entre a sequência desta com as demais sequências proteicas de NrfA dos organismos *C. ulcerans*, *W. succinogenes*, *C. jejuni*, *S. deleyianum* e *D. vulgaris* (Figura 30). A sequência utilizada como referência foi a de *W. succinogenes* pelo fato de que a mesma possui uma estrutura de cristal determinada (Einsle et al., 2000).

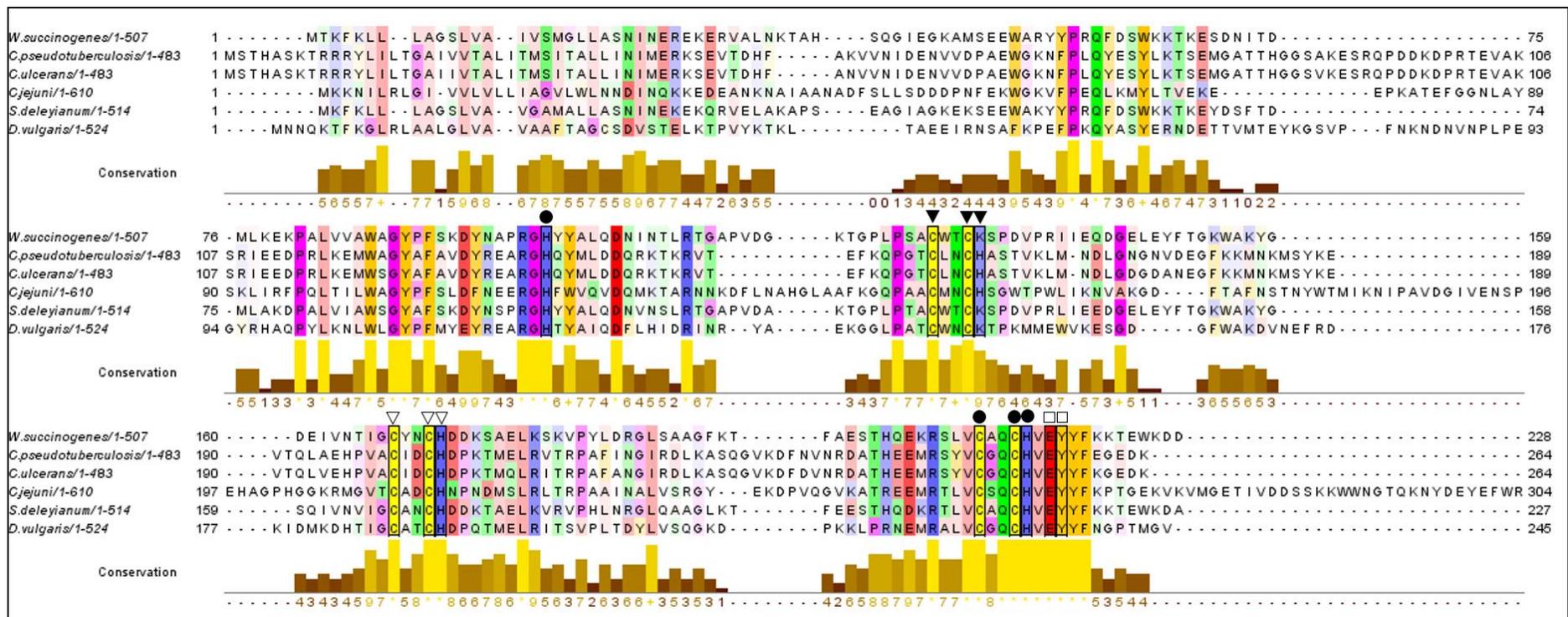


Figura 30 - Alinhamento múltiplo entre as seqüências de aminoácidos da proteína NrfA de *W. succinogenes*, NrfA de *C. pseudotuberculosis* e demais seqüências de organismos encontrado pelo BLAST. Os Triângulos pretos indicam os resíduos que fazem ligação ao Heme 1. Os triângulos brancos indicam os resíduos que fazem ligação ao Heme 2. Os círculos pretos indicam os resíduos que fazem ligação ao Heme 3, e os círculos brancos ao Heme 4. Os quadrados pretos indicam os que fazem ligação ao Heme 5. E os quadrados brancos indicam os que fazem ligação ao Cálcio.

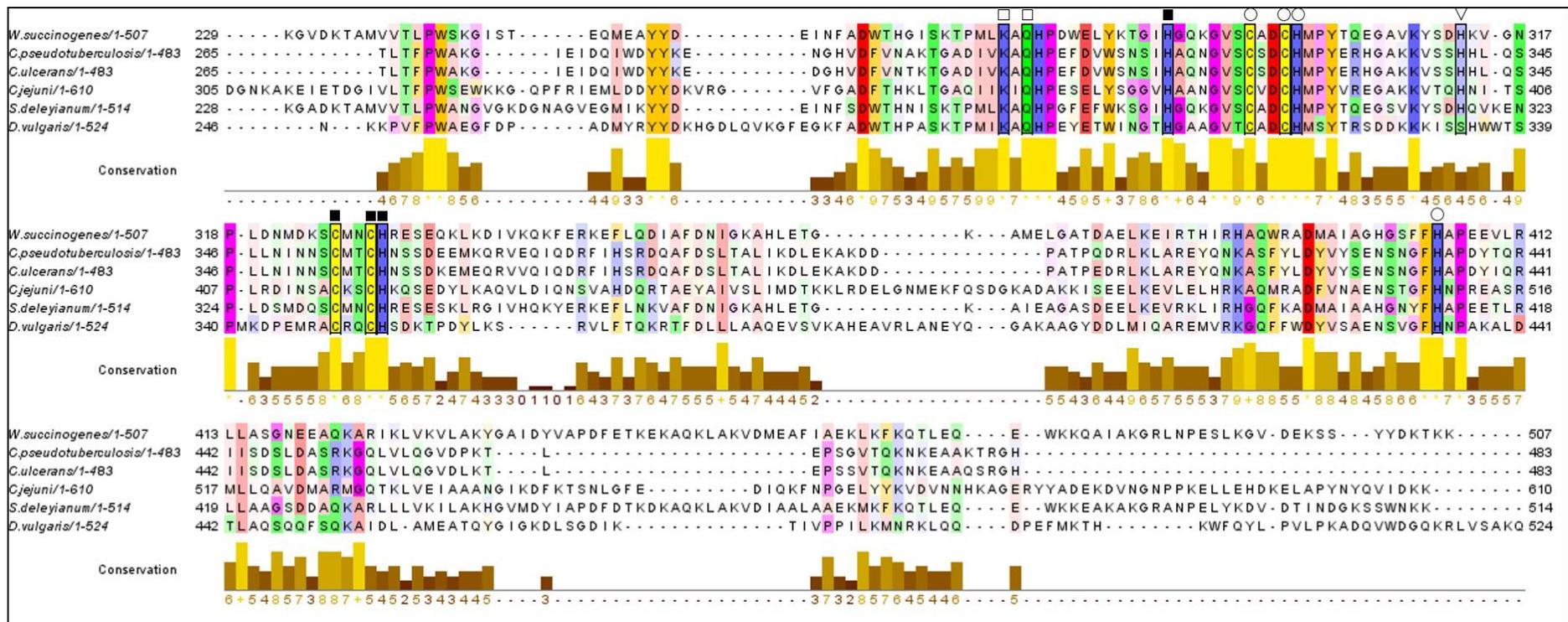


Figura 30 (continuação) - Alinhamento múltiplo entre as seqüências de aminoácidos da proteína NrfA de *W. succinogenes*, NrfA de *C. pseudotuberculosis* e demias seqüências de organismos encontrados pelo BLAST. Os Triângulos pretos indicam os resíduos que fazem ligação ao Heme 1. Os triângulos brancos indicam os resíduos que fazem ligação ao Heme 2. Os círculos pretos indicam os resíduos que fazem ligação ao Heme 3, e os círculos brancos ao Heme 4. Os quadrados pretos indicam os que fazem ligação ao Heme 5. E os quadrados brancos indicam os que fazem ligação ao Cálcio.

O Quadro 16 mostra um resumo referente aos resultados deste alinhamento, no qual são mostrados os resíduos correspondentes na sequência de NrfA de *C. pseudotuberculosis*, como também a conservação de tais resíduos entre as sequências alinhadas e a função que cada um desempenha na estrutura da proteína de referência.

Quadro 16 - Resíduos analisados quanto a conservação entre as sequências das proteínas NrfA de *C. pseudotuberculosis* e *W. succinogenes* utilizadas no alinhamento múltiplo. É mostrada a posição dos resíduos nas sequências de *W. succinogenes* e *C. pseudotuberculosis* como também a função de cada resíduo na estrutura de NrfA de *W. succinogenes* e a conservação destes resíduos nas sequências de todos os organismos utilizados no alinhamento múltiplo.

<i>W. succinogenes</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	Conservação	Função
Lys134	His160	3K e 3H	Ligação ao Heme 1
Cys130	Cys156	100%	
Cys 133	Cys159	100%	
Cys 168	Cys 200	100%	Ligação ao Heme 2
Cys 171	Cys 203	100%	
His 172	His 204	100%	
His 313	His 341	<i>D. vulgaris</i> possui S	
His 102	His 134	100%	Ligação ao Heme 3
Cys 211	Cys 250	100%	
Cys 214	Cys 253	100%	
His 215	His 254	100%	
Cys 295	Cys 323	100%	Ligação ao Heme 4
Cys 298	Cys 326	100%	
His 299	His 327	100%	
His 405	His 434	100%	
His 288	His 316	100%	Ligação ao Heme 5
Cys 326	Cys 354	100%	
Cys 329	Cys 357	100%	
His 330	His 358	100%	
Glu 217	Glu 256	100%	Ligação ao Calcio
Tyr-218	Tyr-257	100%	
Lys-274	Lys-302	100%	
Gln-276	Gln-304	100%	

Pode-se observar a partir destes resultados obtidos através do alinhamento múltiplo que NrfA de *C. pseudotuberculosis* apresenta conservados todos os resíduos envolvidos na ligação aos hemes 1 a 5, assim como também os resíduos envolvidos na ligação ao íon de cálcio na estrutura de NrfA de *W. succinogenes*, utilizada como referência. Já em relação ao heme 1, o sítio ativo enzimático, no qual apresenta um resíduo de lisina fornecido por um novo motivo de ligação ao heme CXXCK em NrfA de *W. succinogenes*, foi substituído por uma histidina nas sequências de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* e *C. jejuni* sendo que nessas proteínas este novo motivo é substituído pelo motivo convencional CXXCH de ligação a hemes *c*. Esta substituição é também encontrada em alguns Campylobacteraceae, tais como *C. jejuni*, no qual a substituição deste novo motivo para o motivo convencional de ligação ao heme não altera a capacidade catalítica enzimática da mesma, o que pode também ser pressuposto para NrfA de *C. pseudotuberculosis*.

4.1.4.6.2. NrfH

O gene para NrfH se encontra a montante de *nrfA* e codifica uma proteína composta por 161 resíduos em todas as 15 linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Tal proteína compartilha 96% de identidade e 99% de similaridade com a NrfH de *C. ulcerans* (Quadro 17). As análises pelo BLAST também revelaram que tal proteína compartilha 59%, 54% e 52% de identidade com as proteínas homólogas das Actinobactérias *Austwickia chelonae*, *Kineosphaera limosa* e *Propionibacterium acidifaciens*, respectivamente. Por outro lado, NrfH de *C. pseudotuberculosis* mostrou ser 37% e 31% idêntica em sua sequência proteica quando comparada às NrfH homólogas de *W. succinogenes* e *D. vulgaris*, respectivamente. As proteínas pertencentes a estas duas últimas espécies citadas são especialmente relevantes para as análises em questão, pois são as mais bem estudadas e caracterizadas na literatura, especialmente a NrfH de *D. vulgaris* a qual é a única representante que possui uma estrutura de cristal determinada.

Quadro 17 - Resultados da busca por sequências similares à NrfH de *C. pseudotuberculosis* 31 através do BLAST.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/Uniprot
Cytochrom e c-type protein NrfH	<i>C. ulcerans</i>	161	96%	99%	100%	I7GXT8
	<i>A. chelonae</i>	163	59%	70%	85%	K6VTZ3
	<i>K. limosa</i>	157	54%	66%	98%	K6X5Z9
	<i>P. acidifaciens</i>	173	52%	69%	77%	U2RL19
	<i>W. succinogenes</i>	177	37%	52%	89%	Q9S1E6
	<i>D. vulgaris</i>	159	31%	45%	86%	Q72EF4

Através da análise da sequência proteica de NrfH de *C. pseudotuberculosis* por meio da ferramenta InterProScan5 (Figura 31), foi constatado que a mesma pertence a família “Nitrito redutase citocromo c-tipo, NrfH” e também possui o domínio “NapC/NirT citocromo c, N-terminal” que constitui uma região contendo quatro motivos CxxCH de ligação a heme c, sendo este um domínio específico que se encontra dentro de um domínio mais amplo denominado “citocromo multiheme” no qual compreende vários motivos CxxCH responsável pela ligação covalente ao grupo heme.

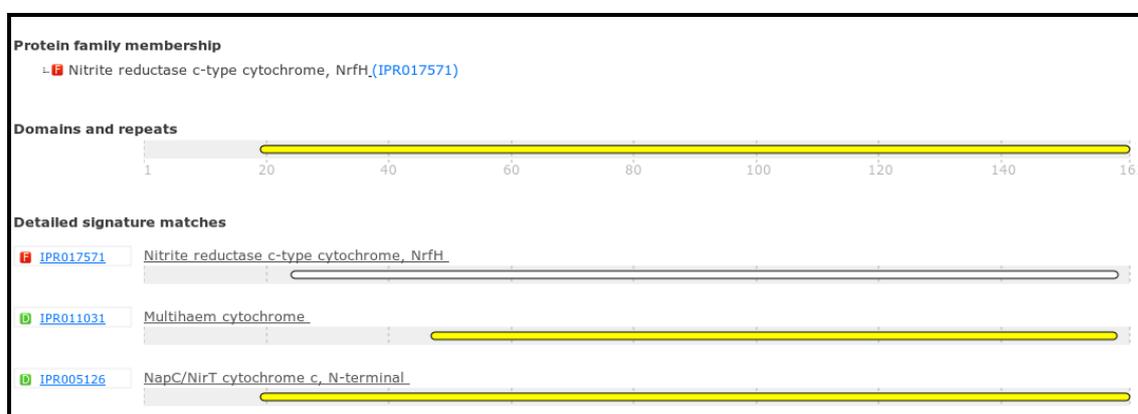


Figura 31 - Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos do gene *nrfH* de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi, usando o Interproscan5.

Os resultados encontrados pelo InterproScan5 referentes a classificação da família e a presença de tal domínio supracitado estão, em partes, de acordo com a literatura, apesar de tal região designada como N-terminal pelo domínio não corresponder de fato, a região descrita pelo domínio não ser. A família NapC/NirT é constituída por proteínas classificadas como citocromos *c* multi-heme que catalisam o transporte de elétrons entre as quinonas e as oxidoredutases periplasmáticas. Os membros mais bem caracterizados, os citocromos *c* tetraheme NrfH e NapC, medeiam o transporte de elétrons para NrfA e NapA, respectivamente. As proteínas NapC, NirT e NrfH consistem em aproximadamente 175 resíduos de aminoácidos e podem ser divididas em uma região N-terminal hidrofóbica que forma uma hélice que atravessa a membrana, bem como um domínio globular hidrofílico abrigando quatro motivos CXXCH. Um subgrupo da família NapC/NirT compreende as proteínas TorC, DorC e DmsC que possuem um domínio adicional mono-heme C-terminal de aproximadamente 200 resíduos (Gross et al., 2005a; Kern et al., 2008; Rodrigues et al., 2006).

No entanto, em estudos realizados a partir de análises das estruturas primárias de tais proteínas, foi proposto que NrfH e NapC pertencem a famílias de proteínas distintas que são restritas a grupos filogenéticos individuais. Em uma árvore filogenética construída a partir de alinhamentos múltiplos, verificou-se que as sequências de NapC e NirT, bem como as sequências das proteínas pentaheme formam um grupo monofilético presente exclusivamente em α -, β - e γ -proteobactérias, enquanto que as proteínas NrfH formam um grupo distinto cujas sequências não estão intimamente relacionadas entre si. Em consonância com este fato, genes *nrfH* são mais amplamente distribuídos e são encontrados em várias espécies diferentes de bactérias, que incluem δ - e ϵ -proteobactérias, bem como em várias bactérias Gram-positivas e espécies pertencentes ao filo Planctomycetes e ao gênero Bacteroides, sugerindo a transferência horizontal de genes *nrfH* entre organismos não relacionados (Gross et al., 2005b; Simon, 2002).

Estes resultados estão de acordo com a literatura na qual as proteínas do tipo NrfH e NapC são citocromos multihemes do tipo *c* estruturalmente relacionadas que possuem quatro grupos heme *c*. Cada heme está ligado covalentemente a cadeia polipeptídica através de um domínio de ligação CxxCH. Tais proteínas são citocromos associados à membrana, compreendendo uma hélice transmembranar N-terminal (Figura 32) e um domínio globular hidrofílico que se liga a quatro hemes *c* (Kern et al., 2008; Rodrigues et al., 2006).

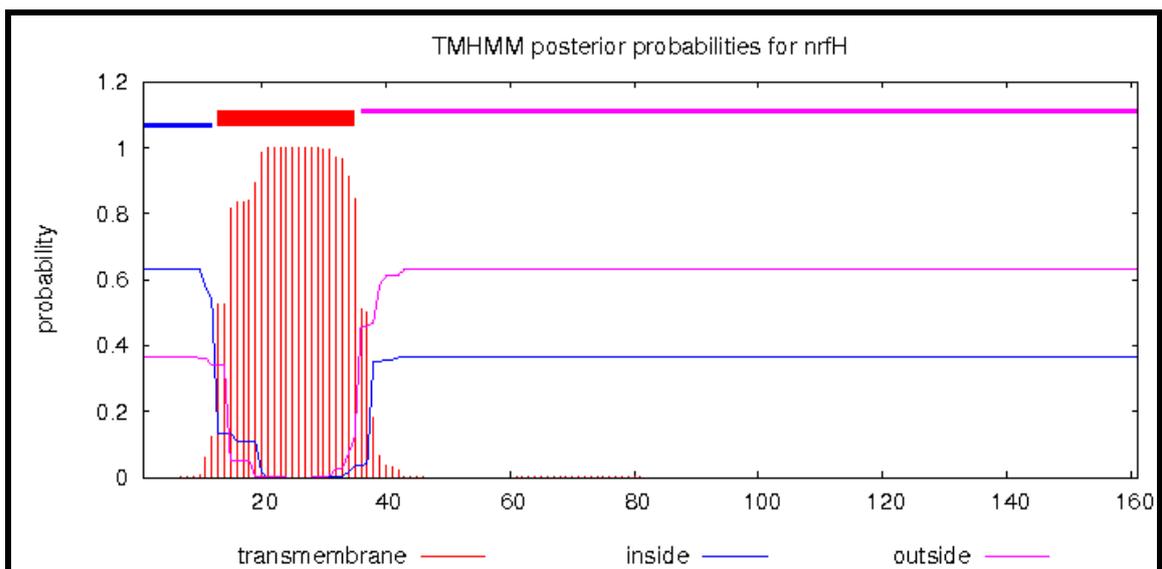


Figura 32: NrfH de *C. pseudotuberculosis* possui uma hélice transmembranar N-terminal que compreende os resíduos de aminoácidos 13 a 35. Resultado obtido através da ferramenta TMHMM2.0

Com o bjetivo de analiasr as conservação dos resíduos funcionalmente importantes, foi realizado um alinhamento múltiplo entres as sequencias proteicas de NrfH de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, *W. succinogenes* e *D. vulgaris* (Figura 33), sendo esta ultima, utilizada como referência já que é a única que possui uma estrutura de cristal já determinada.

O Quadro 18 mostra um resumo referente aos resultados desse alinhamento, no qual são mostrados os resíduos correspondentes na sequência de NrfHI de *C. pseudotuberculosis*, como também a conservação de tais resíduos entre as sequências alinhadas e a função que cada um desempenha na estrutura da proteína de referência, ou seja, NrfH de *D. vulgaris*.

Pode-se observar a partir dos resultados deste alinhamento múltiplo, que NrfH de *C. pseudotuberculosis* possui doze dos trezes resíduos envolvidos na ligação aos quatro heme *c* na estrutura de NrfH de *D. vulgaris*. *O único resíduo conflitante foi o resíduo de aspartato D89 de D. vulgaris*, o qual foi substituído por uma histidina em todas as sequências analisadas. No entanto, este resíduo de aspartato é substituído por uma histidina em muitas proteínas NrfH, como por exemplo em NrfH de *W. succinogenes* o qual é um resíduo essencial para a oxidação do menaquinol.

Quadro 18: Resíduos chaves responsáveis pela ligação aos hemes da subunidade NrfH. A posição de tais resíduos nas sequências proteicas de NrfH de *D. vulgaris* e de *C. pseudotuberculosis* são listados, assim como também a conservação de tais resíduos entre as sequências alinhadas e sua respectiva função na estrutura da proteína e a conservação dos mesmos em todas as sequências dos organismos utilizados no alinhamento múltiplo.

<i>D. vulgaris</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	Conservação	Função
Met49	Met58	100%	Heme 1
Cys 43	Cys 52	100%	
Cys 46	Cys 55	100%	
Asp 89	His 100	Só <i>D. vulgaris</i> possui Asp, todos os outros organismo possuem His	
Cys 66	Cys 76	100%	Heme 2
Cys 69	Cys 79	100%	
His 70	His 80	100%	
His 145	His 158	100%	
His 61	His 70	100%	Heme 3
Cys 116	Cys 127	100%	
His 120	His 131	100%	
Cys 136	Cys 149	100%	Heme 4
His 140	His 153	100%	

4.1.4.7. Nitrito redutase dependente de cobre NirK

A nitrito redutase dependente de cobre (CuNIR) catalisa a redução de um elétron de nitrito para óxido nítrico, sendo esta, uma etapa no processo de desnitrificação. Esta enzima, em geral, possui uma estrutura homotrimérica composta por três subunidades idênticas, a qual possui seis átomos de cobre, os quais podem ser organizados e classificados em dois tipos de centros de cobre. O centro de cobre tipo 1 (T1Cu) encontra-se enterrado dentro do domínio N-terminal “cupredoxin” na unidade monomérica e é coordenado por quatro resíduos (duas histidinas, uma cisteína e uma metionina) e corresponde ao centro de transferência eletrônica. O centro de cobre do tipo 2 (T2Cu) é coordenado por três resíduos de histidina e uma molécula de água. Este centro está localizado entre dois monômeros, correspondendo ao centro catalítico da enzima (Brenner et al., 2009; Fukuda et al., 2014b).

Recentemente, a estrutura de cristal de CuNIR da bactéria Gram-positiva *Geobacillus kaustophilus* foi resolvida. Nesta, o átomo de cobre em T1Cu é coordenado por dois átomos de nitrogênio de dois resíduos de histidina (His126 e His174), e dois átomos de enxofre, a partir de uma cisteína (Cys166) e de uma metionina (Met179) (Figura 34).

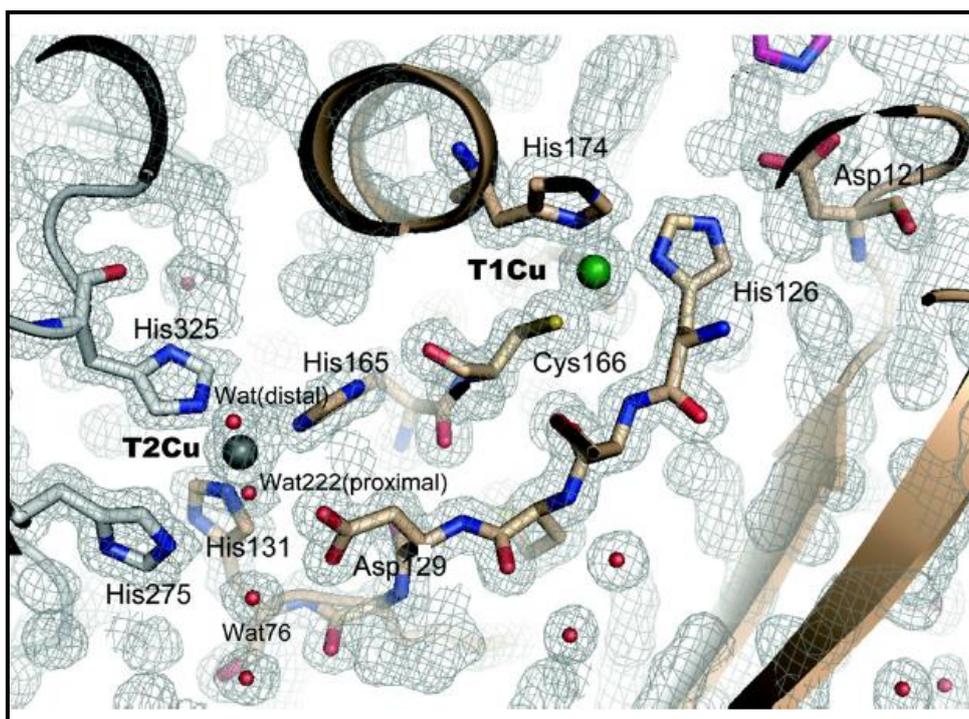


Figura 34 - Coordenação dos átomos de cobre na estrutura de CuNIR de *Geobacillus kaustophilus*

C. pseudotuberculosis possui uma provável enzima nitrito redutase dependente de cobre (CuNIR). O gene para CuNIR está anotado como *aniA* e encontra-se presente em 14 das 15 linhagens que apresentam seus genomas completamente sequenciados, estando ausente apenas na linhagem *C. pseudotuberculosis* 1/06A. Tal gene supostamente codifica uma proteína composta por 882 resíduos em todas as outras 14 linhagens.

Através da análise de similaridade entre as sequências de proteínas que possuem uma anotação manual com base em resultados experimentais e conclusões científicas, realizada por meio do banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot (Quadro 19), foi observado que tal proteína apresenta uma região N-terminal com cerca de 500 aminoácidos a mais quando comparada as demais proteínas homólogas obtidas no resultado do alinhamento (Figura 37), havendo, portanto uma baixa cobertura. Por exemplo, no caso da bactéria patogênica Gram-negativa *Neisseria gonorrhoeae* que possui uma nitrito redutase dependente de cobre AniA (homóloga a NirK) que se encontra localizada na membrana celular externa, a qual possui 392 resíduos e uma estrutura de cristal disponível, o alinhamento entre tal proteína e CuNIR de *C. pseudotuberculosis* ocorreu a partir dos resíduos 611 de *C. pseudotuberculosis* e 82 de *N. gonorrhoeae*, apresentando apenas 34% de cobertura. A região alinhada entre as duas proteínas apresentou 33% de identidade e 50% de similaridade.

O mesmo padrão de alinhamento foi observado com relação a outras enzimas nitrito redutases dependentes de cobre encontradas de organismos já bem caracterizados. No caso da proteobactéria *Achromobacter cycloclastes*, a qual possui uma CuNIR (NirK) solúvel no periplasma composta por 378 resíduos, o alinhamento apresentou apenas 30% de cobertura e ocorreu a partir dos resíduos 631 de *C. pseudotuberculosis* e 101 de *A. cycloclastes*, sendo que a região alinhada entre as duas proteínas apresentou 32% de identidade e 46% de similaridade. Já em relação à CuNIR (351 resíduos) da bactéria Gram-positiva *G. kaustophilus*, cuja a estrutura de cristal também está disponível, o alinhamento ocorreu a partir dos resíduos 60 da mesma e 598 de *C. pseudotuberculosis*, havendo somente 34% de cobertura e tal região apresentou 34% de identidade e 51% de similaridade.

Além disso, a busca por similaridade de sequência realizada através do BLAST por meio do banco de dados UniProtKB, foram encontradas proteínas de tamanhos similares a CuNIR de *C. pseudotuberculosis*, principalmente em espécies pertencentes ao filo Actinobactéria, as quais apresentaram uma elevada cobertura de alinhamento,

além de valores de identidade e similaridade significativos. Dentro desse contexto, pode-se destacar, por exemplo, a nitrito redutase dependente de cobre de *Mycobacterium indicus* e *Corynebacterium durum*, as quais apresentaram, respectivamente, 98% de cobertura de alinhamento, 47% e 40% de identidade e 61% e 56% de similaridade, quando comparadas à CuNIR de *C. pseudotuberculosis*.

Quadro 19 - Resultados da busca por sequências similares à nitrito redutase dependente de cobre CuNIR de *C. pseudotuberculosis* através do BLAST.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/ Uniprot
Copper-containing nitrite reductase	<i>P. propionicum</i>	900	52%	66%	98%	I6X6H9
	<i>M. pelagius</i>	929	50%	63%	98%	H5URC0
	<i>K. limosa</i>	982	48%	60%	99%	K6X1U8
	<i>A. chelonae</i>	907	49%	62%	99%	K6VPX4
	<i>M. indicus</i>	864	47%	61%	98%	J9WA76
	<i>C. durum</i>	867	40%	56%	98%	L1MHX9
	<i>C. vitaeruminis</i>	882	40%	54%	98%	W5Y3R0
	<i>C. diphtheriae</i>	462	55%	65%	57%	H2H3B1
	<i>G. kaustophilus</i>	354	34%	51%	34%	Q5L1X8
	<i>N. gonorrhoeae</i>	392	33%	50%	34%	Q02219
	<i>N. meningitidis</i>	386	30%	47%	35%	Q9JTB8
	<i>R. sulae</i>	377	30%	43%	43%	Q60214
	<i>A. cycloclastes</i>	378	32%	46%	30%	P25006

Através da ferramenta InterProScan5 (Figura 35), foi verificado que tal proteína pertence à família de enzimas nitrito redutases dependentes de cobre. Além disso, foram encontrados domínios proteicos característicos pertencentes às demais enzimas homólogas dependentes do cobre, como, por exemplo, o domínio “cupredoxin” no qual se encontra localizado o centro de cobre T1Cu.

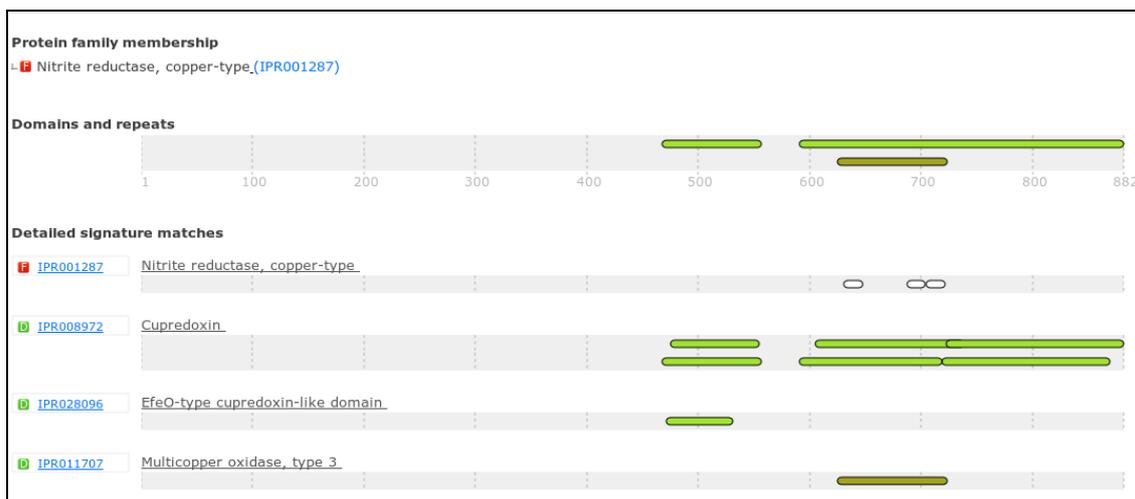


Figura 35 - Resultado da busca por domínios proteicos conservados na sequência de aminoácidos de CuNIR de *C. pseudotuberculosis*, usando o Interproscan5.

Por meio do programa TMHMM2, foi possível observar que tal região N-terminal de CuNIR de *C. pseudotuberculosis* supostamente codifica uma região transmembrana composta por 12 hélices (Figura 36). Estes resultado, apesar de conflitante com literatura, evidencia a possibilidade de que tal região N-terminal na qual não houve cobertura quando comparada às sequências de CuNIR de organismos já bem caracterizados na literatura, pode de fato, representar uma região transmembrânica desta enzima em *C. pseudotuberculosis*, podendo representar deste modo, uma variação desta enzima comumente encontrada e tais organismos.

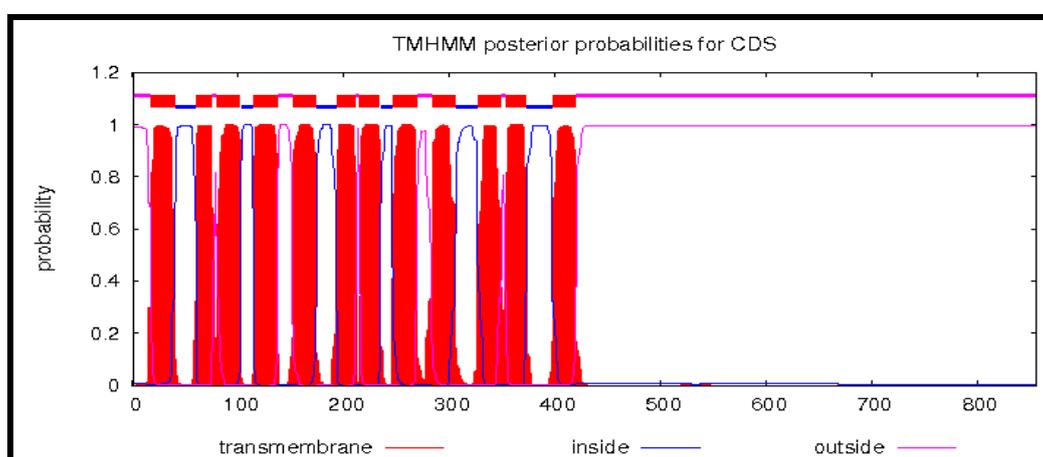


Figura 36 - CuNIR de *C. pseudotuberculosis* possui 12 hélices transmembranares na região N-terminal. Resultado obtido através da ferramenta TMHMM2.0

Com o objetivo de analisar a conservação dos resíduos responsáveis pela ligação aos átomos de cobre em T1Cu e T2Cu, assim como os resíduos chaves envolvidos na catálise enzimática na estrutura de CuNIR de *G. kaustophilus* utilizada

como referência, foi realizado um alinhamento múltiplo entre as sequências das proteínas CuNIR da mesma e as das proteínas ortólogas de *C. pseudotuberculosis* e as demais sequências ortólogas encontradas pelo BLAST (Figura 37.a e 37.b)

No Quadro 20 é mostrado um resumo dos resultados obtidos desse alinhamento, contendo a posição de cada resíduo em *G. kaustophilus* e *C. pseudotuberculosis*, assim como a conservação entre as sequências e a função dos mesmos na estrutura de CuNIR de *G. kaustophilus*, usada como referência.

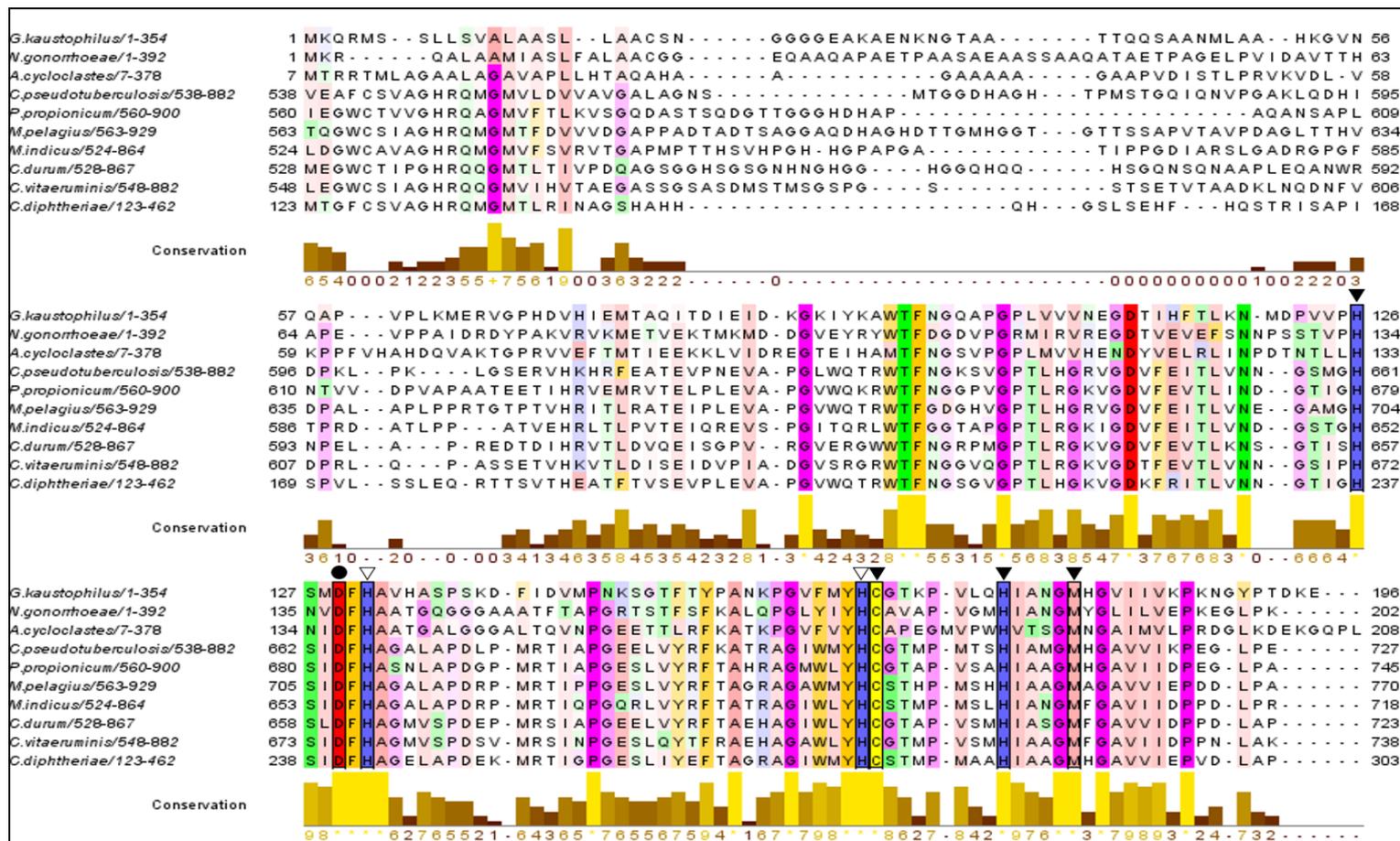


Figura 37.b - Alinhamento múltiplo entre as seqüências de CuNIR de *C. pseudotuberculosis*, *G. kaustophilus* e das demais seqüências de organismos encontradas pelo BLAST. Os triângulos pretos representam a coordenação do átomo de cobre sobre T1Cu. Os triângulos brancos representam a coordenação do átomo de cobre sobre T2Cu. Os círculos pretos representam os resíduos chaves envolvidos na catálise enzimática.

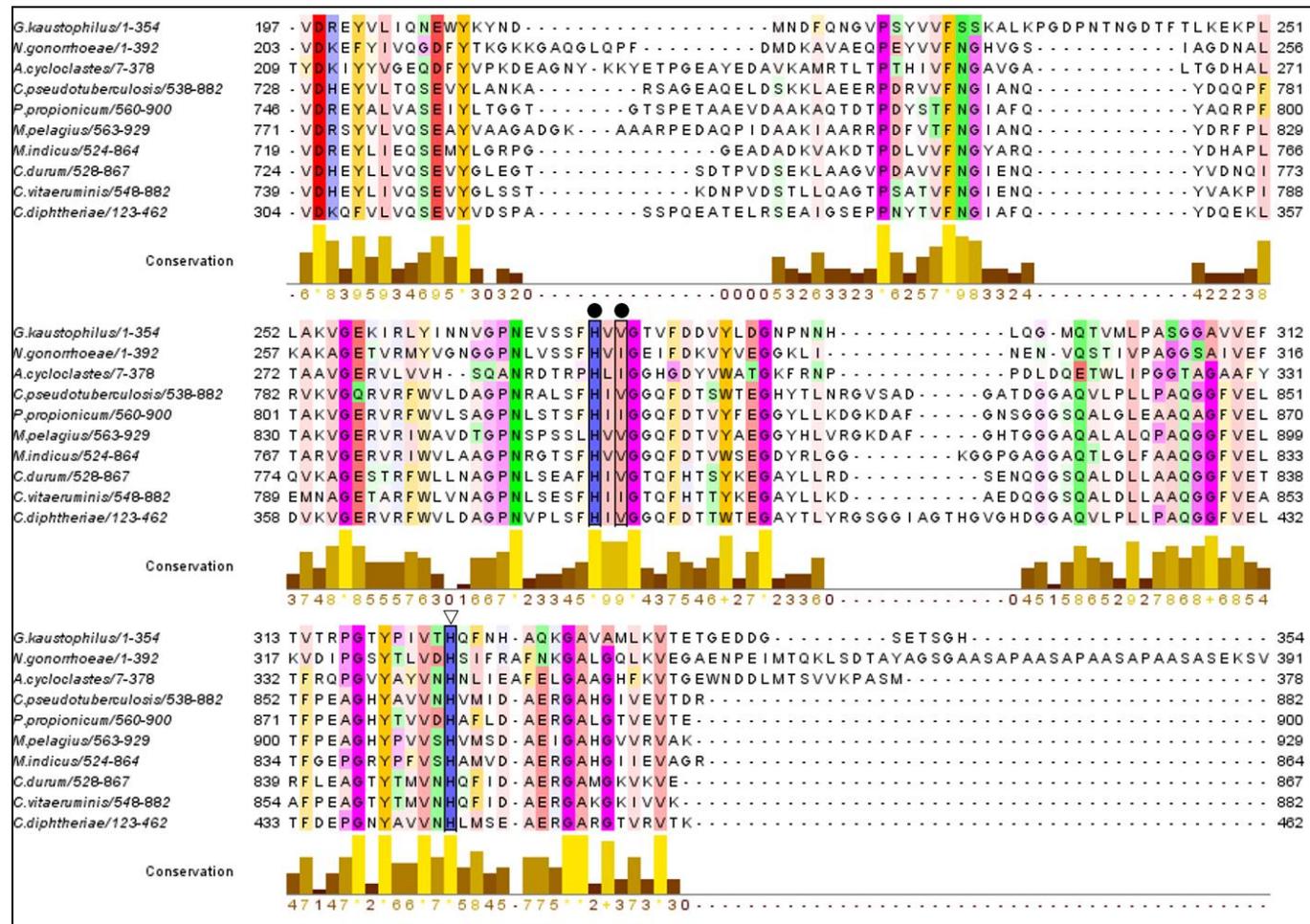


Figura 37.b (continuação) - Alinhamento múltiplo entre as sequências de CuNIR de *C. pseudotuberculosis*, *G. kaustophilus* e das demais sequências de organismos encontradas pelo BLAST. Os triângulos pretos representam a coordenação do átomo de cobre sobre T1Cu. Os triângulos brancos representam a coordenação do átomo de cobre sobre T2Cu. Os círculos pretos representam os resíduos chaves envolvidos na catálise enzimática.

Quadro 20 - É mostrada a posição dos resíduos nas sequências de CuNIR de *G. kaustophilus* e *C. pseudotuberculosis* como também a função de cada resíduo na estrutura de CuNIR de *G. kaustophilus* utilizada como referência, assim como a conservação de tais resíduos nas sequências de todos os organismos utilizadas no alinhamento múltiplo.

<i>G. kaustophilus</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	Conservação	Função
His 126	His 556	todos	Coordenação do átomo de cobre em T1Cu.
His 174	His 604	todos	
Cys 166	Cys 596	todos	
Met 179	Met 609	todos	
His 131	His 561	todos	Coordenação do átomo de cobre em T2Cu.
His 165	His 595	todos	
His 325	His 759	todos	
Asp 129	Asp 559	todos	Resíduos chaves envolvidos na catálise enzimática.
His 275	His 700	todos	
Val 277	Val 702	todos	

Através destas análises, pode-se concluir que apesar da baixa cobertura encontrada na região N-terminal de CuNIR de *C. pseudotuberculosis* quando comparada às sequências proteicas das enzimas pertencentes a organismos já bem caracterizados na literatura quanto a função e estrutura desta enzima, a região C-terminal apresentou todos os resíduos conservados na ligação aos átomos de cobre que compõem os centros de cobre T1Cu e T2Cu, como também os três resíduos-chaves envolvidos na catálise enzimática na estrutura de NirK da bactéria *G. kaustophilus*, evidenciando desta maneira, uma possível função conservada desta enzima em *C. pseudotuberculosis*.

Além disso, tal enzima é possivelmente uma proteína de membrana devido à presença das 12 hélices transmembrânicas na região N-terminal, sendo que nesta mesma região não foram encontrados valores significativos de cobertura de alinhamento quando comparada às sequências das demais enzimas já descritas na literatura. Apesar disso, foram encontradas enzimas com tamanhos similares à de *C. pseudotuberculosis* em organismos pertencentes ao filo Actinobactéria, as quais apresentaram altos valores de cobertura de alinhamento e valores significativos de identidade e similaridade. Neste contexto, pode-se destacar as enzimas de espécies pertencentes ao grupo CMNR, tais como *C. durum*, *C. vitaeruminis* e *M. indicus*, bactérias filogeneticamente próximas a *C. pseudotuberculosis*.

Por fim, é possível inferir que esta enzima apresenta indícios de que a mesma seja capaz de realizar a reação de redução de nitrito a óxido nítrico, a segunda etapa da via de desnitrificação. Além disso, há a possibilidade desta vir a ser uma enzima incomum às demais já bem estudadas experimentalmente, podendo ser uma ocorrência comum encontrada em alguns organismos pertencentes ao filo Actinobactéria, como observado pelos resultados do BLAST. Porém, estudos mais detalhados a respeito da sua atividade catalítica tanto *in vitro* como também *in vivo*, assim como a sua regulação, expressão sob condições variáveis precisam ser realizados para que possa haver uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta reação.

4.1.4.8. Óxido nítrico redutase

A estrutura de óxido nítrico redutase quinol-dependente (qNOR) de *G. stearothermophilus*, que catalisa a redução de NO para N₂O, foi recentemente caracterizada. Esta enzima é composta 14 hélices transmembrânicas e um domínio hidrófilo localizado no lado extracelular (Matsumoto et al., 2012).

O domínio transmembranar de qNOR contém heme *b*, heme *b*₃ e metais não-heme. Para além destes metais, um ion de cálcio foi detectado entre os hemes *b* e *b*₃ (Figura 38) (Matsumoto et al., 2012).

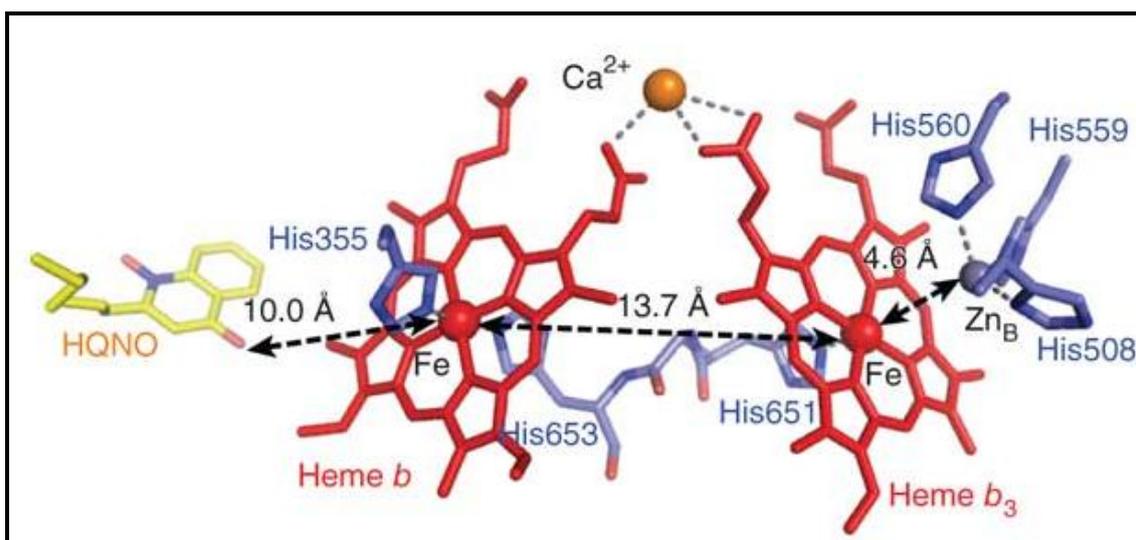


Figura 38: Disposição dos centros metal e redox de qNOR de *G. stearothermophilus*.

Os elétrons utilizados na redução de NO por qNOR são fornecidos a partir do menaquinol para o centro binuclear através do heme *b*. O heme *b* é ligado por meio dos resíduos conservados His355 His653, e o resíduo conservado His651 é o ligando para o heme *b*₃. O centro binuclear de qNOR é formado pelo metal não-heme e o ferro do heme *b*₃ (Figura 39). Embora o ferro seja normalmente encontrado como o metal não-heme, os estudos sugerem que o zinco (Zn_B) está presente em sua estrutura, o qual é ligado por três resíduos de histidina (His508, His559 e His560) (Matsumoto et al., 2012).

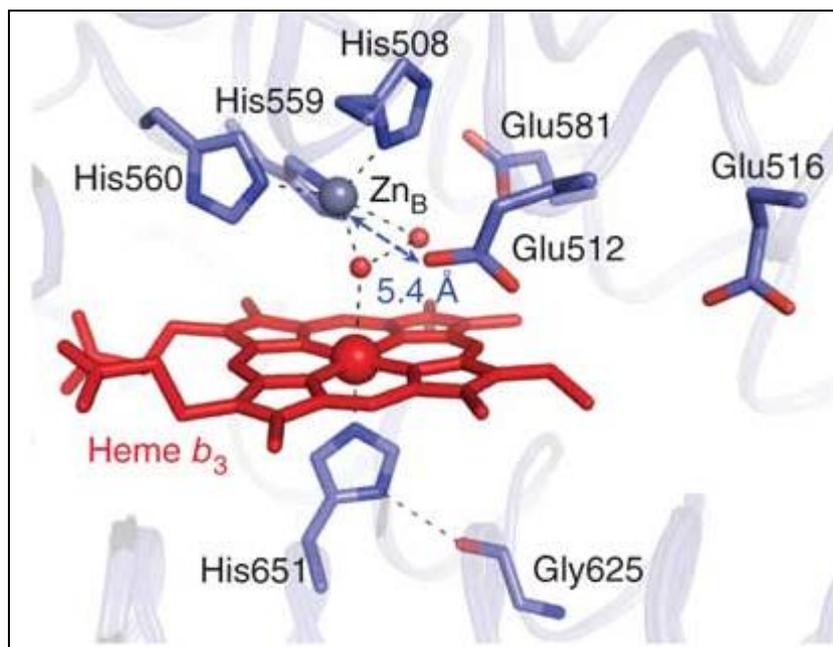


Figura 39: Estrutura do centro binuclear em qNOR. O ZnB metais não-heme é coordenado por três resíduos de histidina conservados e duas moléculas de água. O resíduo Glu512 essencial conservada não é um ligando para ZnB.]

Dois resíduos conservados de glutamato Glu512 e Glu581 estão localizados perto do centro da binuclear e estão envolvidos na transferência de prótons para redução catalítica de NO. Os mutantes para Glu512 e Glu581 não apresentaram atividade catalítica sugerindo que tais resíduos conservados são essenciais para a redução de NO (Matsumoto et al., 2012).

O íon de cálcio em qNOR é ligado pelos resíduos Tyr93, Glu429 e Gly91, por uma molécula de água, e pelos dois grupos de propionato dos hemes *b* e *b*₃ (Figura 40). Mutantes para os resíduos de ligação ao cálcio apresentaram uma diminuição da atividade catalítica o que demonstra um papel importante para este íon na função enzimática de da enzima. Uma das possíveis funções de Ca²⁺ é a manutenção da via de transferência de elétrons de heme *b* para heme *b*₃ e/ou modulação dos potenciais redox dos dois hemes para alcançar a transferência de elétrons eficaz (Matsumoto et al., 2012).

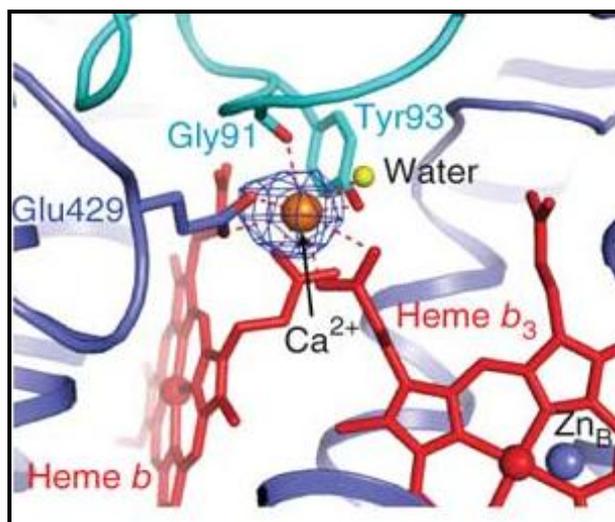


Figura 40: Disposição do íon de cálcio em qNOR. O íon cálcio é coordenado pelo Gly91, Tyr93, Glu429, heme b propionato, heme b₃ propionato e uma molécula de água. Os resíduos na N-terminal do domínio hidrofílico e aqueles nas regiões transmembranares são mostradas em ciano e azul, respectivamente.

Em *C. pseudotuberculosis*, 14 das 15 linhagens que possuem os genomas completamente sequenciados apresentam um gene responsável por codificar uma enzima óxido nítrico redutase quinol dependente (qNOR), estando ausente somente nas na linhagem *C. pseudotuberculosis* 1/06A. Em todas as outras linhagens a proteína correspondente ao gene é composta por 766 aminoácidos e busca por similaridade realizada através do BLAST (Quadro 21) foi encontrada uma sequência homóloga somente na espécie *C. diphtheriae* pertencente ao gênero *Corynebacterium*, a qual apresentou 79% de identidade e 90% de similaridade com a sequência correspondente a *C. pseudotuberculosis*. Além disso, também foram encontrados 47% de identidade com a qNOR de *N. gonorrhoeae* e 38% de identidade com a qNOR da bactéria Gram-positiva *Geobacillus stearothermophilus*, a qual possui uma estrutural de cristal conhecida. Foi observado também, 28% de identidade com a subunidade catálica NorB de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas stutzeri*.

Quadro 21: Resultados da busca por sequências similares à óxido nítrico redutase dependente de quinol qNOR de *C. pseudotuberculosis* através do BLAST.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Cobertura	Acesso/ Uniprot
Nitric-oxide reductase quinone-dependent	<i>C. diphtheriae</i>	763	79%	90%	98%	Q6NEM3
	<i>N. gonorrhoeae</i>	751	47%	63%	97%	D1E9Y0
	<i>G. stearothermophilus</i>	792	38%	56%	97%	B3Y963
Nitric oxide reductase subunit B	<i>P. aeruginosa</i>	466	28%	44%	63%	Q59647

A análise funcional da sequência de aminoácidos realizada pela ferramenta InterProScan (Figura 41) identificou que tal proteína pertence a família “citocromo c oxidase subunidade I”, o que está de acordo com a literatura no que diz respeito a grande similaridade entre tal subunidade e redutases de óxido nítrico, sendo que a mesma classificação quanto a família é encontrada também nas demais qNORs como também em NorB.

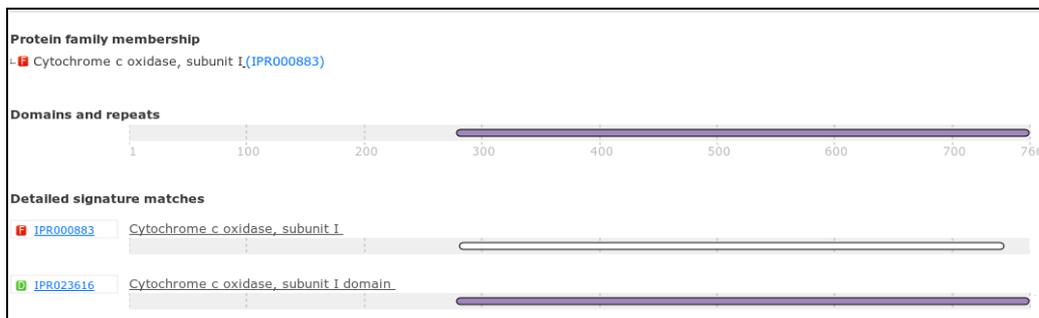


Figura 41: Resultado da busca por domínios proteicos conservados na sequência de aminoácidos de qNoR de *C. pseudotuberculosis*, usando o Interproscan5.

Através do programa TMHMM2.0, foi previsto que qNOR de *C. pseudotuberculosis* apresenta uma hélice transmembrânica na região N-terminal conectada por um domínio extracelular hidrofílico e 12 hélices transmembrânicas na região C-terminal (Figura 42).

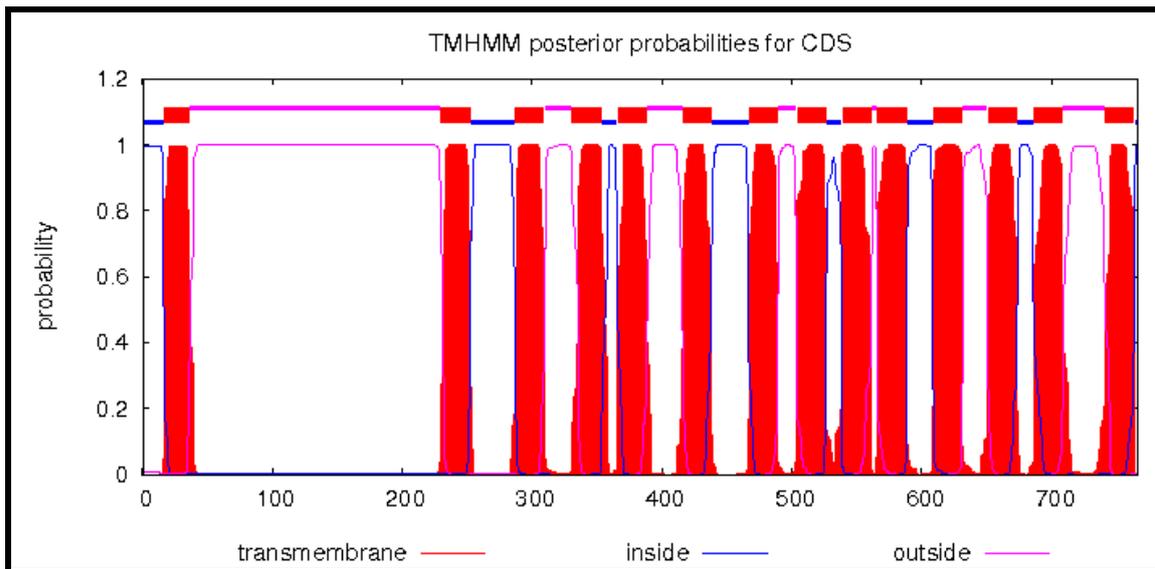


Figura 42: Predição dos domínios transmembrânicos de q NOR de *C. pseudotuberculosis* através do programa TMHMM2.0

Um alinhamento múltiplo entre as sequências de qNOR referentes a *C. pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae*, *N. gonorrhoeae* e *G. stearotherophilus* foi realizado a fim de verificar a conservação entre os resíduos funcionalmente importantes na estrutura da enzima, utilizando como referência a sequência proteica de qNOR de *G. stearotherophilus*, para a qual uma estrutura de cristal foi recentemente determinada.

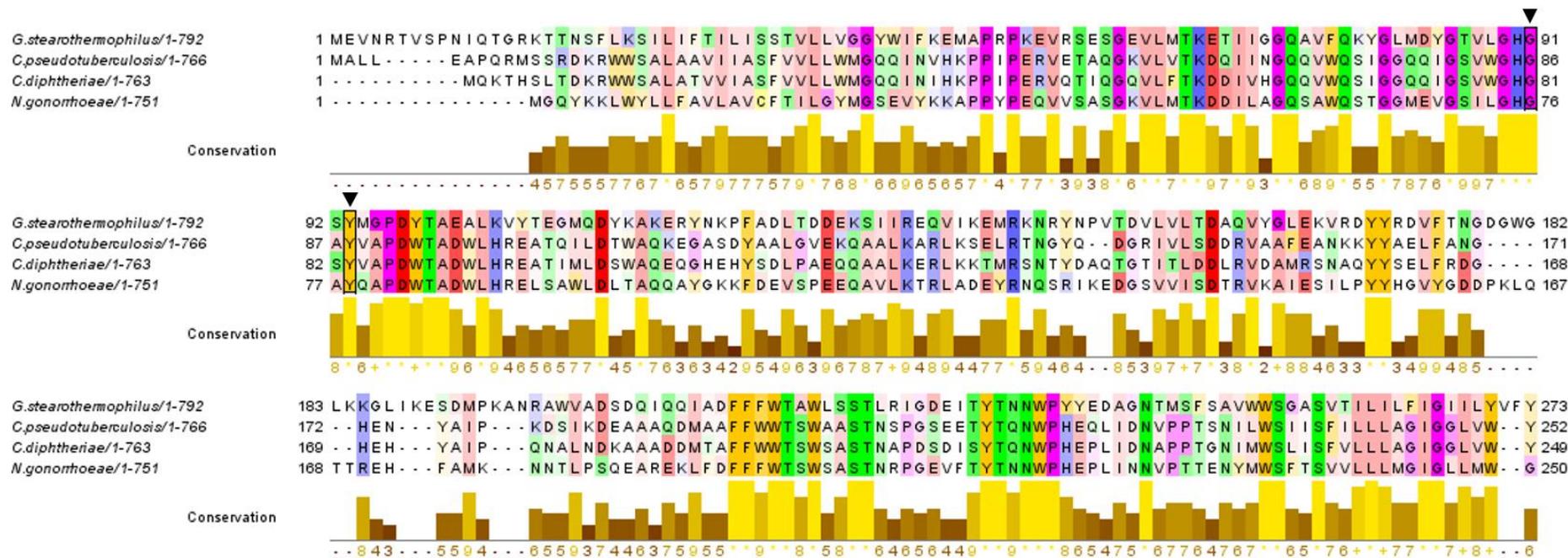


Figura 43 - Alinhamento múltiplo entre as seqüências de qNOR de *C. pseudotuberculosis*, *G. stearothermophilus*, *C. diphtheriae* e *N. gonorrhoeae*. Os triângulos preto representam os resíduos responsáveis pela ligação ao íon de cálcio. Os triângulos brancos representam os resíduos responsáveis pela ligação ao heme b. Os círculos pretos representam os resíduos responsáveis pela ligação ao heme *b3*. Os círculos brancos representa os resíduos responsáveis pela ligação do metal ZnB. Os quadrados pretos representam os resíduos envolvidos na transferência de prótons para a catálise enzimática. Os quadrados brancos representam os resíduos que fazem a ligação ao quinol.

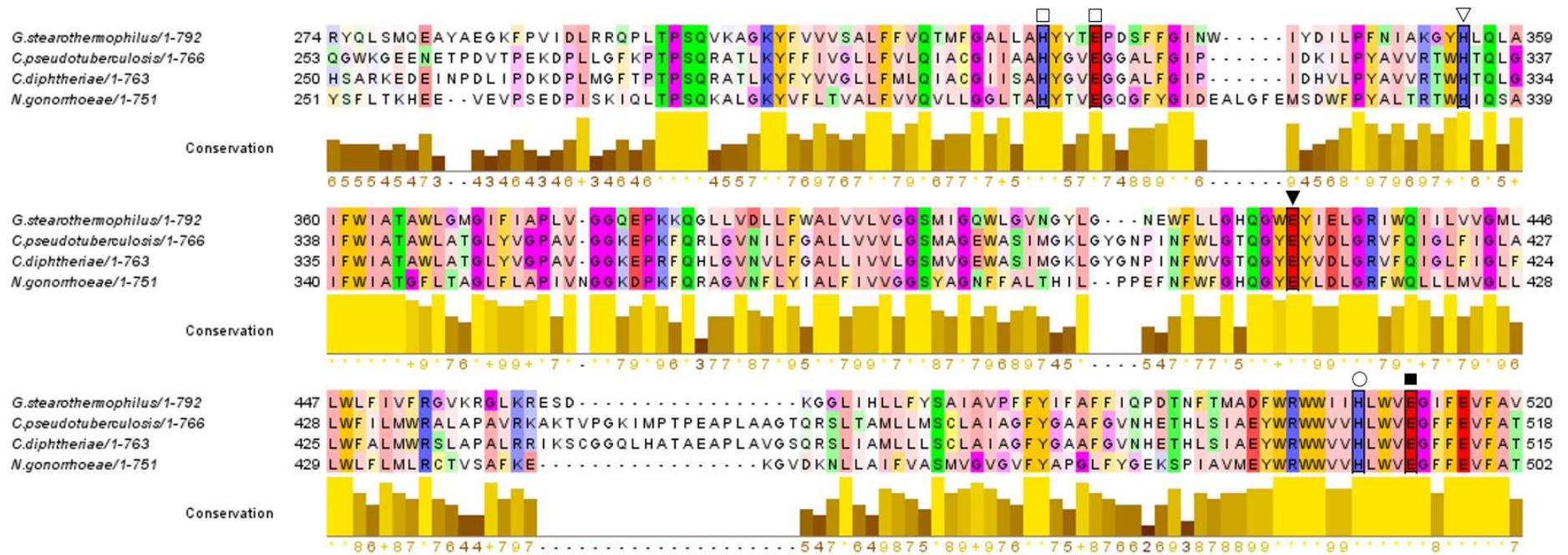


Figura 43 (continuação) - Alinhamento múltiplo entre as sequências de qNOR de *C. pseudotuberculosis*, *G. stearothermophilus*, *C. diphtheriae* e *N. gonorrhoeae*. Os triângulos preto representam os resíduos responsáveis pela ligação ao íon de cálcio. Os triângulos brancos representam os resíduos responsáveis pela ligação ao heme b. Os círculos pretos representam os resíduos responsáveis pela ligação ao heme b3. Os círculos brancos representa os resíduos responsáveis pela ligação do metal ZnB. Os quadrados pretos representam os resíduos envolvidos na transferência de prótons para a catálise enzimática. Os quadrados brancos representam os resíduos que fazem a ligação ao quinol.

No Quadro 22 estão listados os resíduos utilizados como referência para a análise do alinhamento, assim como os resíduos correspondentes na sequência de *C. pseudotuberculosis*, a conservação de tais resíduos entre as sequências analisadas, como também a função atribuída para tais resíduos na estrutura da enzima qNOR de *G. stearothermophilus*, utilizada como referência.

Quadro 22 - É mostrada a posição dos resíduos nas sequências de qNOR de *G. stearothermophilus* e *C. pseudotuberculosis* como também a função de cada resíduo na estrutura de qNOR de *G. stearothermophilus* utilizada como referência, assim como a conservação de tais resíduos nas sequências de todos os organismos utilizadas no alinhamento múltiplo.

Resíduos		Conservação	Função
<i>G. stearothermophilus</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>		
Gly91	Gly86	todos	O íon de cálcio é coordenado por Gly91, Tyr93, Glu429, heme <i>b</i> , heme <i>b3</i> e uma molécula de água.
Tyr93	Tyr88	todos	
Glu429	Glu410	todos	
His355	His333	todos	Ligação ao heme <i>b</i> .
His653	651	todos	Ligação ao heme <i>b3</i> .
His651	649	todos	
His508	506	todos	Coordenação de ZnB por três resíduos de histidina conservados.
His559	557	todos	
His560	558	todos	
Glu512	510	todos	Dois resíduos de glutamato conservados que estão envolvidos na transferência de prótons para a catálise
Glu581	579	todos	
Asp746	744	todos	Sítios de ligação ao quinol
His328	307	todos	
Glu332	311	todos	

Neste contexto, pode-se notar que todos os resíduos envolvidos na ligação ao menaquinol e ao heme *b*, assim como os de ligação ao heme *b3* e ao metal ZnB no centro bimetálico, como também os resíduos envolvidos na ligação ao cálcio e os dois resíduos de glutamato conservados envolvidos na transferência de prótons para a catálise enzimática, apresentam-se totalmente conservados na sequência de *C. pseudotuberculosis*, como também em todas as demais sequências utilizadas no alinhamento múltiplo.

Por fim, pode-se concluir a partir do conjunto de resultados obtidos através das análises realizadas para qNOR de *C. pseudotuberculosis* que, de fato, há grandes evidências sugerindo uma função conservada no que diz respeito redução de óxido nítrico (NO) para óxido nitroso (N₂O), na via de desnitrificação nas linhagens pertencentes ao biovar Equi. Para além do seu papel na desnitrificação, sendo *C. pseudotuberculosis* uma bactéria patogênica, é provável que esta enzima também seja utilizada como um mecanismo de defesa contra o sistema imune do hospedeiro, uma vez que os macrófagos utilizam o óxido nítrico como uma arma química contra agentes infecciosos, assim como descrito na literatura, sendo esta uma enzima encontrada tanto em bactérias desnitrificantes como também em bactérias patogênicas não desnitrificantes.

Sendo assim, seria interessante a realização de estudos mais detalhados a respeito da atividade e da função que essa enzima exerce em *C. pseudotuberculosis*, como por exemplo, a observação de quais seriam os efeitos correspondentes a uma mutação em tal enzima no crescimento e sobrevivência da bactéria *in vitro* quando expostas ao óxido nítrico, como também a capacidade de tais linhagens mutantes em sobreviver e persistir em camundongos infectados. Por conseguinte, inibidores específicos desta enzima podem representar uma estratégia potencialmente importante para combater infecções por *C. pseudotuberculosis* de ambos os biovars Equi e Ovis.

4.1.5. Proposta da via de redução de nitrato através de abordagens *in silico*

Com a cadeia respiratória identificada *in silico*, finalmente foi possível propor as vias de redução de nitrato. A via de desnitrificação (Figura 44 A) proposta para *C. pseudotuberculosis* biovar Equi é composta pelas enzimas nitrato redutase do tipo NAR, nitrito redutase dependente de cobre (CuNIR) e óxido nítrico redutase quinol dependente (qNOR), sendo que esta é uma via de desnitrificação incompleta, na qual o óxido nitroso é o produto final, não havendo, portanto, a presença da enzima óxido nitroso redutase e a consequente redução para o gás nitrogênio.

C. pseudotuberculosis biovar Equi também apresenta a via de amonificação (Figura 44 B) na redução dissimilatória de nitrato a amônio, que aqui foi proposta como sendo catalisada pelas enzimas nitrato redutase do tipo NAR e o complexo nitrito redutase NrfAH associado à membrana.

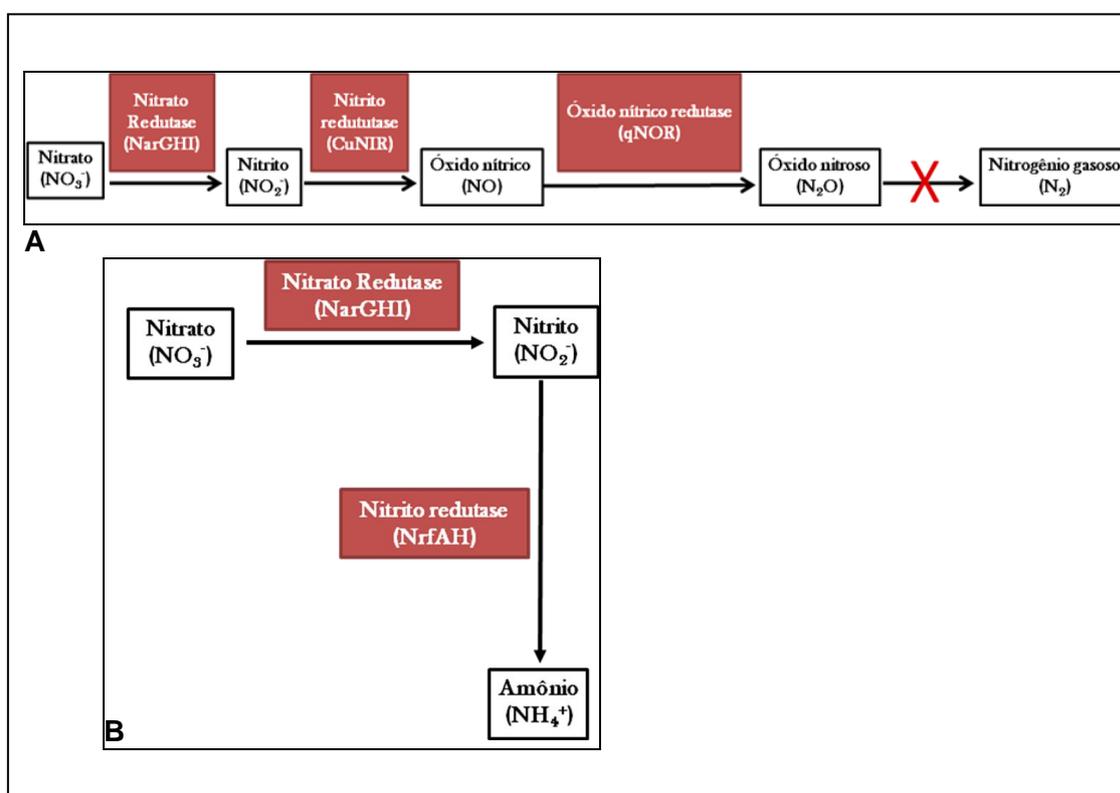


Figura 44 - Proposta da via de redução de nitrato em *C. pseudotuberculosis* biovar Equi. Em **(A)** a via de desnitrificação e em **(B)** a via dissimilatória de redução de nitrato a amônio.

É interessante observar que a presença de tais vias respiratórias nas linhagens pertencentes ao biovar Equi, pode indicar que tais linhagens são mais bem adaptadas

à condições ambientais diversas que podem ser encontradas, por exemplo, em compartimentos intracelulares fagossomais de macrófagos, nos quais o oxigênio pode não estar presente, representando, deste modo, um recurso adaptativo importante que pode ser utilizado para aperfeiçoar a produção de energia tais tais ambientes hostis, permitindo a sua sobrevivência, replicação e persistência em seus hospedeiros.

4.1.6. Comparação entre os genes, as enzimas e as vias presentes nas linhagens Equi e Ovis

Análise comparativa entre as 15 linhagens para identificação da via respiratória de nitrato também foi realizada, a Figura 45 é uma visão completa de todas as vias metabólicas presentes em ambos os biovars. A presença das enzimas e das vias propostas de redução de nitrato foi comparada entre as linhagens do biovar Ovis (representada pela linhagem 1002) e biovar Equi (representada pela linhagem 31).

Com relação às enzimas, a única e marcante diferença encontrada foi a presença da enzima nitrato redutase nas linhagens Equi e a ausência da mesma nas linhagens Ovis. Além disso, com exceção a enzima óxido nítrico redutase, todas as outras enzimas envolvidas nas vias de desnitrificação e redução dissimilatória de nitrato a amônio estão presentes em ambos os biovars. No entanto, devido à ausência da enzima nitrato redutase as linhagens pertencentes ao biovar Ovis não possuem nenhuma das duas vias propostas, uma vez que esta enzima é de fundamental importância para que ocorra a primeira reação de ambas as vias, no qual a redução de nitrato gera o nitrito que é utilizado como substrato para a segunda etapa de ambas as vias.

Assim sendo, tais vias respiratórias de redução do nitrato encontradas nas linhagens Equi de *C. pseudotuberculosis* podem vir desempenhar um importante recurso adaptativo no qual fornece energia para o metabolismo bacteriano em ambientes anaeróbicos, permitindo a persistência desta bactéria patogênica em seus hospedeiros específicos.

Além disso, a enzima óxido nítrico redutase presente em ambos os biovars Equi e Ovis, pode estar envolvida diretamente como um mecanismo de defesa contra o óxido nítrico gerado pelo sistema imune do hospedeiro como um mecanismo de defesa contra patógenos, contribuindo assim para sua virulência. O mesmo pode ser dito da enzima nitrito redutase geradora de amônio NrfAH, a qual é capaz de realizar a redução de substratos alternativos tais como o óxido nítrico e hidroxilamina, peróxido de hidrogênio e sulfito, apresentando uma função desintoxicante na fisiologia celular sob condições de estresses correspondentes.

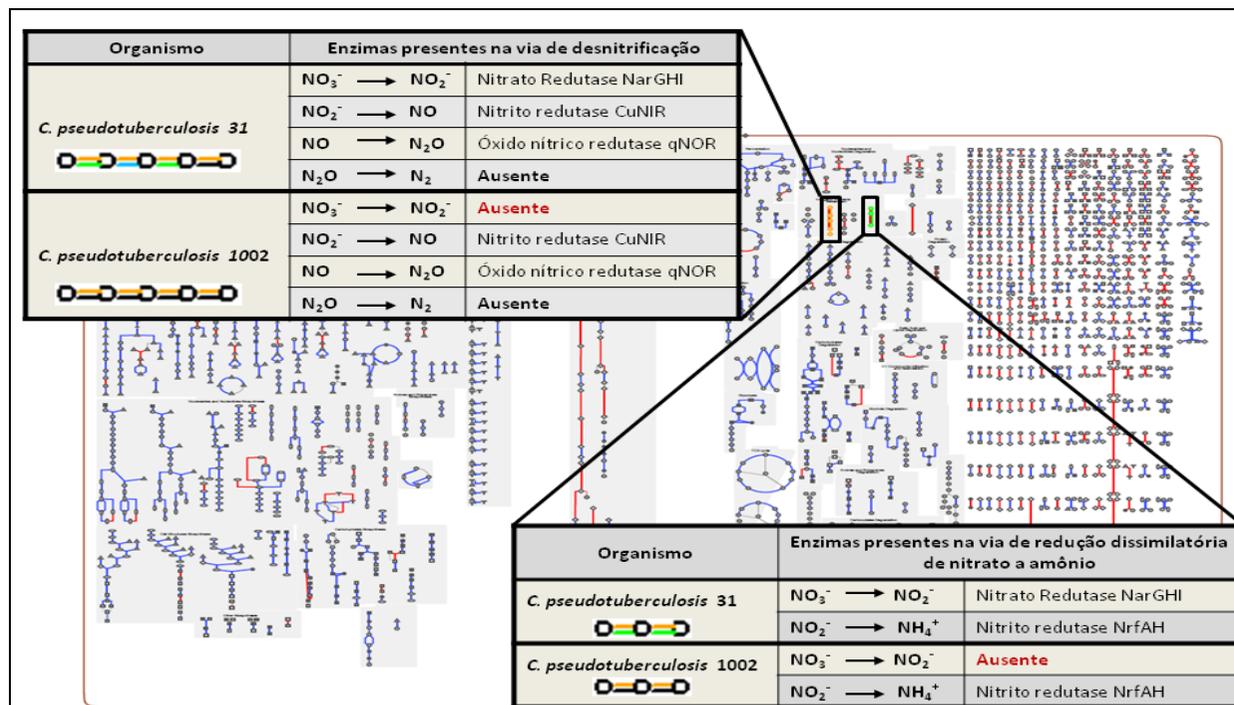


Figura 45 - Análise comparativa da via de desnitrificação e redução dissimilatória de nitrato à amônio entre as linhagens *C. pseudotuberculosis* 1002 e 31 realizadas através do programa Pathway Tools. A figura representa todas as vias metabólicas presentes nas duas linhagens. Os círculos representam um composto, molécula ou substância envolvida em alguma reação ou via metabólica destas bactérias, sendo os traços que ligam dois círculos adjacentes representam uma reação catalisada por uma enzima. As reações de cor azul são aquelas compartilhadas entre as duas linhagens, já as de cor vermelha estão presentes somente em *C. pseudotuberculosis* 31 (biovar Equi). É enfatizado nesta figura, as enzimas presentes e ausentes em nas vias de desnitrificação e redução dissimilatória de nitrato a amônio, em ambas as linhagens.

Parte II – Análise *in vitro* para identificação da via respiratória de redução de nitrato em *C. pseudotuberculosis* biovar Equi

4.2. Teste fenotípico para confirmar a capacidade de redução de nitrato em *C. pseudotuberculosis*

A atividade nitrato redutase foi detectada por meio do cultivo em caldo nutritivo suplementado com 0,5% de nitrato de potássio (KNO₃) como fonte de nitrato. A contraprova com zinco também foi aplicada e os resultados podem ser visualizados no Quadro 23. Os resultados observados corroboram com a literatura. Biberstein *et al.* (1978), utilizou testes bioquímicos para distinguir o biovar Equi (isolados de eqüinos e bovinos; redução de nitrato positivo) do biovar Ovis (isolado de ovinos e caprinos, redução de nitrato negativo).

Quadro 23 - Resultado do teste bioquímico para avaliar a capacidade redução de nitrato

Linhagens	Biovar	Redução de Nitrato
<i>C. pseudotuberculosis</i> 31	Equi	+
<i>C. pseudotuberculosis</i> 258	Equi	+
<i>C. pseudotuberculosis</i> 162	Equi	+
<i>C. pseudotuberculosis</i> 5297	Equi	+
<i>C. pseudotuberculosis</i> 1/06A	Equi	+
<i>C. pseudotuberculosis</i> 1002	Ovis	-
<i>C. pseudotuberculosis</i> C231	Ovis	-
<i>C. pseudotuberculosis</i> FRC41	Ovis	-
<i>C. pseudotuberculosis</i> PAT10	Ovis	-
<i>C. pseudotuberculosis</i> 262	Ovis	-

4.3. Teste genotípico para confirmar a presença dos genes envolvidos na redução de nitrato em *C. pseudotuberculosis*

Após identificação das sequências nucleotídicas nos genomas da linhagem 31, foram desenhados primers a fim de identificar se os genes responsáveis pela redução de nitrato também estavam presentes nas linhagens 258, 162, 5297 e 106/A de *C. pseudotuberculosis* sequenciadas. Todos os genomas estão depositados no NCBI e na sua primeira versão de sequenciamento estes genes não foram identificados, entretanto como pode ser observado no gel de agarose (Figura 46) o operon está presente em todas as linhagens testadas e em concordância com os testes bioquímicos realizados, o que evidencia a necessidade de resequenciamento para correção do genoma de tais linhagens.

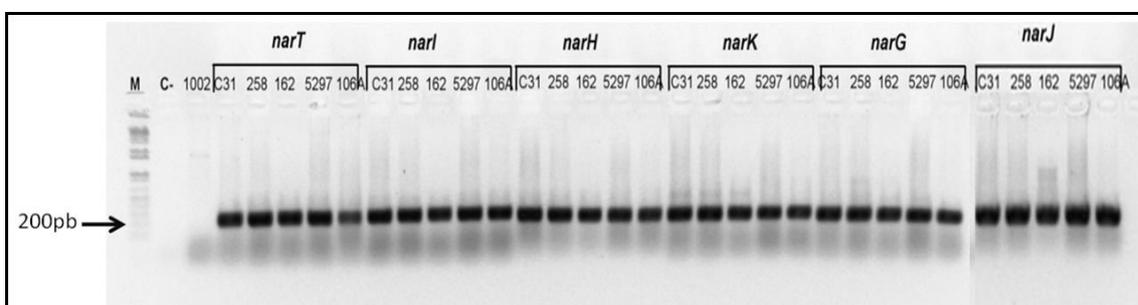


Figura 46 - Gel de agarose 1% contendo o resultado da PCR efetuada para confirmação molecular do operon nar nas linhagens 258, 162, 5297 e 106/A.

5. CONCLUSÕES

- *C. pseudotuberculosis* biovar Equi apresenta um sistema respiratório modular, constituído por vários doadores e receptores de elétrons, o qual pode ser utilizado para a adaptação das bactérias em ambientes variáveis.
- Foram identificados, o cluster para redução de nitrato *narKGHJI* em todas as linhagens pertencentes ao biovar Equi, o cluster *nrfAH* que codifica uma provável enzima nitrito redutase formadora de amônio, e o gene *nirK* que codifica uma provável nitrito redutase dependente de cobre (cuNIR).
- As análises de similaridade das sequências identificadas para *narKGHJI* e *nrfAH* são conservadas, assim como os resíduos analisados, indicando uma possível função conservada.
- Para além do seu papel na via respiratória, é possível que *C. pseudotuberculosis* utilize a enzima NrfAH como uma função desintoxicante na fisiologia celular sob condições de estresse correspondentes, devido ao fato desta enzima apresentar uma versatilidade reativa, sendo capaz de reduzir substratos alternativos, tais como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio.
- NirK apresentou baixa cobertura na região N-terminal, entretanto a região C-terminal apresentou todos os resíduos conservados na ligação aos átomos de cobre no sítio ativo, evidenciando uma possível função conservada. Além disso, tal região N-terminal possivelmente é composta por doze hélices transmembranicas, o que indica que esta é uma proteína ligada à membrana em *C. pseudotuberculosis*.
- Foi identificado em todas as linhagens de *C. pseudotuberculosis* o gene *norZ* que codifica uma provável óxido nítrico redutase dependente de quinol (qNOR). Este gene apresentou todos os resíduos conservados envolvidos na ligação aos cofatores, evidenciando uma possível função conservada.
- É possível que qNOR de *C. pseudotuberculosis* seja utilizada também como um mecanismo de defesa e adaptação ao ambiente hostil encontrado em seus hospedeiros, conferindo a este patógeno resistência ao estresse nitrosativo e portanto, ao óxido nítrico produzido pelos macrófagos como um mecanismo de defesa contra patógenos.
- É possível que os genes identificados *in silico* participem tanto de uma via de desnitrificação incompleta quanto de uma via de amonificação.
- *C. pseudotuberculosis* biovar Ovis apresentou a respiração por nitrato ausente.
- Todas as linhagens de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi testadas foram capazes de reduzir nitrato para nitrito em testes bioquímicos e apresentaram no genoma os genes responsáveis por codificar a Enzima Nitrato Redutase.
- Através da PCR foi possível observar a presença dos genes envolvidos na redução de nitrato em todas as linhagens testadas do biovar Equi.
- Os genes de redução de nitrato estavam ausentes em todas as linhagens testadas do biovar ovis.
- Para que ocorra a redução de nitrato em *C. pseudotuberculosis* biovar Equi é obrigatória a presença do operon *narKGHJI*.

- Há necessidade de ressequenciar os genomas do biovar Equi depositados, pois a ausência do cluster NAR indica um possível problema na tecnologia de sequenciamento utilizada.

6. PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram pela primeira vez identificados os genes que realizam a redução de nitrato e participam da cadeia respiratória de *C. pseudotuberculosis*, entretanto ainda há muitos pontos a serem esclarecidos. Para dar prosseguimento ao projeto, pretende-se:

- Ressequenciar os genomas de linhagens do biovar Equi;
- Confirmação a função das enzimas constituintes da cadeia de transporte de elétrons de *C. pseudotuberculosis* através de mutações;
- Analisar a expressão gênica do operon *narKGHJI* de *C. pseudotuberculosis* biovar Equi durante a respiração anaeróbica de nitrato;
- Avaliar a sobrevivência de linhagens mutantes *in vitro*;
- Avaliar a sobrevivência e virulência de linhagens mutantes *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

- Allen, J.W.A., Daltrop, O., Stevens, J.M., and Ferguson, S.J. (2003). C-type cytochromes: diverse structures and biogenesis systems pose evolutionary problems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 358, 255–266.
- Ayers, J. L. (1977). Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171, 1251-1254
- Baird GJ, Syngé B, Dercksen D. Survey of caseous lymphadenitis seroprevalence in British terminal sire sheep breeds. *Vet Rec.* 2004; 154: 505-6...
- Baird, G.J., and Fontaine, M.C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* 137, 179–210.
- Batey RG. Lesions of the head in ovine caseous lymphadenitis. *Aust Vet J.* 1986; 63: 131.
- Batey RG. The effect of caseous lymphadenitis on body condition and weight of Merino mutton carcasses. *Aust Vet J.* 1986; 63: 268
- Bertero, M.G., Rothery, R.A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J.H., and Strynadka, N.C.J. (2003). Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat. Struct. Biol.* 10, 681–687.
- Billington, S.J., Esmay, P.A., Songer, J.G., and Jost, B.H. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 41–45.
- Bott, M., and Niebisch, A. (2003). The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 129–153.
- Boulanger, M.J., and Murphy, M.E.. (2002). Crystal structure of the soluble domain of the major anaerobically induced outer membrane protein (AniA) from pathogenic *Neisseria*: a new class of copper-containing nitrite reductases. *J. Mol. Biol.* 315, 1111–1127.
- Brenner, S., Heyes, D.J., Hay, S., Hough, M.A., Eady, R.R., Hasnain, S.S., and Scrutton, N.S. (2009). Demonstration of Proton-coupled Electron Transfer in the Copper-containing Nitrite Reductases. *J. Biol. Chem.* 284, 25973–25983.
- BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; BIBERSTEIN, E.L.; MORSE, S.M. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, v.47, n.5, p.1116-1119, 1986.
- Buxton, A., Fraser, G., and others (1977). *Animal microbiology. Volume 1: immunology, bacteriology, mycology, diseases of fish and laboratory methods.* (Blackwell Scientific Publications.).

Carne, H.R., Wickham, N., and Kater, J.C. (1956). A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*.

Clarke, T.A., Mills, P.C., Pooch, S.R., Butt, J.N., Cheesman, M.R., Cole, J.A., Hinton, J.C.D., Hemmings, A.M., Kemp, G., Söderberg, C.A.G., et al. (2008). Escherichia coli Cytochrome c Nitrite Reductase NrfA. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 63–77.

Clegg, S.J. (2006). Role of the Escherichia coli nitrate transport protein, NarU, in survival during severe nutrient starvation and slow growth. *Microbiology* 152, 2091–2100.

Connor, K. M., Quirie, M. M., Baird, G. and Donachie, W. (2000) Characterization of United Kingdom isolates of *C. pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2633-2637.

Costa, M.S. da, Santos, H., and Galinski, E.A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. In *Biotechnology of Extremophiles*, G. Antranikian, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 117–153.

Crack, J.C., Jervis, A.J., Gaskell, A.A., White, G.F., Green, J., Thomson, A.J., and Le Brun, N.E. (2008). Signal perception by FNR: the role of the iron–sulfur cluster1. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1144.

Dorella, F.A., Carvalho Pacheco, L., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., and Azevedo, V. (2006a). *Corynebacterium pseudotuberculosis* : microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37, 201– 218.

Doherr, M.G., Carpenter, T.E., Hanson, K.M., Wilson, W.D., and Gardner, I.A.(1998). Risk factors associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in California horses. *Prev. Vet. Med.* 35, 229–239.

Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., and Kroneck, P.M. (1999). Structure of cytochrome c nitrite reductase. *Nature* 400, 476–480.

Einsle, O., Stach, P., Messerschmidt, A., Simon, J., Kroger, A., Huber, R., and Kroneck, P.M.H. (2000). Cytochrome c Nitrite Reductase from *Wolinella succinogenes*: STRUCTURE AT 1.6 Å RESOLUTION, INHIBITOR BINDING, AND HEME-PACKING MOTIFS. *J. Biol. Chem.* 275, 39608–39616.

Fedor, J.G., Rothery, R.A., and Weiner, J.H. (2014). A New Paradigm for Electron Transfer through *Escherichia coli* Nitrate Reductase A. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 4549–4556.

Fukuda, Y., Tse, K.M., Lintuluoto, M., Fukunishi, Y., Mizohata, E., Matsumura, H., Takami, H., Nojiri, M., and Inoue, T. (2014a). Structural insights into the function of a thermostable copper-containing nitrite reductase. *J. Biochem. (Tokyo)* 155, 123–135.

Fukuda, Y., Koteishi, H., Yoneda, R., Tamada, T., Takami, H., Inoue, T., and Nojiri, M. (2014b). Structural and functional characterization of the *Geobacillus* copper nitrite reductase: Involvement of the unique N-terminal region in the interprotein electron transfer with its redox partner. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1837, 396–405.

- Gao, Y., Meyer, B., Sokolova, L., Zwicker, K., Karas, M., Brutschy, B., Peng, G., and Michel, H. (2012). Heme-copper terminal oxidase using both cytochrome c and ubiquinol as electron donors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3275–3280.
- Giffin, M.M., Raab, R.W., Morganstern, M., and Sohaskey, C.D. (2012). Mutational Analysis of the Respiratory Nitrate Transporter NarK2 of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 7, e45459.
- González, P.J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C.D., and Moura, J.J.G. (2006). Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J. Inorg. Biochem.* 100, 1015–1023.
- Gross, R., Eichler, R., and Simon, J. (2005a). Site-directed modifications indicate differences in axial haem c iron ligation between the related NrfH and NapC families of multihaem c-type cytochromes. *Biochem. J.* 390, 689.
- Gross, R., Eichler, R., and Simon, J. (2005b). Site-directed modifications indicate differences in axial haem c iron ligation between the related NrfH and NapC families of multihaem c-type cytochromes. *Biochem. J.* 390, 689.
- Hall, K., McCluskey, B.J., and Cunningham, W. (2001). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections (Pigeon Fever) in horses in Western Colorado: An epidemiological investigation. *J. Equine Vet. Sci.* 21, 284–286.
- Heylen, K., and Keltjens, J. (2012). Redundancy and modularity in membrane-associated dissimilatory nitrate reduction in *Bacillus*. *Front. Microbiol.* 3.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P.H.A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Facultative anaerobic gram-negative rods, p. 249. In *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD
- Jervis, A.J., Crack, J.C., White, G., Artymiuk, P.J., Cheesman, M.R., Thomson, A.J., Le Brun, N.E., and Green, J. (2009). The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 4659–4664.
- Jia, W., and Cole, J.A. (2005). Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 159–161.
- Jia, W., Tovell, N., Clegg, S., Trimmer, M., and Cole, J. (2009). A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. *Biochem. J.* 417, 297.
- Jin, Y., Tian, Y., Zhang, W., Jang, S.-H., Jen, A.K.-Y., and Meldrum, D.R. (2010). Tracking bacterial infection of macrophages using a novel red-emission pH sensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 1375–1384.
- Jormakka, M., Richardson, D., Byrne, B., and Iwata, S. (2004). Architecture of NarGH Reveals a Structural Classification of Mo-bisMGD Enzymes. *Structure* 12, 95–104.
- Jung, J.-Y., Madan-Lala, R., Georgieva, M., Rengarajan, J., Sohaskey, C.D., Bange, F.-C., and Robinson, C.M. (2013). The Intracellular Environment of Human Macrophages That Produce Nitric Oxide Promotes Growth of *Mycobacteria*. *Infect. Immun.* 81, 3198–3209.

- Kern, M., and Simon, J. (2009). Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1787, 646–656.
- Kern, M., Einsle, O., and Simon, J. (2008). Variants of the tetrahaem cytochrome c quinol dehydrogenase NrfH characterize the menaquinol-binding site, the haem c-binding motifs and the transmembrane segment. *Biochem. J.* 414, 73.
- Kern, M., Winkler, C., and Simon, J. (2011). Respiratory nitrogen metabolism and nitrosative stress defence in ϵ -proteobacteria: the role of NssR-type transcription regulators. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 299–302.
- Khan, A., and Sarkar, D. (2012). Nitrate reduction pathways in mycobacteria and their implications during latency. *Microbiology* 158, 301–307.
- Kraft, B., Strous, M., and Tegetmeyer, H.E. (2011). Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution. *J. Biotechnol.* 155, 104–117.
- Kranz, R.G., Richard-Fogal, C., Taylor, J.-S., and Frawley, E.R. (2009a). Cytochrome c Biogenesis: Mechanisms for Covalent Modifications and Trafficking of Heme and for Heme-Iron Redox Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 510–528.
- Kranz, R.G., Richard-Fogal, C., Taylor, J.-S., and Frawley, E.R. (2009b). Cytochrome c Biogenesis: Mechanisms for Covalent Modifications and Trafficking of Heme and for Heme-Iron Redox Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 510–528.
- Leferink, N.G.H., Antonyuk, S.V., Houwman, J.A., Scrutton, N.S., Eady, R.R., and Hasnain, S.S. (2014). Impact of residues remote from the catalytic centre on enzyme catalysis of copper nitrite reductase. *Nat. Commun.* 5.
- Lockwood, C.W.J., Clarke, T.A., Butt, J.N., Hemmings, A.M., and Richardson, D.J. (2011). Characterization of the active site and calcium binding in cytochrome c nitrite reductases. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1871–1875.
- Matsumoto, Y., Tosha, T., Pislakov, A.V., Hino, T., Sugimoto, H., Nagano, S., Sugita, Y., and Shiro, Y. (2012). Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 238–245.
- Merchant, I.A., and Packer, R.A. (1967). *The genus corynebacterium (Veterinary Bacteriology and Virology. USA: The Iowa State University Press).*
- McKean, S.C., Davies, J.K., and Moore, R.J. (2007). Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 degrees C. *Res. Microbiol.* 158, 279– 286.
- Nairn, M. E. and Robertson, J. P. (1974). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. *Australian Veterinary Journal* , 50,537-542
- Nishimura, T., Teramoto, H., Vertes, A.A., Inui, M., and Yukawa, H. (2008). ArnR, a Novel Transcriptional Regulator, Represses Expression of the narKGHJI Operon in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190, 3264–3273.

- Nishimura, T., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2011). Gene Expression Profiling of *Corynebacterium glutamicum* during Anaerobic Nitrate Respiration: Induction of the SOS Response for Cell Survival. *J. Bacteriol.* *193*, 1327–1333.
- Nishimura, T., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2014). *Corynebacterium glutamicum* ArnR Controls Expression of Nitrate Reductase Operon narKGHJI and Nitric Oxide (NO)-Detoxifying Enzyme Gene hmp in an NO-Responsive Manner. *J. Bacteriol.* *196*, 60–69.
- Nojiri, M., Xie, Y., Inoue, T., Yamamoto, T., Matsumura, H., Kataoka, K., Deligeer, Yamaguchi, K., Kai, Y., and Suzuki, S. (2007). Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 4315–4320.
- Nojiri, M., Koteishi, H., Nakagami, T., Kobayashi, K., Inoue, T., Yamaguchi, K., and Suzuki, S. (2009). Structural basis of inter-protein electron transfer for nitrite reduction in denitrification. *Nature* *462*, 117–120.
- Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM, Kerr TG. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis.* 1997; *24*: 185-91
- Philippot, L. (2005). Denitrification in pathogenic bacteria: for better or worst? *Trends Microbiol.* *13*, 191–192.
- Piontkowski, M.D., and Shivvers, D.W. (1998). Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* *212*, 1765–1768.
- PINTO, A. C. Análise em larga escala da expressão diferencial de *corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a estresses abióticos. Tese (Doutorado em Microbiologia) –Universidade Federal de Minas Gerais, pp. 1-214, 2011.
- Pittman, M.S., Elvers, K.T., Lee, L., Jones, M.A., Poole, R.K., Park, S.F., and Kelly, D.J. (2007). Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress: Roles of Nap and Nrf systems in *C. jejuni*. *Mol. Microbiol.* *63*, 575–590.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1737p.
- Ramos, R. T. J., A. R. Carneiro, S. de Castro Soares, S. Barbosa, L. Varuzza, G. Orabona, A. Tauch, V. Azevedo, M. P. Schneider, A. Silva. 2013. High efficiency application of a mate-paired library from next-generation sequencing to postlight sequencing: *Corynebacterium pseudotuberculosis* as a case study for microbial de novo genome assembly. *J. Microbiol. Methods.* *95*:441-447
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., and Portmann, R.W. (2009). Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science* *326*, 123–125.

Raybourne, R.B., and Bunning, V.K. (1994). Bacterium-host cell interactions at the cellular level: fluorescent labeling of bacteria and analysis of short-term bacterium-phagocyte interaction by flow cytometry. *Infect. Immun.* 62, 665–672.

Riegel P., Ruimy R., de Briel D., Prévost G., Jehl F., Christen R., Monteil H., Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev., *FEMS Microbiol. Lett.* 126 (1995) 271–276.

Richardson, D.J. (2000). Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* 146, 551–571.

Rodionov, D.A., Dubchak, I.L., Arkin, A.P., Alm, E.J., and Gelfand, M.S. (2005). Dissimilatory Metabolism of Nitrogen Oxides in Bacteria: Comparative Reconstruction of Transcriptional Networks. *PLoS Comput. Biol.* 1, e55.

Rodrigues, M.L., Oliveira, T.F., Pereira, I.A.C., and Archer, M. (2006). X-ray structure of the membrane-bound cytochrome c quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination. *EMBO J.* 25, 5951–5960.

Rothery, R.A., Workun, G.J., and Weiner, J.H. (2008). The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 1897–1929.

Selim, S.A. (2001). Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48, 241–258.

Schumann, W. (2007). Thermosensors in eubacteria: role and evolution. *J. Biosci.* 32, 549–557.

Shiro, Y., Sugimoto, H., Tosha, T., Nagano, S., and Hino, T. (2012). Structural basis for nitrous oxide generation by bacterial nitric oxide reductases. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 1195–1203.

SILVA, A.; SCHNEIDER, M.P.; CERDEIRA, L.; BARBOSA, M.S.; RAMOS, R.T.; CARNEIRO, A.R.; SANTOS, R.; LIMA, M.; D'AFONSECA, V.; ALMEIDA, S.S.; SANTOS, A.R.; SOARES, S.C.; PINTO, A.C.; ALI, A.; DORELLA, F.A.; ROCHA, F.; DE ABREU, V.A.; TROST, E.; TAUCH, A.; SHPIGEL, N.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* 119, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. *J. Bacteriol.*, 193 (1): 323-324, 2012.

Singathia, R., Mishra, R., Yadav, R., Gangil, R., Dutta, P., Lakhotia, R.L., and others (2011). THERAPEUTIC MANAGEMENT OF ULCERATIVE LYMPHANGITIS IN A MARE. *Haryana Vet.* 50, 103–104.

Simon, J. (2002). Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 285–309.

Simon, J., and Klotz, M.G. (2013a). Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1827, 114–135.

Simon, J., and Klotz, M.G. (2013b). Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1827, 114–135.

- Simon, J., Gross, R., Einsle, O., Kroneck, P.M.H., Kröger, A., and Klimmek, O. (2002). A NapC/NirT-type cytochrome c (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome c nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*: Cytochrome c nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. *Mol. Microbiol.* *35*, 686–696.
- Sohaskey, C.D. (2005a). Regulation of nitrate reductase activity in *Mycobacterium tuberculosis* by oxygen and nitric oxide. *Microbiology* *151*, 3803–3810.
- Sohaskey, C.D. (2005b). Regulation of nitrate reductase activity in *Mycobacterium tuberculosis* by oxygen and nitric oxide. *Microbiology* *151*, 3803–3810.
- Sohaskey, C.D. (2008). Nitrate Enhances the Survival of *Mycobacterium tuberculosis* during Inhibition of Respiration. *J. Bacteriol.* *190*, 2981–2986.
- Sohaskey, C.D., and Wayne, L.G. (2003). Role of narK2X and narGHJI in Hypoxic Upregulation of Nitrate Reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* *185*, 7247–7256.
- Songer, J.G., Beckenbach, K., Marshall, M.M., Olson, G.B., and Kelley, L. (1988). Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* *49*, 223–226.
- Sparacino-Watkins, C., Stolz, J.F., and Basu, P. (2014). Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem. Soc. Rev.* *43*, 676.
- Spier, S.J., Leutenegger, C.M., Carroll, S.P., Loye, J.E., Pusterla, J.B., Carpenter, T.E., Mihalyi, J.E., and Madigan, J.E. (2004). Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Am. J. Vet. Res.* *65*, 829–834.
- Spier, S.J., Toth, B., Edman, J., Quave, A., Habasha, F., Garrick, M., and Byrne, B.A. (2012). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi in soil. *Vet. Rec.* *170*, 180–180.
- Suharti, null, and de Vries, S. (2005). Membrane-bound denitrification in the Gram-positive bacterium *Bacillus azotoformans*. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 130–133.
- Sutherland, S. S., Hart, R. A. and Buller, N. B. (1996). Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. *Veterinary Microbiology*, *49*, 1-9
- Takeno, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K., and Ikeda, M. (2007). Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *75*, 1173–1182.
- Tan, M.P., Sequeira, P., Lin, W.W., Phong, W.Y., Cliff, P., Ng, S.H., Lee, B.H., Camacho, L., Schnappinger, D., Ehrhart, S., et al. (2010). Nitrate Respiration Protects Hypoxic *Mycobacterium tuberculosis* Against Acid- and Reactive Nitrogen Species Stresses. *PLoS ONE* *5*, e13356.
- Vaneechoutte, M., Riegel, P., Briel, D., Monteil, H., Verschraegen, G., De Rouck, A. and Claeys, G. (1995). Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res. Microbiol.*, *146*:633-641.

- Vergnes, A., Pommier, J., Toci, R., Blasco, F., Giordano, G., and Magalon, A. (2006). NarJ Chaperone Binds on Two Distinct Sites of the Aponitrate Reductase of *Escherichia coli* to Coordinate Molybdenum Cofactor Insertion and Assembly. *J. Biol. Chem.* 281, 2170–2176.
- Watmough, N.J., Field, S.J., Hughes, R.J.L., and Richardson, D.J. (2009). The bacterial respiratory nitric oxide reductase. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 392.
- Wilson, M.J., Brandon, M.R., and Walker, J. (1995). Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 206–211.
- Yan, H., Huang, W., Yan, C., Gong, X., Jiang, S., Zhao, Y., Wang, J., and Shi, Y. (2013). Structure and Mechanism of a Nitrate Transporter. *Cell Rep.* 3, 716–723.
- Zakian, S., Lafitte, D., Vergnes, A., Pimentel, C., Sebban-Kreuzer, C., Toci, R., Claude, J.-B., Guerlesquin, F., and Magalon, A. (2010). Basis of recognition between the NarJ chaperone and the N-terminus of the NarG subunit from *Escherichia coli* nitrate reductase: Structural basis for peptide recognition by NarJ. *FEBS J.* 277, 1886–1895.
- Zavoshti, F.R., Sioofy-Khojine, A.B., Mahpeikar, H.A., and others (2009). A case report of ulcerative lymphangitis (a mini review of causes and current therapies). *Turk J Vet Anim Sci* 33, 525–528.
- Zheng, H., Wisedchaisri, G., and Gonen, T. (2013a). Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger. *Nature* 497, 647–651.
- Zheng, H., Wisedchaisri, G., and Gonen, T. (2013b). Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger. *Nature* 497, 647–651.
- Zumft, W. (2005). Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J. Inorg. Biochem.* 99, 194–215.

ANEXOS

Sequencia de aminoácidos do cluster NAR de *C. pseudotuberculosis*

>Cp258_0388 narI Nitrate reductase gamma subunit 399625:400404 reverse MW:29186
MHSYDMFLWVAFPLAIAAFVAVGVSWRWRDQFGWTHSSQIYESTLLRLSSPLFHYGMM
FVILGHVMGLAFPKSWTRAVGINDHAYHLIATIPGTIAGIAAVVGLCGLIYRRVSNKAVF
LSTSKSDKVMYILLTLAILSGFIATVSTQVFGGPHGYDYRETISPWLRQLFVFNVPPELM
MDVPWQFKVHVAGFTMLAVPFTRLVHAFSAPVGYVNRPYVYRSRDITQPSQQHVAW APVQHDKNQSKDEAGWAGA
>Cp258_0389 narJ Nitrate reductase subunit delta 400417:401094 reverse MW:25056
MRHTHTGVVPSPTARIAMSDEQRRVVFMAASLLLDYPDERWQSIVDAVSLQVNALPKKTKQ
HFVRFLLTAARVMGRGMEQHYVECFDQRRRCSLFLSYAVGDTRQRGAAILAFQESLETL
GFFLDREELPDHLCVVLEVAKAESAHHVATDMLAAHRDGEIVLRVALEHLDSYSGLV
AAVCSALPDIDEDTRHNFVDLIRSGPPAELIGIESPLFPPTASNV >Cp258_0390 narH Nitrate reductase beta
subunit 401098:402699 reverse MW:59630
MKVMAQIAMIIMNLDKICIGCHTCSVTCKQAWTNREGTEYIWFNNVETRPGVGYPYGWENQD
KWEQGWVLDKKGKLPKRSRGLKLLSTLTFHNPPLPTIQDYEPWYIYKLLSTPAGQKT
QPTARPIQIDGRPMDTISWSSNWDNLGGSQETLDDDPVLKQMNLEVKKEIEDAFMFYL
PRICEHCLNPTCVSSCPGAMYKRAEDGIVLVDQDRCRGWRMCVSGCPYKVVYFNHKTGK
AEKCTLCYPRIEVGPQTVSETCVGRMRYLGVLLYDADKVASAASPDPVKDLYKAQKDLL
LDPHDPQVIEAAMQENIPHAWIEAAQKSPIWDLIARYEVALPLHPEYRTPMVMVYIPPLS
PVVDRVTATGNDGEDHKILLTAISTMRIPLDYLAGIFTAGDTPVEKVLKLAAMRSYMR
DVSIGKQTBESIPAAVGMGTDIKNMYHLLGVSKYDDRYVIPTASPETPRGIAASLPEYAG
INPAQSIEEFHGLGPGAPEACHQEASHSRGEKVSLSASWSVGSTPSSMFPSPRKN >Cp258_0391 narG Nitrate reductase
alpha subunit 402699:406421 reverse MW:138953
MSNPDSINPLFKLGNFVRKGETGKEGQQIFLKGGRQADVFRNRWAFDKMVRSTHGVNCT
GSCSWKVYVKDGVITWESQAVDYPTTGPDPDYEPRGCPRGASFWSYTYSPTRVRYPYAR
GVLVDMYREAKQRLGDPVLAWEIQETPEKRDAYSQRGKGLIRIPYEEAIEMASAAHV
YTIRKHGPDRIAGFTVIPAMSQVSYGAGTRFLQNIQGGVALSFYDWDYADLPPASPQTFGDQ
TDVPESGDWFNSAYLMMWGSNIPVTRTPDAHFMAEVRYKGTKIVTVSPDFADNTKFADEW
LRIEPGTDAALAFMGHVI LKEFHVKGKREPYFLNYMRKFTDQSGFLVTLDDQREDGTYTPGK
FLTASNTSPELKNSENATHRYLMEKDGHVIDPGGTVAHDWGDAGVGKWNLSLDGVDPV
MSIADTEQFDTAEVLFPRFDLDAEAEDINGSPIGAGIVHRGVPVRKVDGQLVTTVFDIM
LAHYGVNREELNLPQSWPTSYEDASEVGTPAWQEGITGVPMAAAIRVGRFEGQSAADSKG
RSQILMGAGVNHYPHADNITYRFLALTSMTGTTQGVNGGGWAHYVGGQEKLRPMNGWQQYAM
ATDWVRPPRQMITTGFYFYGTEQWRYDNSHASRLGSPASRDVIGDKMLSDTMVEAMKRG
WMPSPYQFNRNPLVLADEAKNAGMEVADYVADQLQSGQMKFAYEDPSAPENWPRIILLNWR
TNLMGSSAKGTEFFLRHLLGIDSDATAPELQEGERPKTIITWRDAPHGKLDLMLTTDFRNT
STTLVSDIILPAAWYKNDMSSTDMHPYLHSFNAAINPWEARTDFEVFRDLSKRFSEM
AVTWLGVQHDVVTSPSHSDSPDEMTIANGIVPDINKVGYVPLTMPKMAVVERDYSKIYE
KWMHLGLPLASAGTAVHGTFKFDVSKQVEEIAAINGVNETSFGPRPRLDTAIKVINAILHM
SGVSNGEVAEAGFKFLSKRTGKDLTVLGENNCDARITWDDIKERPAEVLTSPEWTADKRN
GRRYTAFSINIEHDKPFHTLTGRMHYYIDHDWFMDYGEALPVFRPLDRLHLNGETRPGE
FLSGENGDPVTVRYLTHNKWSIHSQYFDNLHVLVSVSRGGQVIWMSDKDAEKIGVKDNE
WIEAYNRNGVVSARAIVSHRIPEGTVLMNHAQERTAGTPLNEKTGRRGGTHNSLTRITIK
PVHIAAGYGQLTYHFNYIGPTGNRDEVTIRRRSQEVQY >Cp258_0392 narK Nitrate transporter
406464:407795 reverse MW:47802
MATINASSRVLGTWNPEDPDADWDSKIAWRTLIITTYSLFIGFATWYLVSAIAPQLNQIGF
HFSKPQLYWLSSASGLAAGFSRLAFMFLPPIVGRKMTVTVSSFVLALPMVGWFFFAVINPA
TPYWWMLVLSVAGGLGGGVFSGYMPPTGYFFPKSKAGTALGLQAGIGNFGVFSFIQLVAPL
LMGVSLLGVAQPQLRIDGSEVHVHTPAIFMVPWTILAGVLAWLYLKDVPIKANFRQQMD
IFGNSNTWIMTLIYLATFGAFSGFAAQFALLVNNIYGANSSLAATFEASELPKGAFAFL
GPLISAAIRAAGPLCDRFGGAIWTFISCAGMSISTAVAAFLNPTDPSQFWYFLAAML
MFFFTGLGNAGTFKQMPMIFPQQAGGVIWTAIAAFGPFVGVIVSSFGAPAFFWGCV VFFALCAALTWIFYARPRAPFAG
>Cp258_0393 narT Nitrate transporter 408140:409438 reverse MW:46634
MSHDSTQSGHIAPSEQEPTPQGANAVLIFSTVSTMMFAVWLMFGILGTPIQKEFGLSDT
QLSWILAVAILNGSMWRPAGILADKIGGRKVMGLISLFSAAASLGVAFSQNYAMTLVLA
FLVGFSGNSFTAGAAWTSAWFPKHKQGFALGVFGAGNVGASVTKFIGPIIIASTAGSTYL
GFIPAGWRLPIIYSALLIITILMMIYTPKVDVRFSSSGRSLSEMLTPLKQVRVWRFSLY
YVVVFGAYVALSATLPKYYIANYDVSLAVAGLLTAIFIFPASLLRPVGGWFSDRYGARRA

MYGTFFFAMAASAALLSLPSKFISIFVFTALVVFILGCAMGIGKAAVYKHIPEYFPHDVGAV
 GGLVGMGLGLGGFFLPPLFAYTKTWTGWSTSPFIVLFALVAVSALWMHLTVHRMLHNQVP ELKHHLEMPVSH

Sequencia de aminoácidos do operon NAR de *C. pseudotuberculosis*

>nrfA - 318000: 319451 MW: 54968.203
 MSTHASKTRRRYLITGAIIVVTALITMSITALLINIMERKSEVTDHFAKVVNIDENVVDP
 AEWGKNFPLQYESYLKTSSEMGATTHGGSAKESRQDDKDPRETVAKSRIEEDPRLKEMWA
 GYAFVDYREARGHQYMLDDQRKTKRVTEFKQPGTCLNCHASTVKLMNDLGNGNVDEGFK
 KMNKMSYKEVTQLAEHPVACIDCHDPKTMELRVTRPAFINGIRDLKASQGVKDFNVNRDA
 THEEMRSYVCGQCHVEYYFEGEDKTLTFPWAKGIEIDQIWDYYKENGHVDFVNAKTGADI
 VKAQHPFDFVWSNSIHAQNGVSCSDCHMPYERHGAKKVVSSHHLQSPLLNINNSCMTCHNS
 SDEEMKQRVEQIQDRFIHSRDQAFDSLTLALIKDLEKAKDDPATPQDRLKLAREYQNKASF
 YLDYVYSSENSNGFHAPDYTRIIISDLSLDSARKGQVLVQGVDPKLTLEPSGVTQKNKEAAKT
 MW: 17778.373 MSAGMRKHRVLTSAALVVQVLAIFVIGSFVGVGLYTFIYAKGYSYLGNDPKACVNVCHVMEP
 QYNLAWSHSAVATCNDCHVPHDNIHVHYLVKAEHGVNHGFKFTTGWFPDNIQIRDASR
 KVTNEACLSCHGEFTSDIHGTYGENQIQCTHCHATVGHKTR

. Caracterização e análises in silico das proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo respiratório e cadeia de transporte de elétrons de *C. pseudotuberculosis*

NADH desidrogenase

Todas as 15 linhagens de *C. pseudotuberculosis* que possuem o seus respectivos genomas completamente sequenciados e depositados no NCBI possuem um gene *ndh* responsável por codificar a enzima NDH-2, enquanto que o operon *nuo* não está presente em seus genomas. NDH-2 é uma pequena proteína de membrana monotópica que catalisa a transferência de elétrons do NADH através de um cofactor flavina (FAD) para quinona. Em bactérias, NDH-2 são enzimas associadas ao lado citoplasmático da membrana celular (Heikal et al., 2014). A proteína NDH-II consiste em 452 resíduos, e os resultados referentes à busca por similaridade através do UniProt por meio da ferramenta BLAST a partir do banco de dados “UniprotKB” e “UniprotKB/Swiss-Prot” estão listados na tabela abaixo.

Quadro 24: Resultados obtidos através da busca de similaridade de sequência através do BLAST para a NDH-2 de *C. pseudotuberculosis*

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Acesso/uniprot
NADH dehydrogenase II	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	452	97%	99%	G0CR51
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	454	86%	93%	H2GR78
	<i>Corynebacterium vitaeurumini</i>	434	81%	91%	W5Y1E7
	<i>Corynebacterium callunae</i>	466	80%	88%	M1UYU8
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	471	79.0%	90%	Q8FTH6
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	467	78%	88%	S5YIP0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	402	31%	49%	Q5HHE4
	<i>Caldalkalibacillus thermanum</i>	399	28%	48%	F5L3B8
	<i>Escherichia coli</i>	434	26%	42%	P00393
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	400	27%	42%	P9WJJ1

Como se pode verificar na tabela acima, a enzima NDH do tipo 2 é amplamente distribuída entre o gênero *Corynebacterium*. Neste contexto, NDH-II de *C. pseudotuberculosis* apresentou 97%, 86% e 78% de identidade de sequência para as enzimas homólogas de *C. ulcerans*, *C. diphtheriae* e *C. glutamicum*, respectivamente, e 99%, 93% e 88% de similaridade levando em consideração as trocas positivas a partir de aminoácidos sinônimos, ou seja, aqueles aminoácidos que possuem as suas propriedades físico-químicas semelhantes. Já em relação à NDH-2 de *Caldalkalibacillus thermanum* a qual a estrutura de cristal foi recentemente determinada (Heikal et al., 2014), foram encontrados valores de apenas 28% e 48% de identidade e similaridade, respectivamente. Concomitantemente foram também observados baixos valores de identidade entre as sequências correspondentes de NDH-2 de *M. tuberculosis* e *E. coli* em relação a de *C. pseudotuberculosis*.

A busca por domínios conservados na sequência proteica de NDH-2 de *C. pseudotuberculosis* realizada através da ferramenta InterProScan 5 foi identificado que a mesma pertence a família “FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase”. Esta família pertence tanto a classe I e classe II de oxidoreductases. As flavoproteínas pertencentes a esta família apresentam similaridade entre suas sequencias, como por exemplo, entre a família glutathione-reductase e um grande número de flavoenzimas, como por exemplo, NADH desidrogenase e NADH peroxidase. Além disso, foram encontrados também os domínios “Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, FAD/NAD(P)-binding domain” e “Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, NAD-binding domain” que representam um domínio maior de ligação ao FAD e um pequeno domínio de ligação ao NADH dentro do domínio maior de ligação ao FAD. Tal classificação da família e dos encontrados na estrutura estão de acordo com as demais enzimas NAH-2 descritas na literatura, como por exemplo, a enzima homóloga pertencente a bactéria *C. thermarum* (Heikal et al., 2014)

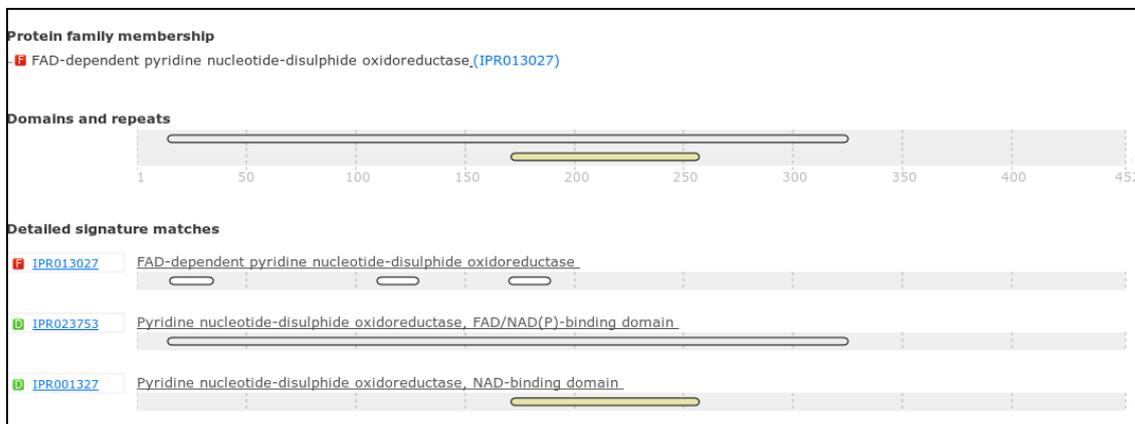


Figura 47: Representação gráfica da família e dos domínios identificados em NDH-2 por InterProScan5

Predição dos domínios transmembrânicos através do programa TMHMM2.0. foi detectado que NDH-2 de *C. pseudotuberculosis* um domínio transmembranico que corresponde aos resíduos de aminoácidos 388 a 406. Este resultado não está totalmente de acordo com a literatura, pois na realidade tais proteínas são monotópicas de membrana, ou seja, estão associadas à mesma somente através a de uma porção constituída por resíduos hidrofóbicos(Heikal et al., 2014), porém, tal região não chega a atravessar a bicamada lipídica da membrana, atravessando somente uma camada da mesma.. Portanto, tal resultado encontrado, muito provavelmente, representa esta porção da proteína NDH-2 a qual se encontra associada somente à camada da membrana voltada para o citoplasma, não representando, portanto, uma α -hélice transmembranar.

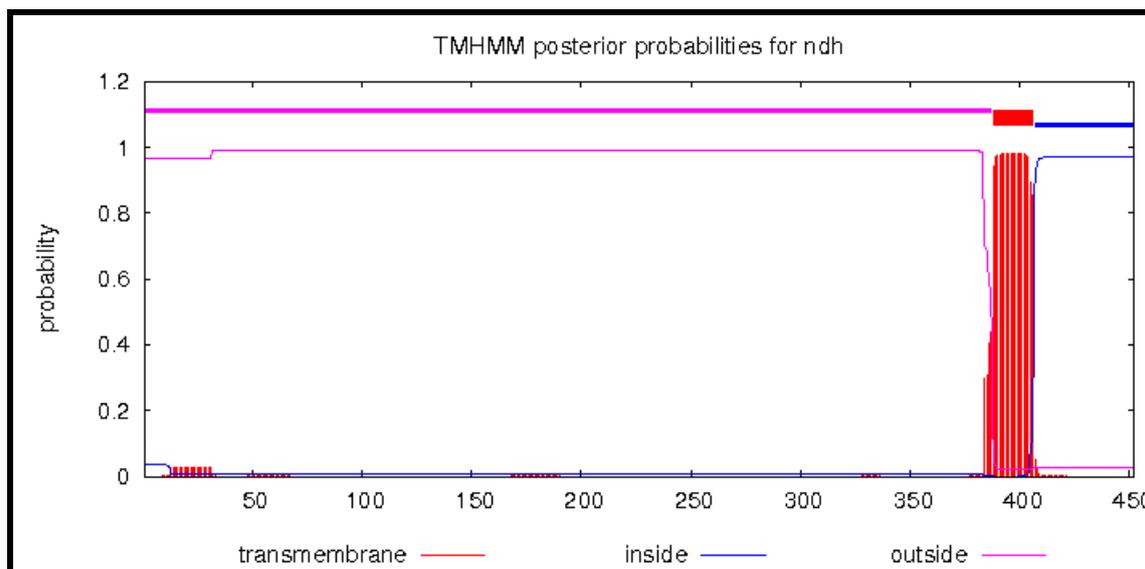


Figura: Predição dos domínios transmembrânicos através do programa TMHMM2.0. NDH-2 apresenta um domínio transmembranico que corresponde aos re´síduos de aminoácidos 388 a 406

Através de um alinhamento múltiplo entre as sequências proteicas das enzimas NAH-2 de *C. pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae*, *C. glutamicum*, *C. ulcerans* e *C. thermarum* revelou algumas semelhanças e diferenças entre as sequencias de tais organismo. A tabela

Quadro 2:

<i>C. thermarum</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	Conservação	Função
V81	V87	100%	Ligação da molécula de FAD às cadeias de aminoácidos no domínio de ligação ao FAD
Gly12	G21	100%	
N265	Ser282	Ser todos =	
Y13	Phe22	Phe todos =	
G14	G23	100%	
D299	D321	100%	
T45	Q_gln50	Gln todos =	

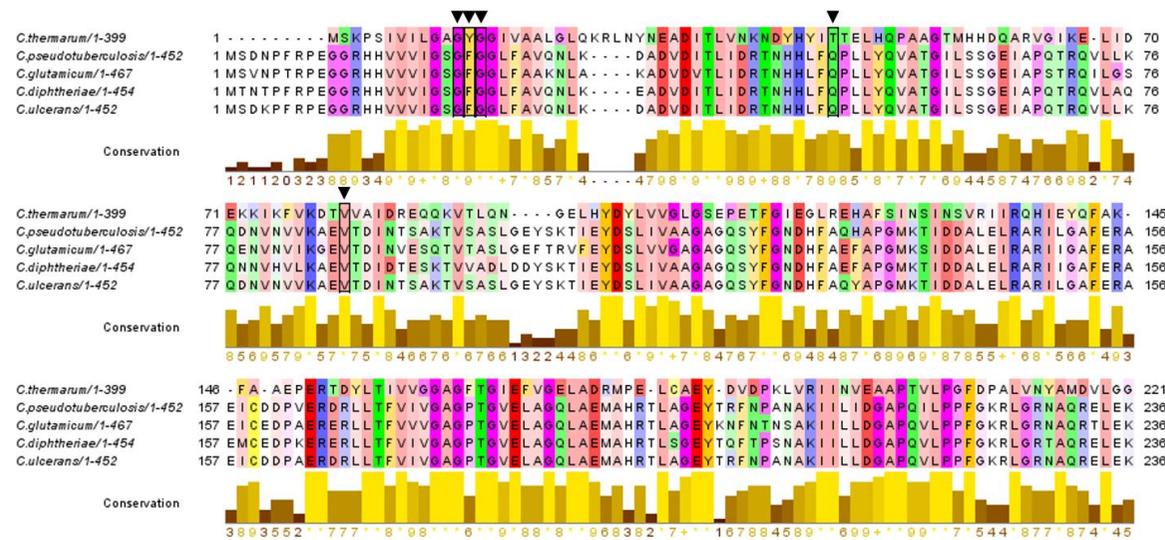


Figura 48: Alinhamento múltiplo correspondente à região N-terminal de NDH-2. Os resíduos de aminoácidos referentes à ligação à molécula de FAD estão representados com triângulos pretos.

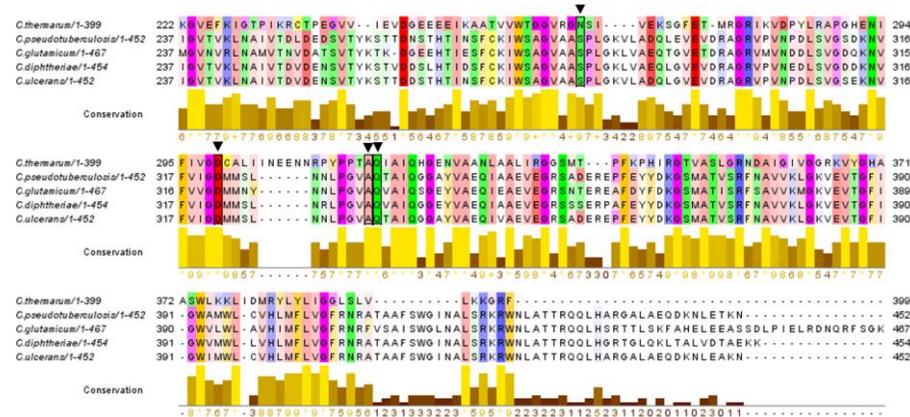


Figura 49 Alinhamento múltiplo correspondente a região C-terminal de NDH-2. Os resíduos de aminoácidos referentes à ligação à molécula de FAD estão representados com triângulo preto

Succinato desidrogenase (succinato: quinona redutase)

Succinato: quinona redutase (SQR) catalisa a oxidação do succinato para fumarato no ciclo do ácido cítrico e transfere os elétrons para as quinonas na membrana celular. Tal enzima apresenta similaridade de sequência com a enzima quinol: fumarato redutase (QFR) que catalisa a reação inversa de SQR em organismos anaeróbicos. SQR de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ainda não foi caracterizada, mas muitas propriedades podem ser deduzidas através da comparação das sequências de proteínas derivadas das das SQR de espécies que já estão bem caracterizadas, tais como SQR das bactérias Gram-positivas *Corynebacterium glutamicum* e *Bacillus subtilis*, e principalmente com as enzimas para as quais uma estrutura de cristal tem sido determinada, como por exemplo, QFR de *Wolinella succinogenes* (Lancaster et al., 1999), QFR de *E. coli* (Iverson et al. 1999), e SQR de *E. coli* (Yankovskaya, 2003). De acordo com as sequências genômicas, SQR de *C. pseudotuberculosis* é composta por três subunidades, SdhA (flavoproteína, 671 resíduos), SdhB (proteína ferro/enxofre, 249 resíduos) e SdhC (ancorada à membrana, 252 resíduos), e o genes correspondentes estão dispostos na ordem *sdhC_sdhA_sdhB*, assim como em *C. glutamicum*. As análises *in silico* referentes a cada subunidade que compõe a enzima, serão descritas nos tópicos a seguir.

Succinato desidrogenase subunidade flavoproteína (SdhA) :

O gene responsável por codificar a subunidade flavoproteína (SdhA) de SQR de *C. pseudotuberculosis* foi encontrado em 14 das 15 linhagens que apresentam seus genomas completamente sequenciados e depositados no NCBI, estando ausente somente na linhagem 1/06A. Além disso, o gene, os outros dois genes responsáveis pela codificação das outras duas subunidades que fazem parte do complexo enzimático SQR, ou seja, *sdhB* e *SdhC*, estão presentes no genoma de tal linhagem. Esses resultados aparentemente indicam um baixa qualidade no sequenciamento desta região em *C. pseudotuberculosis* linhagem 1/06A. Nas outras 14 linhagens de *C. pseudotuberculosis*, a subunidade catalítica SdhA de é composta por 671 resíduos de aminoácidos e apresentou elevada identidade de sequência quando comparada às subunidades homólogas entre as espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, tais como 97%, 92% e 83% de identidade com as SdhA de *C. ulcerans*, *C. diphtheriae* e *C. glutamicum*, respectivamente. Foi observado também que SdhA de *C. pseudotuberculosis* apresentou 34% de identidade de sequência com a SdhA de *B. subtilis* contra apenas 29% de identidade quando comparada a mesma proteína de *M. tuberculosis*.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Acesso/ Unipro
Succinato desidrogenase subunidade flavoproteína	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	671	97%	99%	I7GWU1
	<i>Corynebacterium vitaeruminis</i>	633	89%	95%	W5XXP9
	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	671	87%	93%	E0DC23
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	673	83%	90%	S5XZM3
	<i>Bacillus subtilis</i>	586	34%	53%	P08065
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	563	29%	44%	O53370
	<i>Escherichia coli</i>	588	27%	43%	P0AC41
Fumarato redutase subunidade flavoproteína	<i>Escherichia coli</i>	602	31%	47%	P00363
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	583	30%	45%	P9WN91
	<i>Mycobacterium bovis</i>	583	30%	45%	P64175
	<i>Wolinella succinogenes</i>	656	29%	44%	P17412

Através da ferramenta InterproScan5 foi observado que SdhA de *C. pseudotuberculosis* pertence a família "Succinate dehydrogenase/fumarate reductase flavoprotein subunit, low-GC Gram-positive bactéria". Esta família

representa a subunidade flavoproteína da succinato desidrogenase encontrada nas bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo C+G. A mesma família é encontrada em *C. glutamicum* como também em várias espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, como relatado anteriormente nos estudos referentes à purificação e caracterização de SQR de *C. glutamicum*. Nesse estudo, uma árvore filogenética criada a partir das sequências de SdhA de várias espécies, revelou que a enzima succinato: menaquinona redutase de *C. glutamicum* não pertence ao grupo de SQRs de espécies que possuem um elevado conteúdo GC, tais como *M. tuberculosis*, mas está mais próxima filogeneticamente à aquelas pertencentes as bactérias com baixo conteúdo CG, como por exemplo, *B. subtilis*. Os autores concluem que estes resultados podem ser devido à transferência horizontal dos genes responsáveis por codificar as subunidades desta enzima (Kurokawa and Sakamoto, 2005).

Foram encontrados também, através do InterProScan5, os domínios “FAD binding domain”, “succinate dehydrogenase/fumarate reductase flavoprotein, catalytic domain” e “Fumarate reductase/succinate dehydrogenase flavoprotein-like, C-terminal” (figura), como era esperado, de acordo com a literatura. A subunidade flavoproteína encontrada nas enzimas SQR e QFR contém um domínio N-terminal que se liga ao cofator FAD, um domínio catalítico central, e um domínio C-terminal, cujo papel é incerto. O local de ligação ao substrato está localizado entre os domínios de ligação ao FAD e domínio catalítico (Lancaster, 2013; Yankovskaya, 2003).

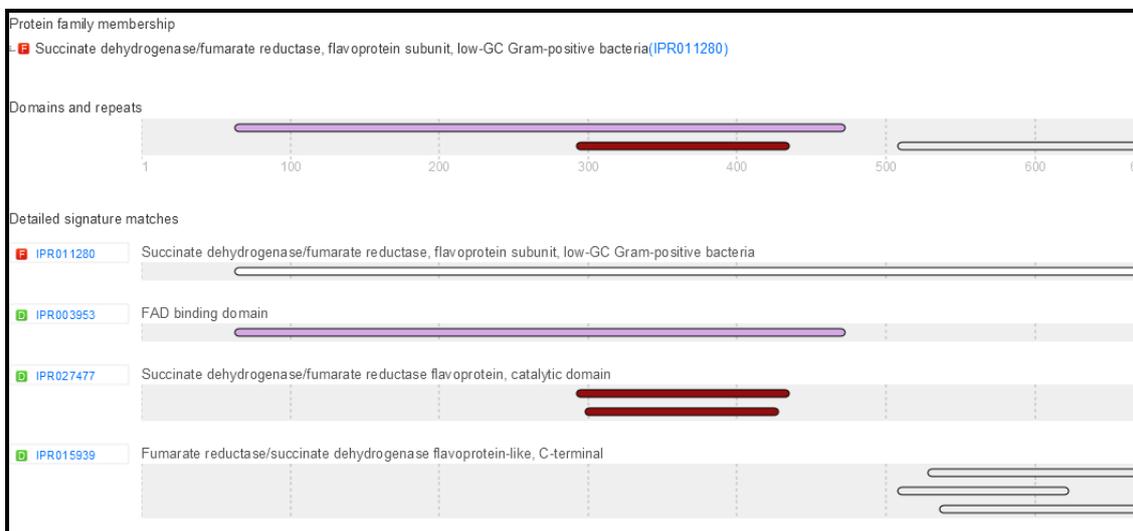


Figura 50: Representação esquemática de domínio conservado da proteína SdhA de *C. pseudotuberculosis*. Identifica-se o domínio de ligação ao FAD (roxo) e o domínio catalítico (vermelho) e o domínio C-terminal (branco). Análise realizada através do InterProScan5.

Com o propósito de identificar a conservação entre os resíduos envolvidos na ligação ao cofator FAD e na ligação ao substrato, foi realizado um alinhamento múltiplo entre as proteínas SdhA de *C. pseudotuberculosis*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* e *E. coli*, e as proteínas FrdA de *W. succinogenes* e *E. coli* (figura x e xx). Foi utilizado como referência para a identificação dos resíduos a sequência referente à proteína FrdA de *W. succinogenes* para a qual a estrutura de cristal está disponível. As informações detalhadas referentes ao alinhamento está descrito no quadro x, assim como também a posição de tais resíduos na sequência de SdhA de *C. pseudotuberculosis* e a conservação de tais resíduos entre as sequências analisadas.

Quadro: resíduos chaves na estrutura de SdhA e QRF utilizados nas análises referentes ao alinhamento múltiplo

<i>W. succinogenes</i> FrdA	<i>C. pseudotuberculosis</i> SdhA	Conservação	Função
His 43	His 99	100%	Ligação covalente ao FAD
Arg 301	Arg 361	100%	Ligação ao substrato
Arg 404	Arg 466	100%	
His 369	His 432	100%	

Através do alinhamento foi identificado que a ligação covalente ao grupo prostético FAD ocorre através do resíduo Histidina na posição 99 de SdhA de *C. pseudotuberculosis* e tal resíduo encontra-se 100% conservado em todas as demais

sequências. Concomitantemente, os outros três resíduos responsáveis pela ligação ao substrato também se encontram 100% conservados em todas as sequências.

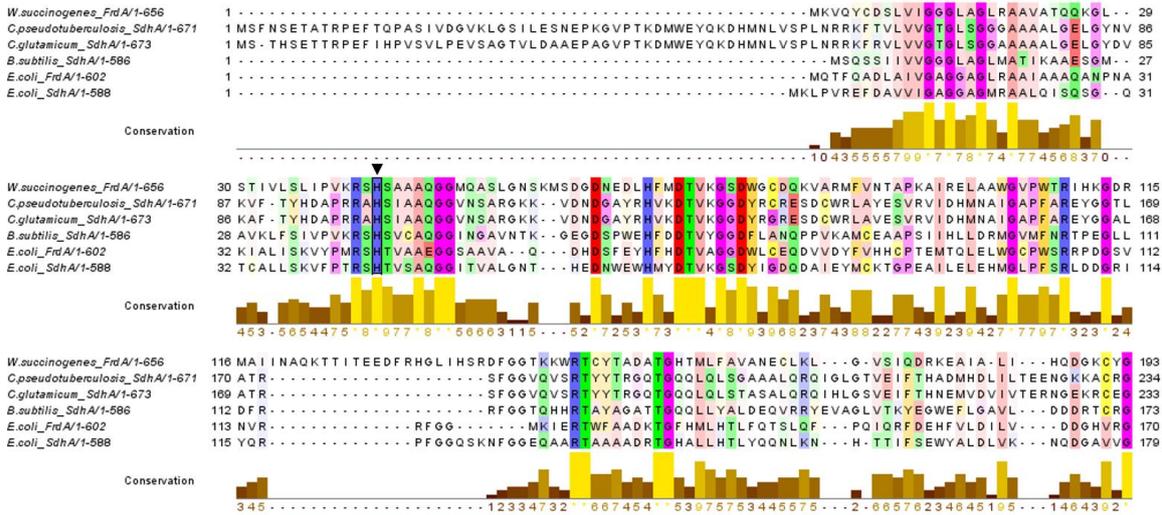


Figura 51: Região N-terminal de do alinhamento. O resíduo de histidina responsável pela ligação covalente ao FAD é marcado com um triângulo invertido preto

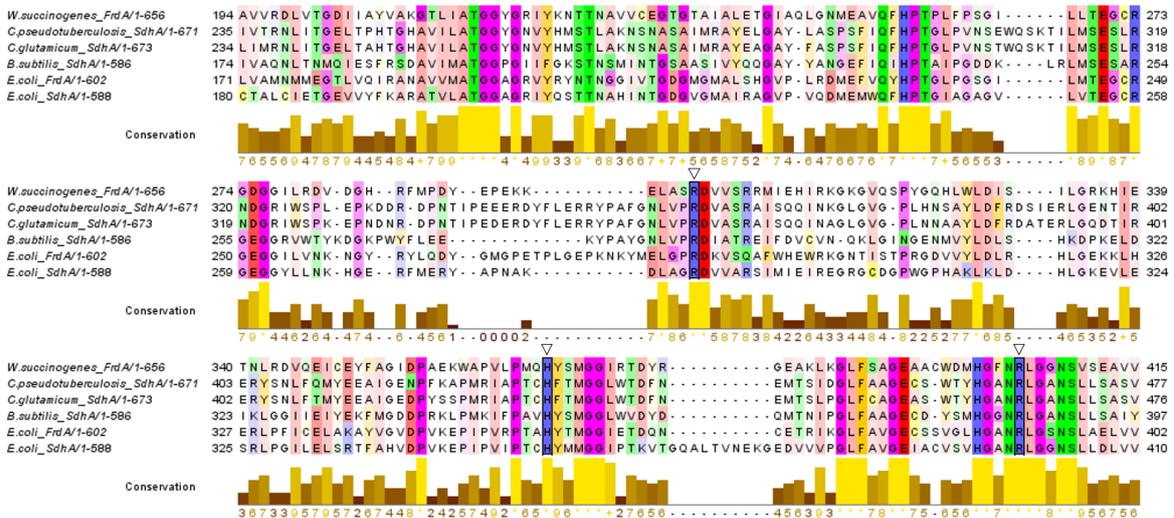


Figura 52: Região central do alinhamento. Os três resíduos de ligação ao substrato são mostrados com triângulos invertidos braço.

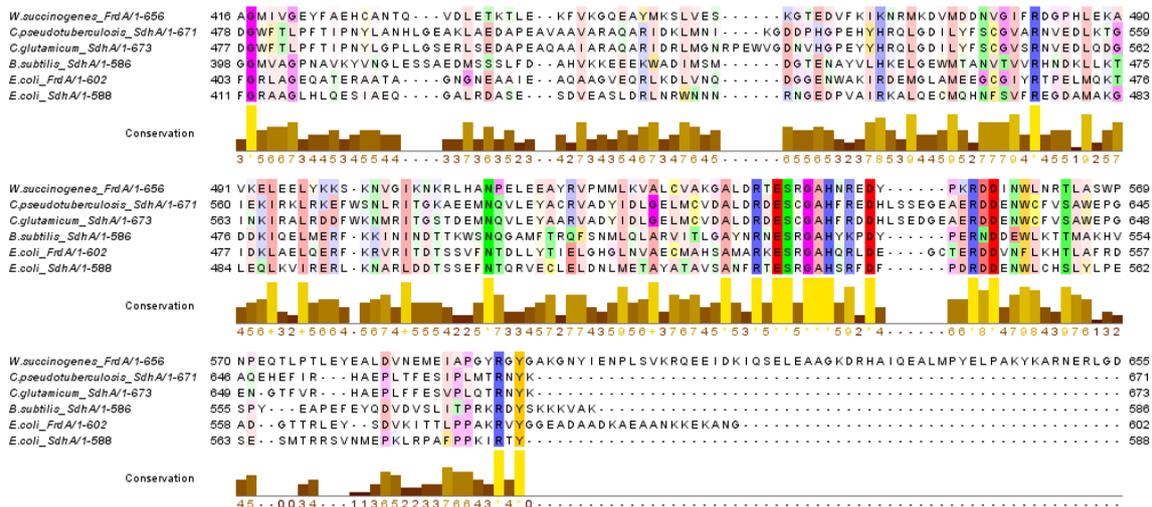


Figura 8: Região C-terminal de do alinhamento.

Succinato desidrogenase subunidade ferro-enxofre (SdhB)

A subunidade ferro-enxofre da succinato desidrogenase de *C. pseudotuberculosis* apresentou altos valores de identidade entre as seqüências proteicas correspondentes à mesma subunidade nas espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, como por exemplo, 92% e 82% de identidade e 97% e 91% de similaridade com as proteínas SdhB de *C. diphtheriae*, *C. glutamicum*, respectivamente. Já em relação à SdhA *C. ulcerans* foi observada identidade de 99% e 100% de similaridade, demonstrando a alta conservação da enzima em comparação com esse microrganismo. Por outro lado, em *M. tuberculosis* foram encontrados apenas 24% e 30% de identidade para SdhB e FrdB deste patógeno, respectivamente.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Acesso/ Unipro
Succinato desidrogenase subunidade ferro-enxofre	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	249	99%	100%	I7H7E0
	<i>Corynebacterium matruchoitii</i>	249	86%	95%	C0DZV2
	<i>Corynebacterium vitaeruminis</i>	249	86%	96%	H2GT13
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	249	82%	91%	Q6M7Z0
	<i>Escherichia coli</i>	238	29%	40%	P07014
	<i>Bacillus subtilis</i>	253	28%	50%	P08066
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	263	24%	39%	O53371
Furamato redutase subunidade ferro-enxofre	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	247	30%	43%	P9WN89
	<i>Escherichia coli</i>	244	29%	45%	P0AC47
	<i>Wolinella succinogenes</i>	239	29%	46%	P17596

A busca por domínios conservados em SdhB de *C. pseudotuberculosis* revelou a presença de três principais domínios: "succinato desidrogenase/furamato redutase N-terminal" (aminoácidos 5-120); "ferrodoxina alfa-helicoidal" (aminoácidos 121-140) e "domínio de ligação a [4Fe-4S]" (aminoácidos 158-227). Além disso, foram encontrados

também um “sítio de ligação ao aglomerado ferro-enxofre [2Fe-2S]” entre os aminoácidos 58 a 66; e o sítio conservado de ligação ao aglomerado ferro-enxofre [4Fe-2S]” entre os aminoácidos 159 a 170.

O domínio “succinato desidrogenase/fumarato redutase N-terminal” representa o domínio de ligação ao aglomerado ferro-enxofre [2Fe-2S] e é estruturalmente classificado como um “beta-grasp”, a qual é caracterizado como tendo uma folha-beta composta por quatro cadeias beta e uma alfa-hélice que flanqueia a folha. Os dois átomos de ferro do aglomerado [2Fe-2S] estão coordenados tetraedricamente por dois átomos de enxofres inorgânicos e por quatro resíduos de cisteínas.

O domínio “ferredoxina alfa-helicoidal” contém dois aglomerados [4Fe-4S] típicos de ferredoxinas bacterianas. Este domínio está presente em várias proteínas envolvidas em reações redox, incluindo a região C-terminal das proteínas respiratórias succinato desidrogenase (SQR) e fumarato redutase (QFR) em bactérias.

A estrutura das proteínas pertencentes a esta família consiste na duplicação de um domínio de vinte seis resíduos de aminoácidos. Cada um destes domínios contém quatro resíduos de cisteína que se ligam a um centro [4Fe-4S]. Nos aglomerados ferro-enxofre do tipo [4Fe-4S] os quatro átomos de ferro e os quatro íons sulfuretos estão localizados nos vértices de uma estrutura semelhante a um cubo. Cada 4Fe-4S está ligado à cadeia polipeptídica por quatro ligações covalentes Fe-S envolvendo os resíduos de cisteína. Em alguns ferredoxinas bacterianas, um dos dois domínios duplicados não possui uma ou mais das quatro cisteínas conservadas, sendo que nestes casos, ou tais domínios perderam suas propriedades de ligação ao ferro-enxofre ou ocorre a ligação a um aglomerado [3Fe-3S] no lugar do [4Fe-4S].

Nas ferredoxinas 2Fe-2S, quatro resíduos de cisteínas ligam o aglomerado de ferro-enxofre à proteína. Três destas cisteínas estão agrupadas em conjunto na mesma região da proteína. Esta sequência compreende os três resíduos de cisteínas envolvidas na ligação de ferro-enxofre.

Um alinhamento múltiplo evidenciou que SdhB de *C. pseudotuberculosis* possui todos os 11 resíduos de cisteína necessários para formar o aglomerado [2Fe-4S] (Cys58, Cys63, Cys66, Cys84), o aglomerado [4Fe-4S] (Cys 159, Cys 162, Cys 165, Cys 223) e o aglomerado [3Fe-4S] (Cys 169, Cys 213, Cys 219).

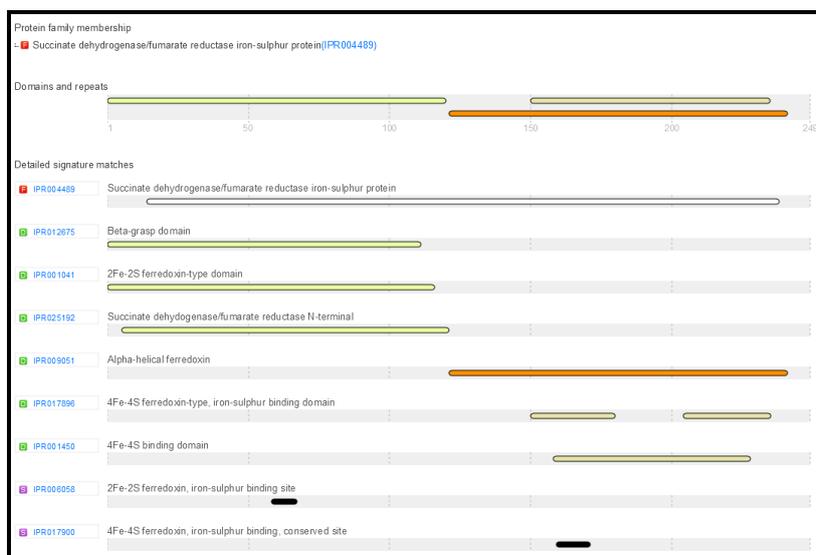


Figura 53: Representação esquemática de domínio conservado da proteína SdhB de *C. pseudotuberculosis*. Identifica-se o domínio “succinato desidrogenase/fumarato redutase N-terminal” (amarelo claro), o “domínio de ligação 4fe-4S” (amarelo escuro), o domínio “alfa-helicoidal” (laranja), como também o sítio de ligação ao aglomerado ferro-enxofre [2Fe-2S]. Análise realizada através do InPreScan5.

Quadro: resíduos chave na estrutura de SdhB de *E.coli* e *C. pseudotuberculosis* utilizados nas análises referentes ao alinhamento múltiplo

Resíduos		Conservação	Função
<i>W. succinogenes</i> FrdB	<i>C. pseudotuberculosis</i> SdhB		
Cys 57	Cys 58	100%	Ligação ao 2Fe-2S
Cys 62	Cys 63		
Cys 65	Cys 66		
Cys 77	Cys 84		
Cys 151	Cys 159	100%	Ligação ao 4Fe-2S
Cys 154	Cys 162		
Cys 157	Cys 165		
Cys 218	Cys 223		
Cys 161	Cys 169	100%	Ligação ao 3Fe-4S
Cys 208	Cys 213		
Cys 214	Cys 219		

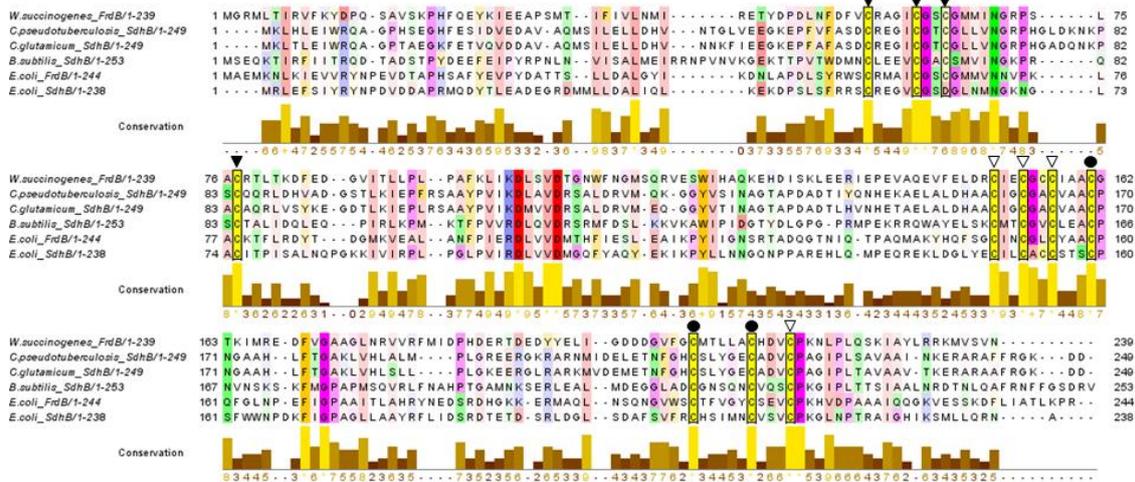


Figura 8: Alinhamento múltiplo entre as subunidades SdhB de *E. coli*, *C. pseudotuberculosis*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* e FrdB de *E. coli* e *W. succinogenes*. Os resíduos de ligação ao aglomerado 2Fe-2S, 4Fe-2S e 3Fe-4S são mostrados com um triângulo invertido preto, um triângulo invertido branco e um círculo preto, respectivamente.

SdhC: 252 aa (14 das 15 linhas, Menos 1/06-A)

As subunidades de ancoragem à membrana de SQR/QFR são classificadas em cinco tipos (A-E) com base nas diferenças na composição das subunidades e no número de hemes ligado. As subunidades ancoradas à membrana dos tipos A, C e D são compostas de dois polipeptídeos enquanto as do tipo B correspondem a apenas um único polipeptídeo. Em relação ao conteúdo de heme presentes, as do tipo C possuem apenas um, as do tipo A e B possuem dois, enquanto que as do tipo D não possuem nenhum. Já as SQR/QFR do tipo E apresentam dois polipeptídeos hidrofóbicos que são muito diferentes dos tipos A-D (Hägerhäll, 1997; Lancaster, 2002, 2013). Até a presente data, o único representante do grupo B que possui uma estrutura de cristal determinada é a QFR de *W. succinogenes* (Lancaster, 2002, 2013; Lancaster and Kröger, 2000).

Entre as bactérias Gram-positivas, SQR de *B. subtilis* e *C. glutamicum* tem sido amplamente estudadas. As enzimas destes organismos são parecidas a QFR de *W. succinogenes*, as quais possuem um polipeptídeo di-heme ancorado à membrana, pertencendo assim ao tipo B de SQOs (Hägerhäll, 1997; Kurokawa and Sakamoto, 2005; Lancaster, 2002, 2013; Schnorpfel et al., 2001).

A subunidade ancorada à membrana (SdhC) da SQR de *C. pseudotuberculosis* apresentou 98%, 78% e 68% de identidade de sequência com as SdhC homólogas de *C. ulcerans*, *C. matruchotii*, *C. glutamicum* respectivamente. Por outro lado, tal subunidade apresentou somente 23% e 21% de identidade entre as sequências de SdhC de *B. subtilis* e FrdC de *W. succinogenes*, respectivamente. Este baixo valor de identidade é uma característica comum entre as subunidades ancoradas à membrana de SQOs (Hägerhäll, 1997; Lancaster, 2002, 2013). Apesar deste baixo valor de identidade encontrado, algumas importantes propriedades a respeito da SdhC de *C. pseudotuberculosis* podem evidenciadas através das análises de sua sequência proteica.

Resultados do BLAST

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso
Succinate dehydrogenase cytochrome b558 subunit	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	252	98%	99%	sdhC	I7H2J0
	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	252	78%	88%	sdhC	E0DC22
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	257	68%	82%	sdhC	A4QB10
	<i>Bacillus subtilis</i>	202	23%	38%	sdhC	P08064
	<i>Wolinella succinogenes</i>	256	21%	36%	frdC	P17413

Através da ferramenta InterproScan5, foi encontrado que SdhC de *C. pseudotuberculosis* pertence à família "Succinato desidrogenase subunidade citocromo b558" (Figura 54) na qual também estão presentes as subunidades C de succinato desidrogenase de *B. subtilis* e *C. glutamicum*.

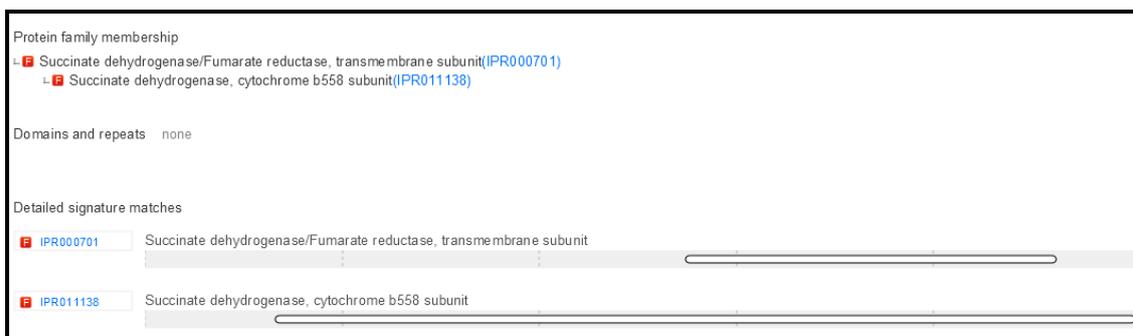


Figura 54: Representação gráfica da família succinato desidrogenase, subunidade citocromo b558 da SdhC de *C. pseudotuberculosis* através do InterprotScan5.

Através do programa TMHMM2.0. foi previsto que SdhC de *C. pseudotuberculosis* apresenta cinco hélices transmembrânicas (figura x), o que está de acordo com a literatura a partir da estrutura de cristal da QFR de *Wolinella succinogenes*, no qual foi proposto que a subunidade C da mesma contém cinco segmentos que atravessam a membrana com uma estrutura secundária preferencialmente helicoidal (Lancaster and Kröger, 2000)

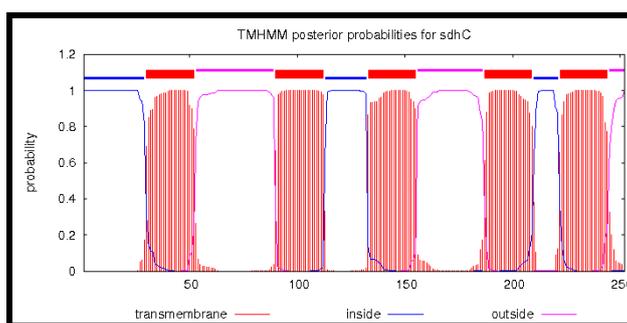


Figura 55: Predição de hélices transmembrânicas presentes em SdhC de *C. pseudotuberculosis* através do programa TMHMM2.0. é composta por cinco hélices transmembrânicas que compreendem os resíduos 30-52, 90-112, 133-155, 187-209 e 222-244, respectivamente

Um alinhamento múltiplo entre as proteínas SdhC de *C. pseudotuberculosis*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* e FrdC de *W. succinogenes*, (figura) revelou que SdhC de *C. pseudotuberculosis* possui conservados todos os quatro resíduos de histidina que servem como ligandos axiais de um grupo heme de alto potencial (heme b_p) e um grupo heme baixo potencial (heme b_D).

Baseado na predição de que SQR de *C. pseudotuberculosis* possui uma subunidade hidrofóbica com dois grupos heme, ela pertence às enzimas do tipo B da família SQO, assim como SQR de *C. glutamicum* e *B. subtilis* e QFR de *W. succinogenes*.

Quadro: Resíduos de ligação ao heme 1 e heme 2 utilizados nas análises do alinhamento múltiplo entre as subunidades de membrana C da QFR a partir da bactéria. Os resíduos correspondentes a *C. pseudotuberculosis* são listados

<i>W. succinogenes</i> QfrC	<i>C. pseudotuberculosis</i> SdhC	Conservação	Função
His93	His 86	100%	Ligação ao heme b_p
His182	His 201		
His44	His 50	100%	Ligação ao heme b_D
His143	His 153		

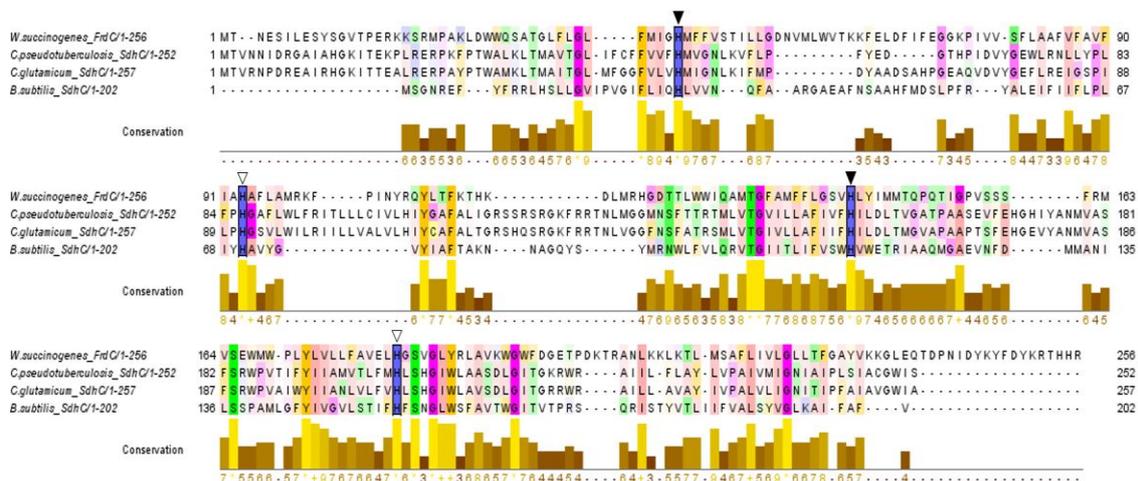


Figura 56: Alinhamento múltiplo entre as subunidades de membrana FrdC de *W. succinogenes* e SdhC de *C. pseudotuberculosis*, *C. glutamicum* e *B. subtilis*. Os resíduos de histidina conservados responsáveis pela ligação ao heme 1 e ao heme 2 são mostrados com triângulos invertidos brancos e pretos, respectivamente.

Malato: quinona oxidoreductase

Malato: quinona oxidoreductase (MQO) participa do ciclo do ácido cítrico, a qual oxida malato para oxalacetato e doa elétrons para as quinonas. O gene responsável por coficar tal enzima foi encontrado em todas as 15 linhagens de *C. pseudotuberculosis* e a sequência de aminoácidos correspondente à mesma, é composta por 499 resíduos de aminoácidos em todas as linhagens desta bactéria. Através da busca por similaridade realizada por meio da ferramenta BLAST a partir do banco de dado UniProtKB/Swiss-Prot (figura) foi observado que tal enzima se encontra amplamente distribuída na classe das actinobactérias.

MQO de *C. pseudotuberculosis* apresentou elevados valores de identidade de sequência com as enzimas homólogas de espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, tais como 95%, 88%, 76%, 72% e 70% de identidade para MQO de *C. ulcerans*, *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. jeikeium* e *C. glutamicum*, respectivamente. Um considerável valor de identidade também foi observado entre as enzimas homólogas de organismos pertencentes aos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium*, podendo-se citar como exemplo, as espécies *Nocardia brasiliensis*, *Rhodococcus erythropolis* e *Mycobacterium smegmatis*, para os quais os valores de identidade encontrados foram de 59%, 58% e 56%, respectivamente.

Quadro: Resultados obtidos através do alinhamento pelo BLAST a partir da sequência de MQO de *C. pseudotuberculosis*.

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/
Malato: quinona oxidoreductase	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	499	95%	98%	mqo	G0CUP6
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	499	88%	95%	mqo	Q6NGL9
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	642	76%	88%	mqo	Q8FP91
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	490	72%	83%	mqo	Q4JV42
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	500	70%	85%	mqo	A4QF08
	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	500	69%	84%	mqo	C3PH30
	<i>Nocardia brasiliensis</i>	490	59%	74		A0A034U7R7
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	512	58%	75%	mqo	C0ZY77
	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	518	56%	72%	mqo	A1T7G4
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	510	56%	73%	mqo	A0QVL2

Através da análise da sequência por meio da ferramenta InterproScan5, foi comprovada que tal enzima de *C. pseudotuberculosis* pertence à família “Malato: quinona oxidoreductase” (figura), estando assim de acordo com a literatura e com os resultados encontrados através das análises realizadas por meio da ferramenta BLAST.

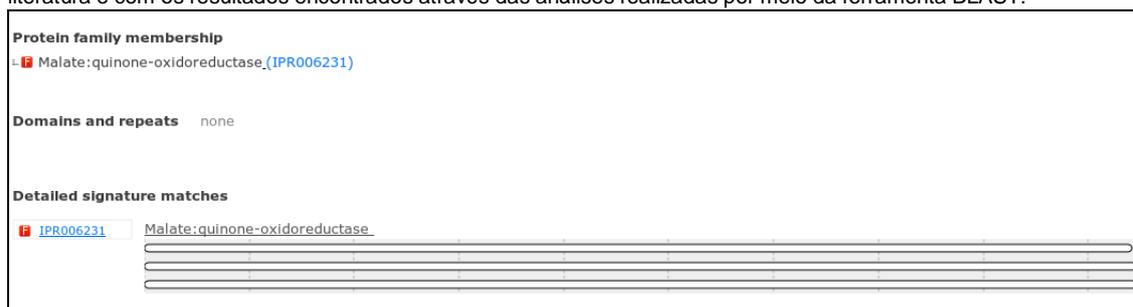


Figura 57: Representação gráfica da classificação da família de MQO de *C. pseudotuberculosis* por InterproScan5.

É interessante observar que a presença desta enzima parece ser uma característica comum ao grupo CMNR, no qual a mesma pode exercer um papel fundamental na oxidação de malato para oxalacetato no ciclo do ácido cítrico nessas bactérias. Nesse contexto, a atividade MQO foi estudada em *C. glutamicum* e tal enzima mostrou ser essencial para tal propósito, na qual mutantes que não possuíam tal enzima foram incapazes de crescer em meio mínimo, enquanto que em linhagens mutantes para a enzima malato desidrogenase dependente de NAD⁺, não foram observadas nenhuma mudança fenotípica no que diz respeito à capacidade de crescimento das mesmas (Bott and Niebisch, 2003; Molenaar et al., 1998, 2000).

Sendo assim, seria interessante a realização de estudos mais detalhados a respeito da atividade e da função que essa enzima exerce em *C. pseudotuberculosis*, como por exemplo, a observação de quais seriam os efeitos correspondentes a uma mutação em tal enzima no crescimento e sobrevivência da bactéria *in vitro*, como também a capacidade de tais linhagens mutantes em sobreviver e persistir em camundongos infectados.

Piruvato: quinona oxidoreductase 578 aa

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/ Unipro
Pyruvate:quinone oxidoreductase	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	578	93%	98%	poxB	G0CXT8
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	578	82%	92%		H2GX49
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	579	75%	87%		Q8NMG5
	<i>Escherichia coli</i>	572	46%	65%		P07003

Além do complexo piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1, EC 1.8.1.4, EC 2.3.1.12), que utiliza NAD⁺ como receptor de elétrons da redução dos equivalentes gerados pela descarboxilação oxidativa de piruvato a acetil-CoA, *C. pseudotuberculosis*, assim como *C. glutamicum*, também possui uma piruvato: quinona oxidoreductase (EC 1.2.2.2). Esta enzima catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato em acetato e CO₂ usando uma quinona como receptor de elétrons (BOTT; NIEBISCH, 2003). Sua existência em *C. pseudotuberculosis* foi indicada pela identificação do gene *poxB* a partir do genoma de *C. glutamicum* e uma vez obtida a sequência de aminoácidos da proteína homóloga codificada por tal gene, foi realizado um BLAST contra o genoma de *C. pseudotuberculosis*.

InterproScan5:

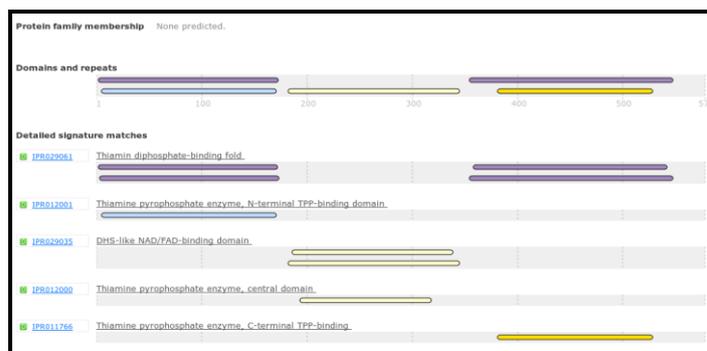


Figura 58: InterProScan5:

L-Lactato desidrogenase

Em *C. pseudotuberculosis*, não foi encontrado em nenhuma das 15 linhagens que atualmente apresentam seus genomas completamente sequenciados, um gene *lldD* ortólogo para a enzima L-lactato desidrogenase quinol dependente encontrada em *C. glutamicum* e *E. coli*. Por outro lado, foi encontrado um operon ortólogo *lutABC* para *B. subtilis*, assim como também uma L-lactato permease (LutP) a montante do operon *lutABC* (figura) sendo essa organização do operon *LutABC* e a presença de tal transportador Lut-P a montante do mesmo uma característica marcante e altamente conservada entre os genomas dos organismos que apresentam tal operon.

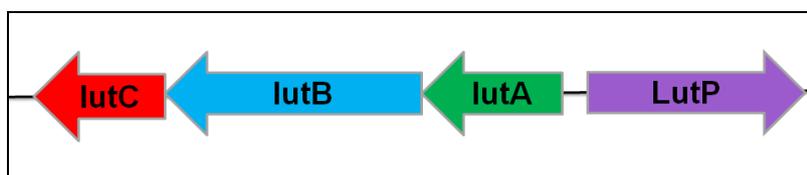


Figura 59: Organização do operon *lutABC* envolvido na utilização de L-lactato e do gene *lutP* para L-lactato permease nos genomas das 15 linhagens de *C. pseudotuberculosis*.

Um novo domínio de função desconhecida, "DUF162" (Pfam: PF02589) é um domínio constituinte de duas proteínas (LutB e LutC) codificadas pelo operon LutABC conservado em bactérias, o qual tem sido associado à utilização de lactato e está envolvido na conversão oxidativa de L-lactato a piruvato. Com base em análise de sua sequência, estrutura e evidência experimental recente relatada por vários estudos, o domínio DUF162 foi redefinido como domínio LUD. Neste contexto, foi relatada a primeira estrutura de cristal [PDB: 2G40] da família domínio LUD: a proteína LutC de *Deinococcus radiodurans* e foi proposto um modelo para a ligação ao substrato e ao cofator. Na grande maioria dos casos, o domínio LUD é o único domínio constituinte de proteínas LutC, enquanto em proteínas LutB que é frequentemente associada com famílias de proteínas Fer4_8, CCG, ou DUF3390. Ambos Fer4_8 e CCG domínios são centros ferro-enxofre provável domínios de ligação (Hwang et al., 2013).

A composição de domínios encontrados nas proteínas LutA, LutB e LutC são mostrados na Figura 60.

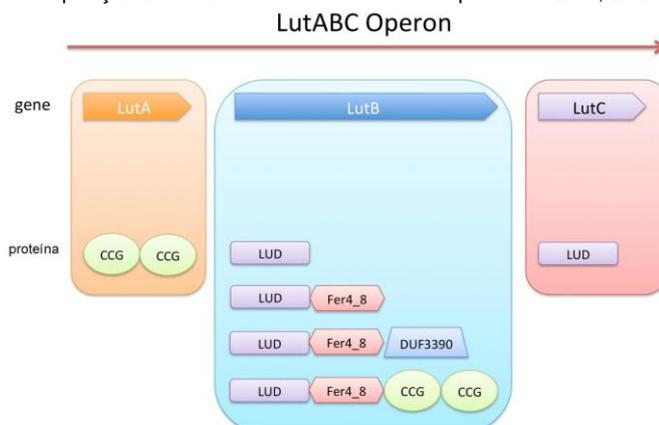


Figura 60: Composição dos domínios encontrados nas proteínas LutA, LutB e LutC.

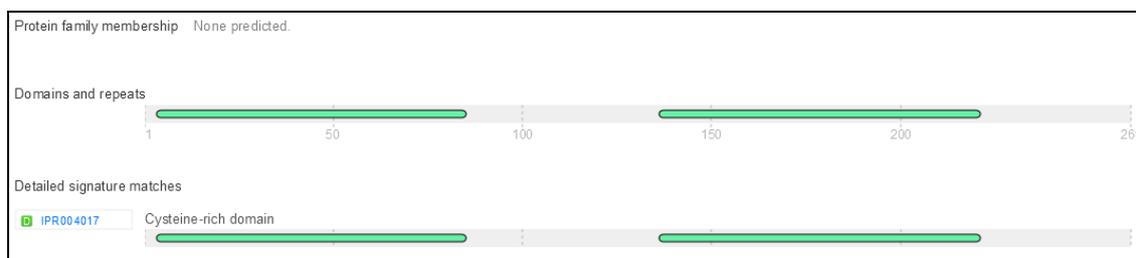
LutA:

De acordo com a sequência genômica, a proteína LutA de *C. pseudotuberculosis* é composta por 261 aminoácidos em todas as 15 linhagens e os resultados da busca por sequências similares através do BLAST são apresentados no quadro x. Neste contexto, foram encontrados elevados valores de identidade de sequência para proteínas ortólogas de espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, tais como, tais como 98%, 92%, 86% e 82% de identidade com *C. ulcerans*, *C. diphtheriae*, *C. vitæruminis* e *C. matruchotii*, respectivamente. Um percentual de identidade relativamente alto também foi encontrado para as proteínas LutA dos organismos *D. radiodurans* e *B. subtilis*, consistindo em 52% e 45%, respectivamente.

Quadro 25:

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Acesso
Lactate utilization protein A	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	261	98%	99%	I7GX71
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	261	92%	95%	H2GGE0
	<i>Corynebacterium vitæruminis</i>	261	86%	93%	W5Y7Q6
	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	261	82%	92%	E0D194
	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	244	47%	65%	Q8ET92
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	247	52%	67%	Q9RT58
	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	239	48%	62%	Q5L300
	<i>Bacillus pumilus</i>	238	45%	60%	A8FDN4
	<i>Bacillus subtilis</i>	238	45%	60%	O07020
	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	245	43%	59%	B9E9G8
Uncharacterized protein YkgE	<i>Escherichia coli</i>	239	42%	60%	P77252

Através da análise da sequência de aminoácidos por meio da ferramenta InterProScan5, foi constatado que tal proteína possui duas cópias de um domínio rico em cisteína (CCG) (aminoácidos 3 a 84; e 136 a 220), o que está de acordo com a literatura.

**Figura 61**

Este domínio é caracterizado pela presença de até cinco cisteínas com a sequência motivo "CX_nCCGX_mCX₂C", onde duas cisteínas em tandem são seguidas por uma glicina, o que levou à designação do domínio CCG. Em proteínas que apresentam este domínio CCG, pode haver uma ou duas cópias do mesmo, e o motivo é, provavelmente, um sítio de ligação ao ferro-enxofre. Em alguns casos, uma das cisteínas é substituída por

um aspartato, o qual também pode, em princípio, funcionar como um ligando de um cluster de ferro-enxofre (Grein et al., 2013; Hamann et al., 2007; Mander et al., 2002).

A família de proteínas CCG pode ser dividida em três grupos principais: I- proteínas que não possuem hélices transmembranares e apresentam um ou dois domínios CCG. Muitas proteínas deste grupo são associadas à membrana, embora não possuem hélices transmembranares, o que sugere uma ancoragem monotópica à membrana; II- proteínas ligadas à membrana nas quais são previstas de 4 a 6 hélices transmembranares; e III- proteínas que contêm um local de ligação ao FAD. As proteínas nos grupos II e III são grandes proteínas com um caráter altamente modular uma vez que incluem vários domínios distintos (Grein et al., 2013; Hamann et al., 2007).

Proteínas pertencentes ao grupo I incluem: a subunidade B da heterodissulfeto redutase (HdrB), a qual possui dois domínios CCG em que o domínio da região C-terminal liga um aglomerado ferro-enxofre [4Fe-4S] enquanto que o da região N-terminal fornece um sítio de ligação para o zinco; a subunidade ferro-enxofre da enzima glicolato oxidase (GlcF); a subunidade C da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase anaeróbica (GlpC); e a proteína LutA de utilização a L-lactato (Grein et al., 2013; Hamann et al., 2007; Hwang et al., 2013; Mander et al., 2002).

LutB:

A proteína LutB é composta por 505 aminoácidos e assim como a LutA, tal proteína apresentou elevados valores de identidade de sequência quando comparada às proteínas ortólogas de espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, principalmente em relação a *C. ulcerans*, mostrando ser altamente conservada em termos de sequência e, consequentemente, em relação a sua estrutura. Os resultados obtidos através do BLAST estão resumidos no quadro x. Como é possível observar, LutB de *C. pseudotuberculosis* apresentou 98%, 94%, 86% e 79% de identidade com as proteínas ortólogas de *C. ulcerans*, *C. diphtheriae*, *C. vitruerminis* e *C. matruchotii*, respectivamente. Além disso, foram encontradas proteínas ortólogas nas actinobactérias *Rhodococcus pyridinivorans* e *Rhodococcus equi*, as quais mostram ser, respectivamente, 66% e 64% identidas em suas sequências quando comparadas a de *C. pseudotuberculosis*. Já em relação a *B. subtilis*, foi encontrado o valor de 41% de identidade.

Quadro 26

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Acesso/UniProt
Lactate utilization protein B	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	505	98%	99%	I7H2X0
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	514	94%	98%	H2I8G6
	<i>Corynebacterium vitruerminis</i>	509	86%	93%	W5Y019
	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	520	79%	86%	C0E783
	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	500	66%	76%	H0JR12
	<i>Rhodococcus equi</i>	504	64%	76%	E9SXS3
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	510	54%	67%	
	<i>Bacillus subtilis</i>	479	41%	59%	O07021
	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	477	42%	60%	B9E9G9
	<i>Bacillus licheniformis</i>	477	41%	59%	Q65EM0
	<i>Bacillus cereus</i>	473	41%	58%	A7GMJ3
<i>Bacillus thuringiensis</i>	473	40%	61%	AORBC8	

Na análise da sequência de LutB de *C. pseudotuberculosis* realizada pela ferramenta InterProScan5, foi encontrado que a mesma pertence à família “proteína de ligação ao 4Fe-4S”. Além disso, foi encontrado um domínio de função desconhecida (DUF162) (aminoácidos 72 a 301), como também um domínio “ferrodoxina do tipo 4Fe-4S, domínio de ligação ao ferro-enxofre (Fer4_8)” (aminoácidos 317 a 388). Foi identificada também uma sequência conservada característica do sítio de ligação ao ferro-enxofre de “ferrodoxinas do tipo 4Fe-4S” entre os aminoácidos 320 a 331. (Figura x).

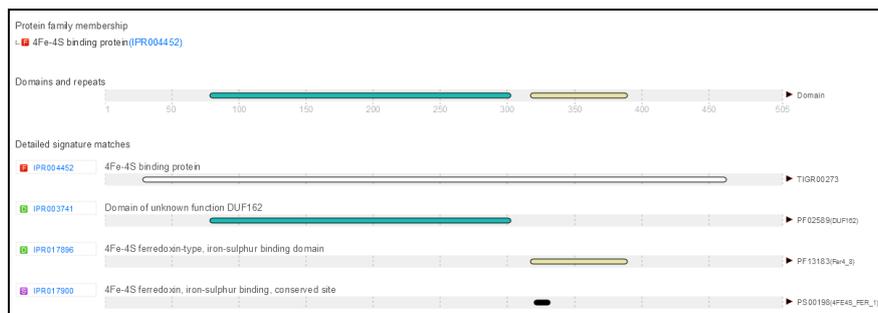


Figura 62: Representação esquemática dos domínios conservados da proteína LutB de *C. pseudotuberculosis* por InterProScan5. Identifica-se o domínio de função desconhecida DUF162 (azul) e o domínio ferrodoxina do tipo 4Fe-4S (amarelo). Análise realizada através do InterProScan5.

Tais resultados encontrados estão de acordo com a literatura, na qual é relatada que o domínio de função desconhecida classificado com DUF162 é encontrado em ambas as proteínas de utilização de lactato LutB e LutC codificadas pelo operon *lutABC*. Por conseguinte, tal domínio "DUF162" foi recentemente redefinido como domínio "LUD". Além disso, na proteína LutB este domínio "LUD" está frequentemente associado com as famílias de proteínas Fer4_8 (ferredoxina do tipo 4Fe-4S, domínio de ligação ao ferro-enxofre), CCG (domínio rico em cisteína) ou domínio de função desconhecida "DUF3390". Sendo assim, tal proteína LutB é classificada com uma provável proteína ferro-enxofre a qual provavelmente funciona como uma transportadora de elétrons durante a oxidação de L-lactato (Chai et al., 2009; Hwang et al., 2013)

LutC:

A proteína LutC é composta por 209 aminoácidos em todas as 15 linhagens de *C. pseudotuberculosis* e os resultados da busca por similaridade realizadas pelo BLAST estão listados no quadro x. Observa-se alta porcentagem de identidade (96%) com a proteína ortóloga de *C. ulcerans*, chegando a ser 99% similar à mesma, evidenciando assim, uma estrutura tridimensional altamente conservada entre tais proteínas. Além disso, foi observada identidade com as proteínas ortólogas de outras bactérias do gênero, tais como 85%, 76%, 69% e 55% com *C. diphtheriae*, *C. vitaeruminis*, *C. matruchotii* e *C. casei*, respectivamente. As proteínas LutC de *R. pyridinivorans* e *R. equi* apresentaram, respectivamente, 52% e 50% de identidade de sequência com a de *C. pseudotuberculosis*.

Já em relação à LutC de *D. radiodurans* para a qual uma estrutura de cristal foi recentemente determinada, a proteína ortóloga de *C. pseudotuberculosis* mostrou ser 40% idêntica no que diz respeito a sua estrutura primária de sequência de aminoácidos. No entanto, quando comparada a LutC de *B. subtilis*, foi encontrado apenas 25% de identidade, contrastando com os valores de identidade consideravelmente maiores encontrados para as proteínas LutA e LutB citadas anteriormente.

Quadro 27

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Acesso
Lactate utilization protein C	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	209	96%	99%	I7HBE9
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	209	85%	91%	Q6NHV0
	<i>Corynebacterium vitaeruminis</i>	209	76%	86%	W5XZX6
	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	210	69%	81%	E0D196
	<i>Corynebacterium casei</i>	209	55%	70%	G710K0
	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	207	52%	64%	V9X8S1
	<i>Rhodococcus equi</i>	214	50%	65%	E4WFK5
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	212	40%	52%	Q9RT57
	<i>Bacillus cereus</i>	236	27%	45%	B7IMD5
	<i>Bacillus anthracis</i>	236	27%	46%	Q81TG0
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	236	27%	46%	A0RBC9
	<i>Bacillus subtilis</i>	240	25%	47%	O32259
YkgG proteína descaracterizados	<i>Escherichia coli</i>	231	33%	58%	P77433

A busca por domínios conservados em LutC de *C. pseudotuberculosis* realizada através da ferramenta InterproScan5, revelou a presença do domínio de função desconhecido DUF162 (aminoácidos 46 a 207)(Figura 63)

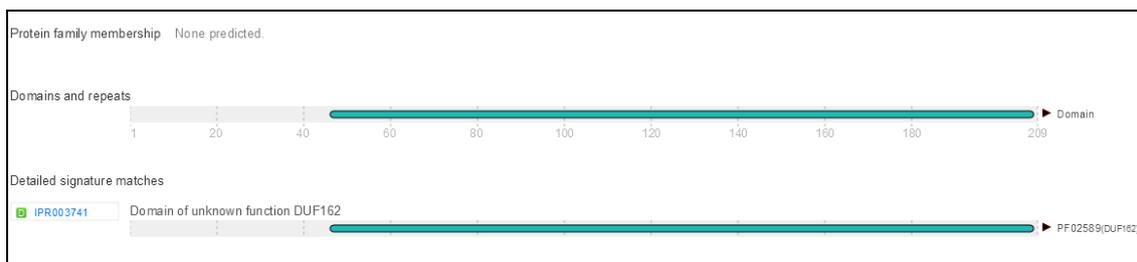


Figura 63: Representação esquemática do domínio conservado da proteína LutC de *C. pseudotuberculosis*. O domínio DUF162 (LUD) é mostrado em azul.

A presença deste domínio está de acordo com a literatura a qual relata que o mesmo é encontrado tanto na proteína LutB, o qual geralmente se encontra associado a outros domínios, como também em LutC, o qual na grande maioria dos casos, é o único domínio encontrado em tais proteínas. Como mencionado anteriormente, este domínio DUF162 foi redefinido como domínio LUD, a partir da estrutura de cristal recentemente determinada da proteína LutC de *D. radiodurans* (Hwang et al., 2013).

Coerentemente a estes fatos, a proteína LutC de *D. radiodurans* é a primeira a apresentar uma estrutura de cristal de proteínas da família do domínio LUD. Foi relatado que algumas regiões da sequência de LutC são altamente conservadas, sendo que tais áreas conservadas estão concentradas em um dos lados da estrutura e formam um sulco que pode ser funcionalmente importante. A proteína LutC parece ser dimérica, com uma superfície enterrada na interface do dímero, sendo que a região altamente conservada coincide com partes desta interface (Hwang et al., 2013).

Na análise da estrutura do dímero LutC, foi identificada uma cavidade altamente conservada (revestida por resíduos Y55, H201, e R204) perto da interface do dímero (Figura 64) e foi proposta para ser o provável sítio ativo onde ocorre a conversão oxidativa de L-lactato para piruvato (Hwang et al., 2013).

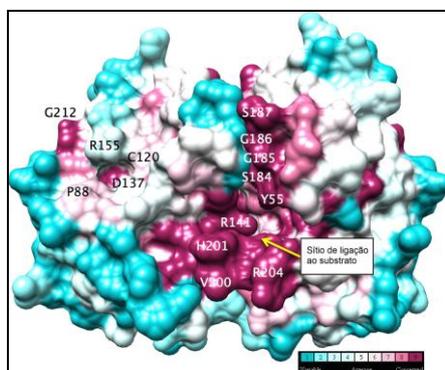


Figura 64: A cavidade altamente conservada perto da interface do dímero, como o possível sítio ativo.

Tal proposição foi baseada nas seguintes observações: os resíduos que cercam essa cavidade são altamente conservados, o que sugere que eles são funcionalmente importantes; esta cavidade é grande o suficiente para acomodar o NAD (previsto como um possível cofator) e o substrato lactato (Figura 65); o modelo de ancoragem do NADH para a Histidina 201 altamente conservada na proteína LutC que está localizada no sítio ativo hipotético, pode ser, de fato, a histidina catalítica desta proteína (Hwang et al., 2013)

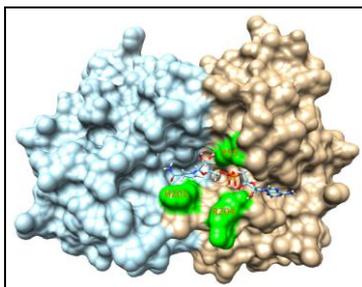


Figura 65: Ligação do NADH para o sítio ativo hipotético perto da interface do dímero. Os monômeros são coloridos em ciano e marrom, respectivamente. Resíduos próximos altamente conservados, Y55, H201, R204 são destacados em verde e etiquetados.

Com o objetivo de analisar a conservação dos resíduos que foram propostos a formar o provável sítio ativo, incluindo a ligação ao substrato e ao cofator, localizados próximos a cavidade formada na estrutura do dímero LutC em *D. radiodurans*, foi realizado um alinhamento múltiplo entre as sequências das proteínas LutC da mesma e as das proteínas ortólogas de *C. pseudotuberculosis*, *C. Corynebacterium*, *C. ulcerans*, *C. diphtheriae*, *R. pyridinivorans*, *R. equi* e *B. subtilis* (Figura 66). As sequências foram alinhadas através do ClustalW e o alinhamento foi visualizado por meio do programa Jalview. No Quadro 28 é mostrado um resumo dos resultados obtidos desse alinhamento, contendo a posição de cada resíduo em *D. radiodurans* e *C. pseudotuberculosis*, assim como a conservação entre as sequências e a função dos mesmos na estrutura de LutC de *D. radiodurans*, usada como referência.

Quadro 28: Resíduos analisados quanto à conservação entre as sequências das proteínas LutC utilizadas no alinhamento múltiplo.

Resíduos		Conservação	Função
<i>D. radiodurans</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>		
Y55	Y53	Todos possuem Y nessa posição, de menos B.	Ligação do NADH para o sítio ativo hipotético, sendo a H201 a provável histidina catalítica.
H201	H198	100%	
R204	R201	Todos possuem R nessa posição, de menos B.	
R141	R 142	100%	Cavidade altamente conservada perto da interface do dímero, como o possível sítio ativo.
S184	S181	Todos possuem S nessa posição, de menos B.	
G185	G182	100%	(Juntamente com os três resíduos acima)
G 186	P183	Todos mudaram para P, mas continuam com as	
S187	S184	100%	
V200	V 197	100%	

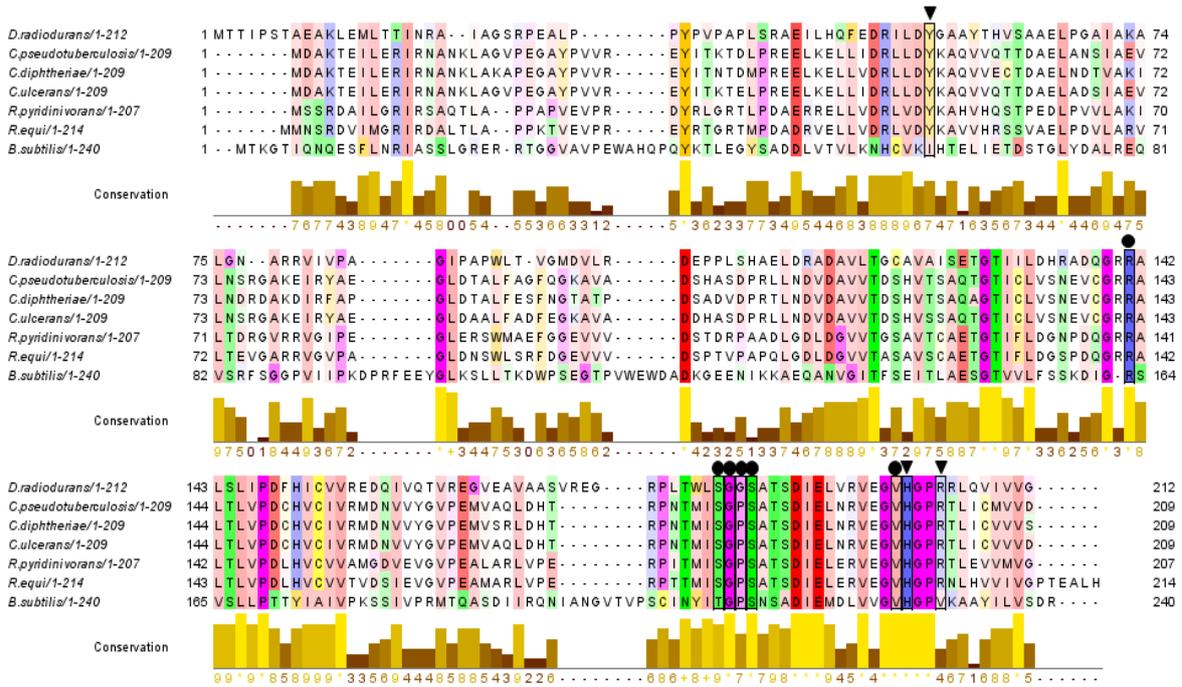


Figura 66:

Pode-se observar a partir desses resultados que LutC de *C. pseudotuberculosis* possui 8 dos 9 resíduos conservados propostos por fazer parte do possível sítio ativo do dímero LutC em *D. radiodurans*, os quais incluem os três resíduos altamente conservados que provavelmente desempenham um papel importante na ligação ao NADH, com um destaque especial para a provável histidina catalítica, a qual também se encontra conservada em *C. pseudotuberculosis*. Estes três resíduos correspondem aos Y53, H198 e R201 na sequência primária de LutC de *C.*

pseudotuberculosis. O único resíduo conflitante foi o resíduo de glicina G186 de *D. radiodurans*, o qual foi substituído por uma prolina em todas as sequências analisadas. Entretanto, os resíduos de glicina e prolina compartilham as mesmas propriedades físico-químicas, sugerindo assim, uma conservação funcional dos mesmos.

Já em *B. subtilis*, foram observadas quatro substituições de resíduos específicos, sendo duas conservativas e duas não conservativas. Estas últimas (não conservativas) ocorreram em dois dos três resíduos conservados da cavidade do sítio ativo, supostamente envolvidos na ligação ao NADH. No entanto, a possível histidina catalítica apresenta-se conservada em *B. subtilis*. Estes resultados podem sugerir que a ausência de tais resíduos na estrutura de LutC de *B. subtilis* provavelmente não afeta a capacidade catalítica da mesma, podendo haver outros resíduos no sítio ativo desta que compensam a falta de tais. Além disso, a presença de tal histidina pode ser, de fato, essencial para que ocorra a catálise enzimática, reforçando assim, esta hipótese.

LutP:

De acordo com a sequência genômica, a proteína L-lactato permease (LutP) de *C. pseudotuberculosis* é composta por 550 resíduos de aminoácidos em todas as 15 linhagens e a busca por sequências similares realizada através do BLAST (**Quadro 29**) revelou a presença de proteínas anotadas como “L-lactato permease” com elevados percentuais de identidade em algumas espécies do gênero *Corynebacterium*, como por exemplo, 98%, 84% e 81% de identidade e 99%, 93% e 91% de similaridade com *C. ulcerans*, *C. diphtheriae* e *C. vitaeuruminis*, respectivamente. Embora nenhuma delas esteja anotada como L-lactato permease do tipo LutP, é muito provável que realmente sejam estas, pois além de não possuírem uma L-lactato desidrogenase LldD homóloga a de *C. glutamicum*, tais bactérias também possuem um operon LutABC conservado, como demonstrado anteriormente.

Nesse contexto, é interessante observar a alta conservação entre as proteínas preditas para utilização de L-lactato LutABC e para a L-lactato permease de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, as quais compartilham, no mínimo, 96% de identidade de sequência entre as suas proteínas ortólogas respectivas. Tal resultado já era de se esperar em razão da alta semelhança entre essas duas espécies.

Quadro 29: Resultados da análise de similaridade através do BLAST para LutP de *C. pseudotuberculosis*

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Acesso/UniProt
L-lactate permease	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	550	98%	99%	I7H8D9
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	552	84%	93%	H2I8G8
	<i>Corynebacterium vitaeuruminis</i>	549	81%	91%	W5Y0T3
	<i>Rhodococcus ruber</i>	555	54%	72%	M2Y1Z8
	<i>Rhodococcus equi</i>	555	53%	70%	E4WFK2
L-lactate permease LutP	<i>Bacillus subtilis</i>	563	35%	56%	P71067
L-lactate permease LldP	<i>Salmonella typhi</i>	551	35%	55%	Q8Z2E3
	<i>Escherichia coli</i>	551	36%	55%	P33231

Além das corinebactérias supracitadas, foram encontrados também 54% e 53% de identidade para as proteínas L-lactato permease de *R. ruber* e *R. equi*, respectivamente. Além disso, também foi encontrado um valor de 35% de identidade com a L-lactato permease LutP de *B. subtilis*. Foram também encontrados valores de 36% e 35% de identidade com as permeases de L-lactato LldP de *E. coli* e *S. typhi*, respectivamente.

Através da análise da sequência proteica de LutP de *C. pseudotuberculosis* pela ferramenta InterproScan5, foi confirmada que tal proteína pertence a família de L-lactato permeases (Figura 67), as quais são caracterizadas por serem proteínas integrais de membrana envolvidas no transporte de L-lactato (Chai et al., 2009; Dong et al., 1993; Stansen et al., 2005). Esta família também inclui GicA, uma permease para glicolato, a qual é estrutural e funcionalmente semelhante a L-lactato permease e também pode transportar D-lactato e L-lactato (Núñez et al., 2001, 2002).

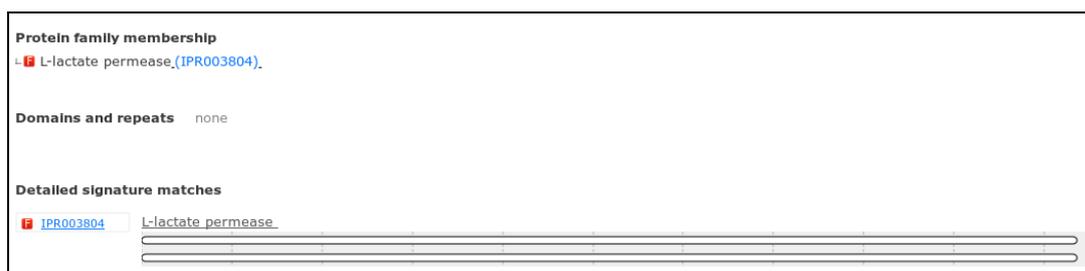


Figura 67: Classificação da LutP de *C. pseudotuberculosis* como pertencente à família L-lactato permease. Análise realizada através da ferramenta InterproScan5.

Além desses resultados, foi também predito através do programa TMHMM2.0., que LutP de *C. pseudotuberculosis* apresenta 12 hélices transmembrânicas (Figura 68), o que está de acordo com o esperado, tendo em vista que as permeases de L-lactato são proteínas integrais de membrana.

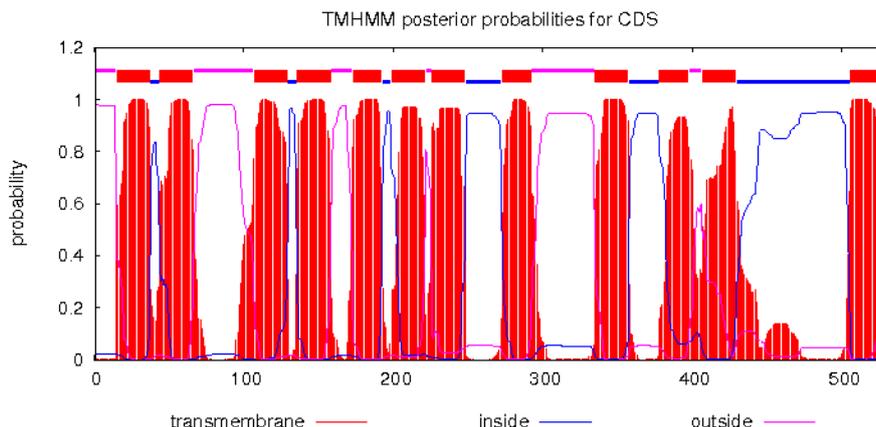


Figura 68: A L-lactato permease LutP de *C. pseudotuberculosis* é composta de 12 hélices transmembrânicas que correspondem aos resíduos: (15 a 37), (44 a 66), (107 a 129), (136 a 158), (173 a 192), (199 a 221), (226 a 248), (273 a 292), (335 a 357), (378 a 397), (407 a 429) e (506 a 528). Análise realizada pelo programa TMHMM2.0.

Por fim, pode-se concluir a partir do conjunto de resultados obtidos através das análises realizadas para as proteínas LutA, LutB, LutC e LutP de *C. pseudotuberculosis* que, de fato, há grandes evidências sugerindo uma via funcional de utilização de L-lactato por essa bactéria patogênica.

Utilização de lactato está associada à patogenicidade de algumas bactérias, tais como *Neisseria gonorrhoeae* (Iwatani et al., 2014), *N. meningitidis*, e *Haemophilus influenzae*. Nestas bactérias, o lactato é incorporada no ciclo de energia, bem como a via de síntese de alguns determinantes patogênicos, tais como lipopolissacarídeos e cápsula de ácido polissálico. A incapacidade de utilizar lactato diminui significativamente a capacidade de as bactérias patogênicas para colonizar e sobreviver *in vivo* (Iwatani et al., 2014).

Sendo assim, seria de grande interesse verificar mais profundamente qual a influência que tal enzima exerce sobre a virulência e patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*, como por exemplo, a observação do crescimento e sobrevivência de linhagens mutantes tanto *in vitro*, como também *in vivo* em camundongos infectados. Confirmando a importância de tal enzima para a sobrevivência e colonização de hospedeiros infectados, poderá ser um novo alvo atraente para novas drogas no controle das doenças causadas por tal patógeno.

Enzimas oxidando menaquinol

Citocromo *bc*₁ complexo

O complexo citocromo *bc*₁ é codificado pelos genes *qcrCAB* para o citocromoc, proteína ferro-enxofre Rieske, e citocromo *b*, respectivamente. As sequências de proteínas deduzidas a partir destes genes revelou um número de diferenças de representantes clássicos do complexo citocromo *bc*₁, como uma extensão de cerca de 120 aminoácidos no terminal C do citocromo *b* e a presença de três hélices transmembranares na região N-terminal da proteína de ferro-enxofre Rieske em vez de única. Mais notavelmente, o citocromo *c*₁ foi encontrada para ter dois CXXCH motivos para a ligação covalente de heme, sugerindo que é um tipo citocromo do tipo *c* diheme

QcrA: 406aa (15 linhagens)

De acordo com a sequência derivada dos genomas, QcrA é composta por 406 aminoácidos em todas as 15 linhagens, e a busca por similaridade realizadas através do BLAST foram encontrados elevados valores de identidade de sequência com as proteína ortólogas presentes em outras espécies do gênero *Corynebacterium*, tais como 98%, 88%, 75% e 74% de identidade com *C. ulcerans*, *C. diphtheriae*, *C. glutamicum* e *C. efficiens*, respectivamente. Além disso, foram encontrados também 51% de identidade com as proteínas QcrA de *M. tuberculosis* e *M. bovis*.

Quadro 30

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Menaquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	406	98%	99%	qcrA	V6V4N0
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	406	88%	94%	qcrA	Q6NGA2

	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	408	75%	85%	qcrA	Q79VE8
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	408	74%	85%	qcrA	Q8FNR1
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	429	51%	66%	qcrA	P9WH23
	<i>Mycobacterium bovis</i>	429	51%	66%	qcrA	Q7TYX4

A busca por domínios conservados na sequência de QcrA de *C. pseudotuberculosis* através da ferramenta InterproScan5 revelou a presença do domínio "Rieske, ferro-enxofre [2Fe-2S]", assim como esperado. As proteínas Rieske são proteínas que possuem um aglomerado ferro-enxofre do tipo [2Fe-2S] no qual um átomo de ferro coordenado por dois resíduos de cisteínas e o outro é coordenado por dois resíduos de histidinas. As proteínas do tipo Rieske são as únicas que possuem esse tipo de coordenação em que um dos dois átomos de ferro do aglomerado [2Fe- 2S] é coordenado por dois resíduos de histidina em vez de dois resíduos de cisteína.

Neste contexto, a busca por motivos conservados realizada através da ferramenta Prosite, foi encontrado, o domínio Rieske entre os resíduos 299 a 388 e, além disso, foi predito que os átomos de ferro do aglomerado ferro-enxofre 2Fe-2S estão ligados à estrutura da proteína por meio dos resíduos de histidina "H333 e H 353" e pelos resíduos de cisteína "C 331 e C 350"

InterproScan5

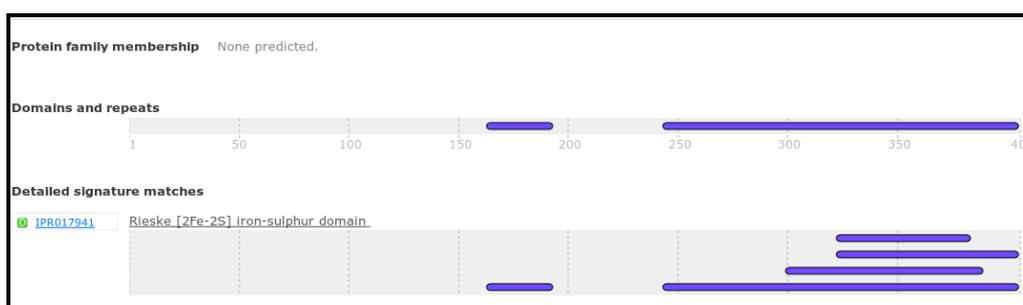


Figura 69

Domínio: Rieske [2Fe-2S] iron-sulphur domain

Existem vários tipos de clusters de ferro-enxofre que são agrupados em três categorias principais com base em seu conteúdo atômico: [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S]. O tipo Rieske, o aglomerado [2Fe-2S] é coordenado à sua proteína por dois resíduos de cisteínas e dois resíduos de histidinas. Rieske do tipo agrupamentos de ferro-enxofre são comuns a cadeia de transferência de elétrons de mitocôndrias, bactérias e cloroplastos e sistemas oxigenase ferro não-heme:

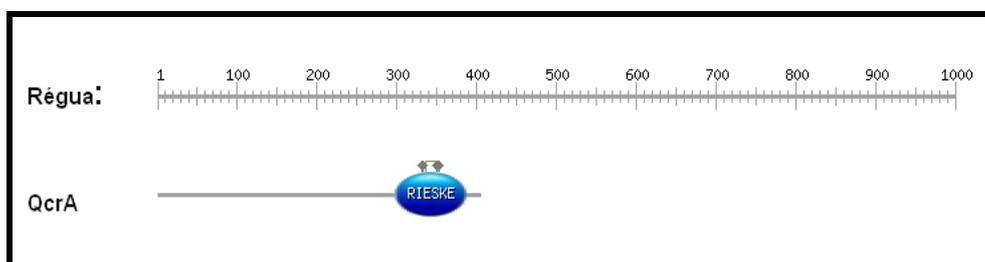


Figura 70: Prosite

Quadro 31: Prosite

Domínio: Rieske [2Fe-2S] ferro-enxofre	299 a 388	
Metal	C 331	Ferro-enxofre 2Fe-2S
Metal	H 333	Ferro-enxofre 2Fe-2S
Metal	C 350	Ferro-enxofre 2Fe-2S
Metal	H 353	Ferro-enxofre 2Fe-2S
Disulfeto	C 336	ligação entre os grupos tiol de dois resíduos de cisteína
	C 352	

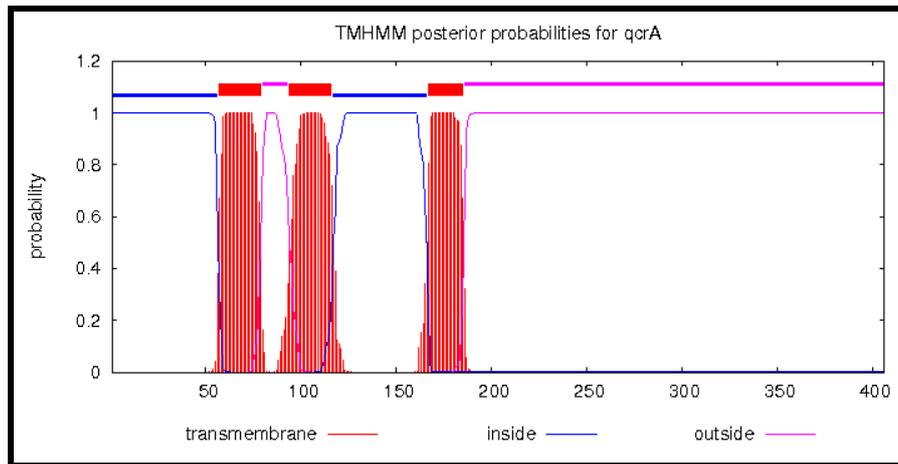


Figura 71

QcrB: 540 (15 linhagens)

Quadro 32

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Menaquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit						
	Corynebacterium diphtheriae	540	94%	98%	qcrB	Q6NGA3
	Corynebacterium glutamicum	539	82%	90%	qcrB	Q79VE9
	Corynebacterium efficiens	540	81%	91%	qcrB	Q8FNR2
	Mycobacterium tuberculosis	549	65%	80%	qcrB	P9WP37
	Mycobacterium bovis	549	65%	80%	qcrB	P63886
	Mycobacterium leprae	551	65%	79%	qcrB	P15878

InterproScan5:

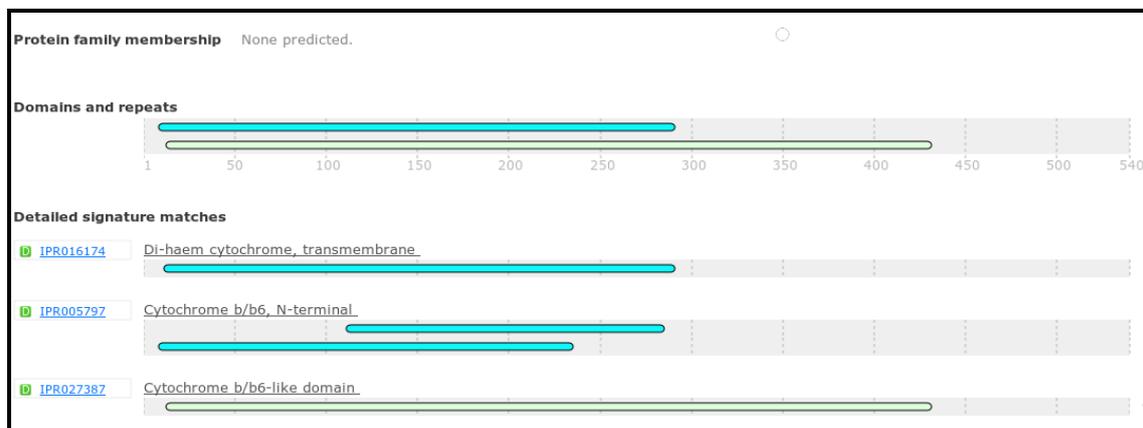


Figura 72

Domínio: “Di-haem cytochrome, transmembrane (IPR016174)”

Esta entrada representa um domínio de ligação a heme, com uma estrutura de feixe de quatro-helicoidal que se encontra em transmembranares citocromos di-heme. O domínio contém quatro hélices transmembrana em um pacote para cima e para baixo, e liga-se dois grupos heme entre as hélices; três dos quatro resíduos de ligação a heme, é conservada entre os membros da família. Proteínas contendo neste domínio incluem:

Domínio: “Cytochrome b/b6, N-terminal (IPR005797)”

Na mitocôndria de eucariotas e procariotas em aeróbios, citocromo b é um componente do complexo III da cadeia respiratória (CE: 1.10.2.2) - também conhecido como o complexo bc 1 ou ubiquinol-citocromo c redutase. Nos cloroplastos de plantas e cianobactérias, há uma proteína análoga, citocromo b6, um componente da redutase plastoquinona-plastocianina (CE: 1.10.99.1), também conhecido como o complexo b6f.

Citocromo b / b6 é uma proteína integral de membrana de cerca de 400 resíduos de aminoácidos, que provavelmente contém oito segmentos transmembranares. Nas plantas e cianobactérias, citocromo b6 consiste em duas subunidades codificadas pelos genes e petB PETD. A sequência de petB é colinear com a parte N-terminal do citocromo b mitocondrial, enquanto PETD corresponde à parte do terminal C. Citocromo b / b6 não se liga de forma covalente dois grupos heme, conhecidos como b562 e b566. Quatro resíduos de histidina conservados estão postulado ser os ligandos de os átomos de ferro de heme estes dois grupos.

Além de regiões ao redor alguns dos ligantes heme histidina, há algumas regiões conservadas na sequência de b / B6. O melhor conservada destas regiões inclui um tripleto PEW invariante que se encontra no circuito fechado que separa os quinto e sexto segmentos transmembranares. Parece ser importante para a transferência de elétrons no local redox ubiquinona - chamado Qz ou Qo localizado no lado exterior da membrana. Esta entrada representa a região N-terminal destas proteínas.

Domínio: Cytochrome b/b6-like domain (IPR027387)

Citocromo b / b6 é uma proteína integral de membrana de cerca de 400 resíduos de aminoácidos, que provavelmente contém oito segmentos transmembranares. Nas plantas e cianobactérias, citocromo b6 consiste em duas subunidades codificadas pelos genes petB e petD. A sequência de petB é colinear com a parte N-terminal do citocromo b mitocondrial, enquanto petD corresponde à parte C-terminal. Citocromo b / b6 não se liga de forma covalente dois grupos heme, conhecidos como b562 e b566. Quatro resíduos de histidina conservados estão postulado ser os ligantes dos átomos de ferro destes dois grupos heme

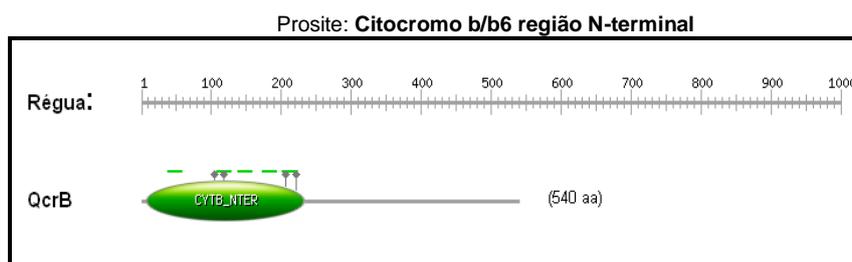


Figura 73

Quadro 33

Metal	H 105	Ferro (Ligando axial heme 1)
Metal	H 119	Ferro (Ligando axial heme 1)
Metal	H 206	Ferro (Ligando axial heme 2)
Metal	H 221	Ferro (Ligando axial heme 2)

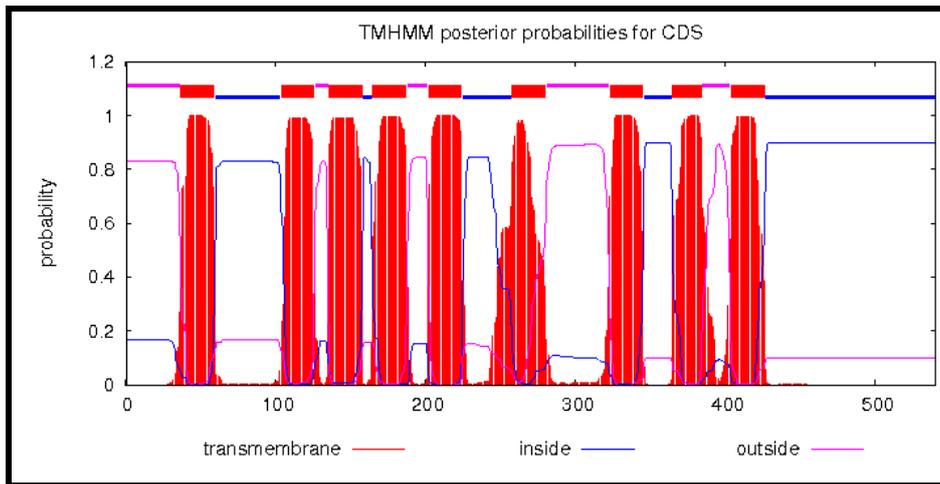


Figura 74

QcrC: 298 aa (15 linhagens)

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Menaquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	281	98%	99%	qcrC	V6V4N0
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	281	91%	97%	qcrC	Q6NGA1
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	296	81%	93%	qcrC	Q8FNR0
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	283	81%	92%	qcrC	Q8NNK5
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	280	60%	72%	qcrC	P9WP35
	<i>Mycobacterium bovis</i>	280	60%	72%	qcrC	P63888
	<i>Mycobacterium leprae</i>	289	58%	73%	qcrC	O69583

Interpro



Família: “Ubiquinol-cytochrome-c reductase, cytochrome c subunit (IPR009152)”

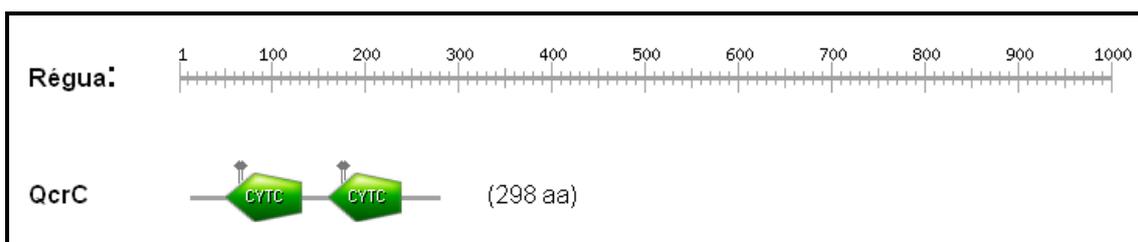
Esta entrada representa o citocromo c subunidade QcrC, encontrado em um número de bactérias gram-positivas. QcrC, um citocromo dihaem, faz parte de um

Cytochrome c domain (IPR003088)

Citocromos c (CytC) pode ser definido como proteínas de transferência de elétrons com um ou vários grupos heme c, ligados à proteína por um, ou mais geralmente, duas ligações tioesterr envolvendo os grupos sulfidrílicos de resíduos de cisteína. O quinto ligante do ferro heme é sempre fornecido por um resíduo de histidina. CytC possuem uma vasta gama de propriedades e participam de um grande número de diferentes processos redox (Brzezinski and Gennis, 2008)

Prosite:

Em proteínas que pertencem à família do citocromo c, o grupo heme é ligado de forma covalente por ligações tioéster através de dois resíduos de cisteína conservados situados no centro do citocromo c. Os citocromos c normalmente funcionam na transferência de elétrons, mas centros do tipo citocromo c são encontrados também em locais ativos de muitas enzimas. A sequência de consenso para o centro do citocromo c é Cys-xx-Cys-His, em que o resíduo de histidina é um dos dois ligandos axiais do ferro heme. Este arranjo é compartilhada por todas as proteínas conhecidas pertencentes à família do citocromo c (Brzezinski and Gennis, 2008; Qin et al., 2007).



<u>Domínio</u>	69 a 149	Citocromo c
Ligação	C 82	Heme 1 (covalente) (Por similaridade)
Ligação	C 85	Heme 1 (covalente) (Por similaridade)
<u>METAL</u>	H 86	Ferro (heme 1 ligando axial) (Por similaridade)

<u>Domínio</u>	179 a 257	Citocromo c
Ligação	C 192	Heme 1 (covalente) (Por similaridade)
Ligação	C 195	Heme 1 (covalente) (Por similaridade)
<u>METAL</u>	H 196	Ferro (heme 1 ligando axial) (Por similaridade)

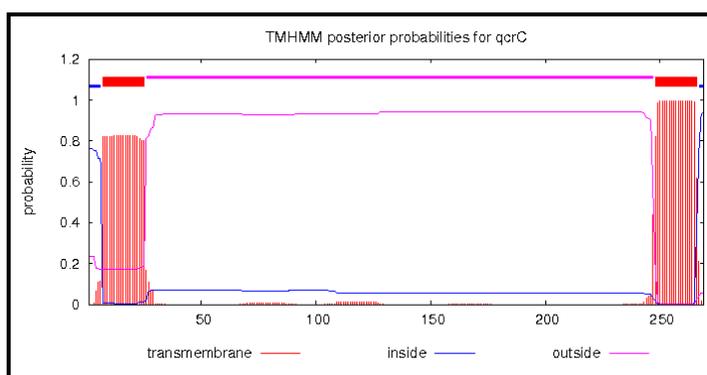


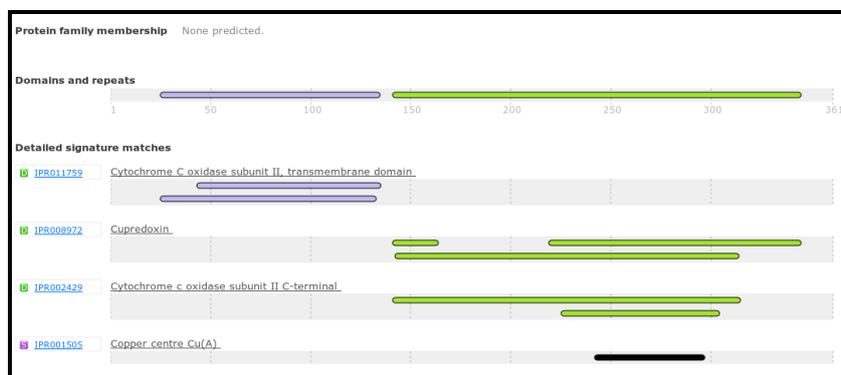
Figura 75

Citocromo aa₃ oxidase

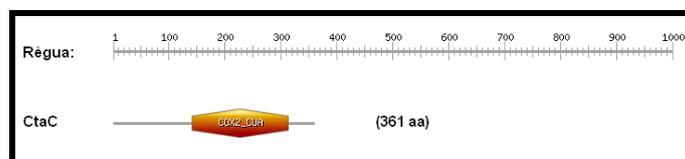
CtaC: 361 aa (15)

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Cytochrome c oxidase subunit 2	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	361	99%	100%	ctaC	I7GXK6
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	362	85%	90%	ctaC	Q6NG98
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	359	72%	84%	ctaC	Q8NNK2
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	359	70%	85%	ctaC	Q8FNQ7
	<i>Nocardia farcinica</i>	375	49%	65%	ctaC	Q5YZ37
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	363	49%	64%	ctaC	P9WP69
	<i>Mycobacterium bovis</i>	363	49%	64%	ctaC	P63855
	<i>Mycobacterium leprae</i>	353	48%	62%	ctaC	Q9CCF1
	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	360	47%	63%	ctaC	Q73YL5

InterproScan5:



Prosite:



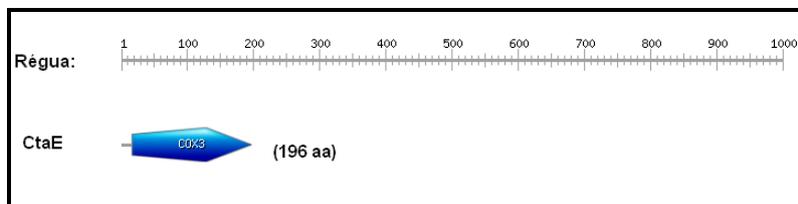
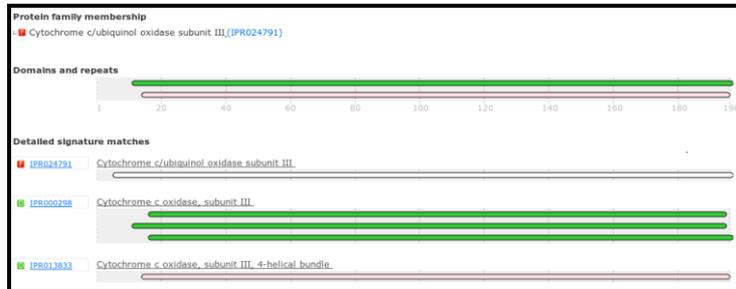
CtaD: 573 aa (15)

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Cytochrome c oxidase subunit 1	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	361	99%	100%	ctaD	I7GXK6
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	564	92%	98%	ctaD	Q6NFM3
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	580	87%	96%	ctaD	Q8FMT1
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	584	86%	95%	ctaD	Q79VD7
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	573	73%	86%	ctaD	P9WP71
	<i>Mycobacterium bovis</i>	573	73%	86%	ctaD	P63853
	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	581	73%	86%	ctaD	Q73VC3
	<i>Mycobacterium leprae</i>	574	73%	88%	ctaD	Q9CBQ5
	<i>Nocardia farcinica</i>	581	73%	86%	ctaD	Q5YRP8

CtaE: 196 aa (15)

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Cytochrome c oxidase subunit 3	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	196	98%	98%	ctaE	I7GRW9
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	205	92%	97%	ctaE	Q6NGA0
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	205	84%	93%	ctaE	Q8FNQ9
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	205	84%	92%	ctaE	Q9AEL8
	<i>Nocardia farcinica</i>	203	66%	79%	ctaE	Q5YZ19
	<i>Mycobacterium leprae</i>	202	64%	77%	ctaE	O69582
	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	203	64%	76%	ctaE	Q73YM3
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	203	62%	77%	ctaE	P9W67
	<i>Mycobacterium bovis</i>	203	62%	77%	ctaE	P63857

Interpro:



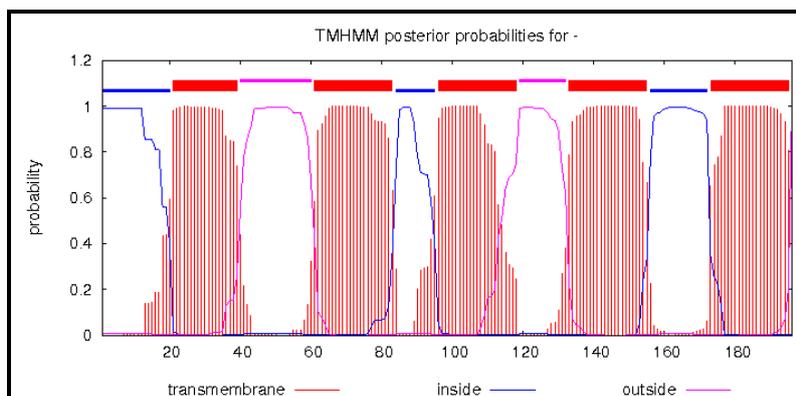


Figura 76

CtaF: 143 aa (15)

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Cytochrome c oxidase polypeptide 4	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	143	99%	100%	ctaF	I7H3A5
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	143	82%	94%	ctaF	Q6NG99
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	143	69%	80%	ctaF	Q8FNQ8
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	143	69%	83%	ctaF	Q8NNK3
	<i>Nocardia farcinica</i>	138	38%	57%	ctaF	Q5YZ36
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	139	38%	55%	ctaF	P9WP45
	<i>Mycobacterium bovis</i>	139	38%	55%	ctaF	P64948
	<i>Mycobacterium leprae</i>	139	36%	55%	ctaF	Q9CCF0
	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	139	36%	52%	ctaF	Q73YL6

InterproScan5:

Protein family membership
■ [Cytochrome c oxidase subunit IV, actinobacteria_\(IPR021050\)](#)

Domains and repeats none

Detailed signature matches
■ [IPR021050](#) [Cytochrome c oxidase subunit IV, actinobacteria](#)

Figura 77

Família

Citocromo c oxidase subunidade IV, actinobactérias (IPR021050)

Esta família de proteínas é encontrada em bactérias Gram-positivas, principalmente Actinobactérias, e representam a quarta subunidade do complexo de citocromo c oxidase. Esta subunidade não possui uma capacidade catalítica, mas em vez disso, é necessária para a montagem e / ou estabilidade do complexo

Citocromo *bd* menaquinol oxidase

CydA: 507 aa (15)

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Cytochrome bd menaquinol oxidase subunit 1	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	507	95%	98%	cydA	I7GXQ7
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	511	77%	85%	cydA	H2HAM0
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	513	64%	76%	cydA	G6WVX6
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	487	63%	76%	cydA	L8FBM0
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	485	61%	74%	cydA	W6HQW2
	<i>Mycobacterium bovis</i>	485	61%	74%	cydA	W8SEI3
	<i>Bacillus subtilis</i>	468	42%	65%	cydA	P94364
	<i>Shigella flexneri</i>	522	34%	52%	cydA	P0ABK1
	<i>Escherichia coli</i>	522	34%	52%	cydA	Q5YRP8

Protein family membership
 Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I ([IPR002585](#))

Domains and repeats none

Detailed signature matches
[IPR002585](#) Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I

CydB: 327 aa (15)

Proteína	Organismo	Tamanho	Identidade	Similaridade	Gene	Acesso/Unipro
Cytochrome bd menaquinol oxidase subunit 2	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	327	96%	98%	cydB	I7H9V9
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	324	71%	81%	cydB	Q6NFI9
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	333	54%	70%	cydB	S5XPQ1
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	350	55%	70%	cydB	A0QXA7
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	346	54%	69%	cydB	A0A049D7A1
	<i>Bacillus subtilis</i>	338	40%	59%	cydB	P94365
	<i>Escherichia coli</i>	379	36%	53%	cydB	P0ABK2

Protein family membership

1  [Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II \(IPR003317\)](#)

Domains and repeats none



Detailed signature matches

1  [IPR003317](#) [Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II](#)

