



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LEVI AZEVEDO CASTELO BRANCO

**ANÁLISE PROTEÔMICA E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE
PEPTÍDEO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO CONTRA *Klebsiella*
*pneumoniae***

FORTALEZA

2022

LEVI AZEVEDO CASTELO BRANCO

ANÁLISE PROTEÔMICA E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE
PEPTÍDEO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO CONTRA *Klebsiella pneumoniae*

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado
em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Diniz
Teixeira de Freitas

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C345a Castelo Branco, Levi Azevedo.
Análise proteômica e estudo do mecanismo de ação de peptídeo sintético antimicrobiano contra *Klebsiella pneumoniae* / Levi Azevedo Castelo Branco. – 2022.
98 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas.
1. Peptídeos sintéticos. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Proteômica; Resistência. I. Título.

CDD 661

LEVI AZEVEDO CASTELO BRANCO

ANÁLISE PROTEÔMICA E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE
PEPTÍDEO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO CONTRA *Klebsiella pneumoniae*

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado
em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Pedro Brasil de Oliveira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Janine e Bruno pelo carinho e cuidado durante essa jornada, assim como pelos importantes ensinamentos.

Ao professor Cleverson Diniz Teixeira de Freitas pela orientação e ensinamentos passados durante o projeto, pela disponibilidade em sempre poder ajudar.

Aos professor Pedro Filho Noronha de Souza pela orientação, pelos conselhos, por sempre me instigar a pensar mais e pela oportunidade de trabalhar com uma pesquisa tão interessante.

Aos professores participantes da Banca Examinadora pelas contribuições e apontamentos que levaram a melhor o presente trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais por sempre me ajudarem quando possível e sempre trazerem discussões interessantes.

Aos meus amigos Daniel, Eric, Felipe e Jochuan por estarem presentes desde o início da graduação, sempre realizando todas as atividades e mostrando que o trabalho em equipe sempre prevalece.

Aos meu grande amigo Nilton por estar do meu lado desde a graduação anterior, por sempre ajudar quando precisei, tenho certeza que vai se tornar um grande pesquisador.

Ao departamento de Bioquímica e Biologia molecular por fornecer a estrutura que tornou possível a execução deste estudo.

Ao CNPq, pelo fomento à pesquisa, incentivo e suporte financeiro que permitiu a execução e a realização desta pesquisa. Aos demais órgãos de fomento pelo apoio concedido a este trabalho.

|

“O trabalho dignifica o homem.”

(Max Weber)

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um microrganismo patogênico humano oportunista e que em muitos casos está relacionado a uma grande variedade de infecções. Além disto, tem sido reconhecido, juntamente com outros microrganismos, por desenvolver mecanismos de resistência contra antibióticos. De modo a lidar com a resistência antibacteriana, potenciais moléculas alternativas estão sendo estudadas, como os peptídeos sintéticos. Mo-CBP3-Pepl tem apresentado atividade contra *K. pneumoniae* com concentração inibitória mínima de 50% (MIC₅₀) de 50 µg mL⁻¹. O presente trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de ação do peptídeo Mo-CBP3-Pepl contra *K. pneumoniae*. Em conjunto, a análise de microscopia de fluorescência e a análise proteômica revelaram a alteração na permeabilidade da membrana celular e superprodução de ROS. O perfil proteico de células tratadas com Mo-CBP3-Pepl mostrou drásticas alterações em vias metabólicas essenciais. Após o tratamento de células de *K. pneumoniae* com Mo-CBP3-Pepl, observou-se uma redução na abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, metabolismo de DNA e proteínas, organização do citoesqueleto e parede celular e patogênese. Tal redução leva ao déficit de energia, inibição da replicação do DNA e inibição da renovação da parede celular levando à célula. Além disso, o alto acúmulo de proteínas e pró-apoptose, e as proteínas estão envolvidas em danos ao DNA. Assim, esses resultados revelaram que Mo-CBP3-Pepl atua causando danos à membrana e parede celular e induz a morte em células de *K. pneumoniae* pelo aumento dos níveis de ROS, assim como proteínas que induzem morte celular. Tal molécula apresenta mecanismos de ação que dificultam o desenvolvimento de mecanismos de resistência, podendo ser uma molécula em potencial para o desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: Peptídeos sintéticos; *Klebsiella pneumoniae*; Proteômica; Resistência

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic human pathogenic microorganism that in many cases is related to a wide variety of infections. Furthermore, it has been recognized, along with other microorganisms, for developing mechanisms of resistance against antibiotics. In order to deal with antibacterial resistance, potential alternative molecules are being studied, such as synthetic peptides. *Mo*-CBP3-PepI has shown activity against *K. pneumoniae*, with a 50% minimum inhibitory concentration (MIC₅₀) of 50 µg mL⁻¹. The present work aimed to study the mechanisms of action of the peptide *Mo*-CBP3-PepI against *K. pneumoniae*. Together, fluorescence microscopy analysis and proteomics analysis revealed alteration in cell membrane permeability and overproduction of ROS. The protein profile of cells treated with *Mo*-CBP3-PepI showed drastic changes in essential metabolic pathways. After treatment of *K. pneumoniae* cells with *Mo*-CBP3-PepI, a reduction in the abundance of proteins related to energy metabolism, DNA and protein metabolism, cytoskeleton and cell wall organization and pathogenesis was observed. Such a reduction leads to energy deficit, inhibition of DNA replication and inhibition of cell wall renewal leading to the cell. In addition, the high accumulation of proteins and pro-apoptosis, and proteins are involved in DNA damage. Thus, these results revealed that *Mo*-CBP3-PepI acts by causing membrane and cell wall damage and induces cell death in *K. pneumoniae* cells by increasing ROS levels, as well as proteins that induce cell death. Such a molecule presents mechanisms of action that hinder the development of resistance mechanisms, and may be a potential molecule for the development of drugs.

Keywords: Synthetic peptides; *Klebsiella pneumoniae*; proteomics; Resistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de ação de antibióticos bactericidas.....	14
Figura 2.1 – Genes envolvidos nos mecanismos de resistência em <i>K. pneumoniae</i>	20
Figura 2.2 Outros genes envolvidos nos mecanismos de resistência em <i>K. pneumoniae</i>	21
Figura 3 - Modelos de ação de Peptídeos antimicrobianos.....	25
Figura 4 – Microscopia de fluorescência para a avaliação de efeitos após tratamento com peptídeo <i>Mo</i> -CBP3-Pepl.....	35
Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura para a avaliação de efeitos após tratamento com peptídeo <i>Mo</i> -CBP3-Pepl.....	37
Figura 6 – Distribuição de Venn e mapa de calor das proteínas.....	39
Figura 7 – Distribuição estatística das proteínas compartilhadas.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antibiofilme e viabilidade celular.....	34
Tabela 2 – Proteínas identificadas na análise proteômica.....	39
Tabela 3 – Proteínas identificadas expressas somente após o tratamento com o peptídeo <i>Mo</i> -CBP3-Pepl.....	43
Tabela 4 - Proteínas identificadas expressas somente no controle (DMSO).....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Antibióticos e mecanismos de ação.....	12
1.2 Mecanismos de Resistência Bacteriana	14
1.2.1 Multirresistência em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
1.3 Peptídeos Antimicrobianos (PAM)	22
1.3.1 Principais características dos PAM.....	22
1.3.2 Mecanismos de ação dos PAMs.....	23
1.4 Peptídeos antimicrobianos sintéticos.....	25
1.4.1 PAMs sintéticos bioinspirados na proteína <i>Mo-CBP₃</i>	26
1.5 Análise proteômica	27
2. OBJETIVO GERAL	28
2.1 Objetivos específicos	28
3. METODOLOGIA	29
3.1 Obtenção de material biológico	29
3.2 Síntese do peptídeo.....	29
3.3 Viabilidade celular por ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio)	29
3.4 Ensaio antibiofilme.....	30
3.5 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO POR MICROSCOPIA	30
3.5.1 Integridade da membrana celular (iodeto de propídio)	30
3.5.2 Detecção da superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) 31	
3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura	31
3.6 Análise proteômica	32
3.6.1 Extração de proteínas.....	32
3.6.2 Identificação de proteínas.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Atividade antibiofilme e viabilidade celular.....	33

4.2 Mecanismos de ação por microscopia de fluorescência.....	34
4.3 Mecanismos de ação por microscopia eletrônica de varredura.....	36
4.4 Análise proteômica	37
4.4.1 Visão geral.....	37
4.4.2 Metabolismo de DNA.....	86
4.4.3 Resposta ao estresse e defesa	87
4.4.4 Biossíntese e Metabolismo de Proteínas.....	88
4.4.5 Processamento de RNA e Fatores de regulação.....	90
4.4.6 Organização e manutenção da estrutura da parede celular	90
4.4.7 Transferase.....	91
4.4.8 Processos Redox e Homeostase celular	92
5. Conclusão.....	93
REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 Antibióticos e mecanismos de ação

Por muitos anos, diversas infecções levaram muitas pessoas a morte. Destacando-se no século 19, em que se relatava muitos casos mortais de pneumonia, tuberculose, diarreia e difteria (ZAFFIRI; GARDNER; TOLEDO-PEREYRA, 2012). Assim, em meados de 1910, surgiu o primeiro medicamento bacteriológico, comercializado sob a marca Salvarsan. A arsfenamina foi considerada a primeira sulfonamida a ser aplicada em casos clínicos de sífilis e tripanossomíase (ZAFFIRI; GARDNER; TOLEDO-PEREYRA, 2012).

O conceito de antibióticos foi disseminado apenas a partir do ano de 1928, em que Alexander Fleming descobriu a penicilina, dando-se um grande avanço em estudos e pesquisas focadas no controle e tratamento de doenças infecciosas (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Dessa forma, os anos de 1940-1960 ficaram conhecidos pela era de ouro da descoberta de antibióticos derivados de fontes naturais, como aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e β -lactâmicos, sendo muitos deles ainda hoje utilizados no tratamento de infecções bacterianas (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

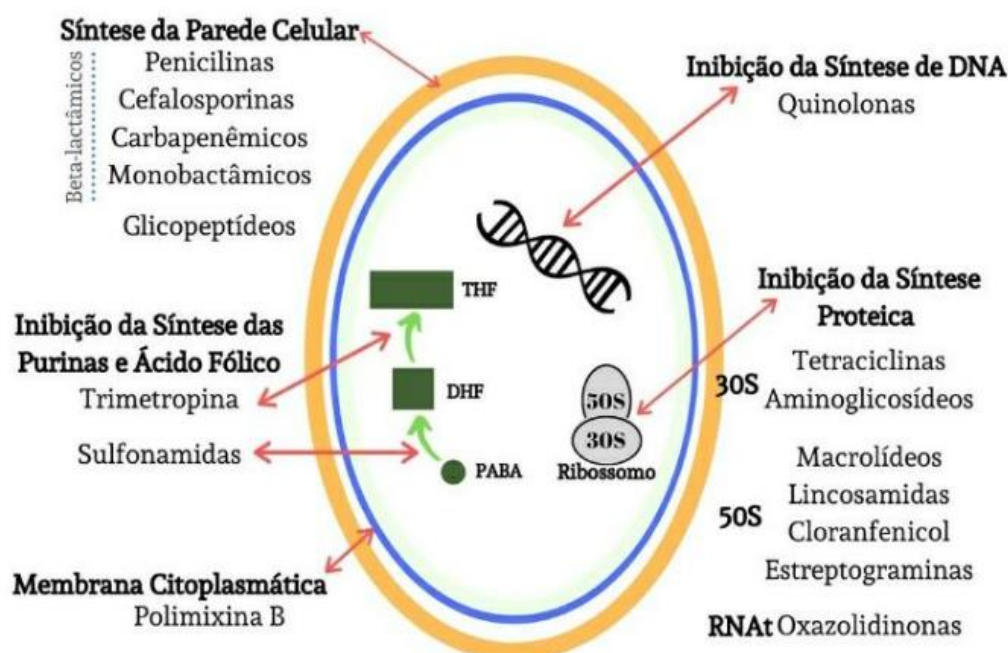
As décadas seguintes foram marcadas pelo declínio da taxa de descoberta de novos medicamentos, sendo a principal abordagem utilizada após os anos 70, a modificação de drogas já existentes (AMINOV, 2010). Além disso, tal época foi marcada pelo aumento da incidência de resistência antimicrobiana, como já havia sido relatado com a penicilina, em que se verificava o desenvolvimento de mecanismos de degradação enzimática (AMINOV, 2010). Pode-se também destacar a aplicação dos primeiros antibióticos sintéticos e semi-sintéticos, como as Fluroquinolonas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Nos últimos 20 anos, se verificou uma grande aplicação de antibióticos isolados de nichos ecológicos limitados ao solo como fungos actinomicetes. Porém, mesmo com os avanços na prospecção de nichos ecológicos e juntamente com o desenvolvimento de tecnologias mais recentes, como triagem de alto rendimento, no entanto, não se verificou uma produção expressiva de novas classes de medicamentos nos últimos anos (AMINOV, 2010).

Quanto aos mecanismos de ação, pode-se verificar uma variedade na atuação de tais antibióticos, que podem atuar diretamente afetando a síntese de parede celular (β -lactâmicos) que atuam se mimetizando em meio cadeia peptídica que compõe a estrutura das ligações cruzadas que formam a estrutura da membrana; inibindo a síntese proteica (Tetraciclina, Aminoglicosídeos e Macrolídeos) que tem como alvo as subunidades ribossômicas responsáveis pela montagem de ribossomos que atuam na catalização do processo; inibindo a replicação de DNA (Quinolonas) que envolve inibição da enzima bacteriana DNA girase, responsável pela introdução de voltas negativas, impedindo o super enrolamento, ao se ligar a uma das subunidades enzimáticas; inibindo o metabolismo de ácido fólico (Sulfonamidas), atuando diretamente sobre a enzima dihidropteroato sintase de forma competitiva, possuindo maior afinidade pelo substrato natural (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). Os diferentes mecanismos de ação são mostrados na figura 1.

O contínuo uso de antibióticos tem gerado uma pressão seletiva sobre o genoma de bactérias, promovendo o desenvolvimento de mecanismos de resistência, e tal processo é promovido pela rápida capacidade de evolução do genoma de tais microrganismos. Logo, o uso rotineiro de antibióticos tem gerado tal efeito seletivo (KOLÁŘ; URBÁNEK; LÁTAL, 2000). O surgimento de bactérias com multirresistências pode comprometer o tratamento de diversos casos de infecção (VARELA et al., 2021).

Figura 1 – Mecanismos de ação de antibióticos bactericidas



Fonte: Adaptado de Sanar, 2021.

1.2 Mecanismos de Resistência Bacteriana

Os mecanismos de resistência bacteriana têm se apresentado durante sua história evolutiva, sendo tais mecanismos promovidos pela maquinária celular e molecular de bactérias (VARELA et al., 2021). Assim, tal efeito pode ser resultado de pressões seletivas (uso de antibióticos) e naturais, decorrentes das condições ambientais em que estão inseridas. (KOLÁŘ; URBÁNEK; LÁTAL, 2000).

Tais mecanismos de resistência aplicados pelas bactérias podem incluir: inativação de antibióticos pela expressão de enzimas, modificação do alvo proteico, alteração da permeabilidade de membrana e expressão de bombas de efluxo responsáveis por expulsar tais agentes. (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017)

Em relação ao mecanismo de inativação de antibióticos, tal processo pode ser promovido por meio da degradação de fármacos ou pela ação de transferases que promovem a transferência de grupos metil, inativando os fármacos. Dentre as enzimas responsáveis por tais mecanismos estão as

hidrolases como já foi apontado no caso dos mecanismos de resistência desenvolvidos contra β -lactâmicos, tal processo é mediado por enzimas denominadas β -lactâmases, sendo produzidas por Gram-positivas e Gram-negativas que tem como atividade hidrolisar a ligação amida do anel β -lactâmico, tornando tais drogas ineficazes (TOOKE et al., 2019).

Quanto a modificação dos alvos, é possível destacar o mecanismo de ação de resistência contra fluoroquinolonas desenvolvido por *Pseudomonas aeruginosa* por meio de mutações estruturais nas DNA topoisomerases, tornando tal droga ineficaz (GOLD; MOELLERING, 1996). Além disso, os mecanismos de resistência contra sulfonamidas vem a ocorrer por conta de um mecanismo similar que promove a alteração de enzimas presentes na via biossintética do ácido fólico, como foi observado em cepas bacterianas com genes *SUL1* e *SUL2*, responsáveis pela expressão de diidropteroato sintases que apresentam alta resistência a sulfonamidas (SKÖLD, 2001).

Outro exemplo que pode ser destacado é o caso de antibióticos que atuam sobre a síntese de proteínas, mais especificamente nas subunidades ribossomais, sendo que o primeiro mecanismo de resistência observado em 1956 foi na eritromicina da classe dos macrolídeos, estudos bioquímicos apontaram que a resistência era causada pela metilação do alvo ribossômico, promovendo uma resistência cruzada a outras classes de antibióticos como lincosamidas e estreptograminas. Tal efeito foi chamado de fenótipo MLS_B codificado por uma variante do gene *ERM*, posteriormente relatado em muitos microrganismos (LECLERCQ, 2002).

De modo a reduzir a entrada de moléculas, um mecanismo de resistência desenvolvido foi a promoção de mudanças na permeabilidade da membrana externa em bactérias Gram-negativas, como observado na alteração dos genes relacionados a expressão de porinas como *OMP* em *Escherichia coli* e *OPRD* em *Pseudomonas aeruginosa*. Visto que as drogas podem ser transferidas para o interior das células de três modos: difusão através de porinas, difusão através da bicamada e por auto-absorção. Naturalmente, o tipo de entrada depende da composição molecular de cada droga, porém ao alterar a expressão de porinas, a bactéria *P. aeruginosa* adquire uma baixa permeabilidade de membrana a pequenas moléculas hidrofílicas (β -lactâmicos e

quinolonas), tornando-as resistentes a tais classes. (GIEDRAITIENĖ et al., 2011). De forma similar, também foi observado o desenvolvimento de mecanismos de resistência a polimixinas (colistinas), sendo alvos da membrana externa, tais moléculas tem como principal constituintes polipetídeos cíclicos carregados positivamente, permitindo a interação com o fosfato carregado negativamente da membrana de Gram-negativos. Logo, o principal mecanismo de resistência a essa droga está relacionado ao fechamento de canais de lipídio A (componente dos lipopolissacarídeos) com fosfoetanolamina, que é catalisada pela fosfoetanolamina transferase, reduzindo assim a passagem de tal molécula (EGOROV; ULYASHOVA; RUBSTOVA, 2018).

Outro mecanismo que foi desenvolvido são as bombas de efluxo que são proteínas que exportam antibióticos do interior para o exterior da célula, mantendo baixas concentrações intracelulares. Tais proteínas podem ser específicas a cada antibiótico, como podem ser multidrogas sendo capazes de bombear uma gama de drogas como macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas. Assim, foi observado que uma maior expressão de tais proteínas MDR, MexV e MexW resulta em uma maior concentração inibitória contra uma gama de antibióticos, sendo observado em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (EGOROV; ULYASHOVA; RUBSTOVA, 2018; GIEDRAITIENĖ et al., 2011; WEBBER, 2003)

1.2.1 Multirresistência em *Klebsiella pneumoniae*

O surgimento de patógenos bacterianos multirresistentes (MDR) é um desafio de saúde pública que preocupa todo o mundo (WHO,2014). Grandes quantidades de antibióticos aplicados em terapias, assim como para animais de fazenda e até mesmo em peixes na aquicultura, vêm a selecionar bactérias patogênicas com resistência a múltiplas drogas (NIKAIDO, 2009).

Klebsiella pneumoniae é um desses microrganismos MDR, sendo identificada como uma ameaça urgente a saúde humana pela Organização Mundial da Saúde, os Centros dos EUA para Controle e Prevenção de Doenças e o Departamento de Saúde do Reino Unido. As infecções por essa bactéria são

um problema particular para indivíduos de grupos de risco como recém-nascidos, idosos e pessoas imunocomprometidas (KIDD et al., 2017).

Tal mecanismo de resistência a múltiplas drogas pode ser gerado por dois mecanismos. Primeiro, as bactérias podem acumular vários genes, cada um codificando resistência a uma única droga, dentro de uma única célula, sendo verificado acumulação típica em plasmídeos de resistência. O outro mecanismo envolve o aumento da expressão de genes que codificam bombas de efluxo de múltiplas drogas, expelindo uma ampla gama de drogas (NIKAIDO, 2009).

Dessa forma, segundo dados recuperados da rede de vigilância europeia, entre os anos de 2005-2015 foram verificadas taxas consideráveis de não-susceptibilidade para *K. pneumoniae* e *E. coli* contra quatro classes de antibióticos (cefalosporina, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos), indicando um aumento constante nas taxas de resistência em *K. pneumoniae*, sendo a resistência variável em cada país europeu. Tal relatório pode ser confirmado pelo espalhamento de casos em outras regiões do mundo como nos Estados Unidos que relataram casos de surto de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), tornando tais antibióticos ineficazes (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATOLLI, 2017; ARNOLD et al., 2011).

Assim, com o passar das décadas foram reportados diversos mecanismos de resistência em *K. pneumoniae*. Sendo inicialmente relatado resistência a penicilina no início dos anos 60. Tal descoberta levou a identificação dos primeiros genes de β -lactamases BLA_{SHV-1} e BLA_{TEM-1} . Logo, duas décadas depois, foram verificados outros genes que apresentavam uma atividade em espectro estendido contra β -lactâmicos, incluindo cefalosporina e monobactâmicos (BUSH; JACOBY, 2010; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATOLLI, 2017).

A grande versatilidade de incorporação de genes de β -lactamases em plasmídeos transferíveis permitiu a disseminação de genes de cefalosporina *AmpC*, que foi verificado posteriormente associado ao cromossomo da bactéria, o que foi indicado pela tendência evolutiva de incorporar genes resistentes ao cromossomo (ZAMORANO et al., 2015). Assim, foram verificadas cepas de alta

resistência a β -lactâmicos devido a presença de genes *BLA_{AmpC}* combinando a perda de porina e aumento de efluxo com genes inativadores, demonstrando uma combinação de mecanismos de resistência, podendo ser facilmente superexpressos em plasmídeos (JACOBY, 2009).

Outro mecanismo também reportado entre as décadas de 1940-1980 está associado ao uso de aminoglicosídeos como cefalosporina, carbapenema e fluoroquinolonas, envolvendo a modificação de enzimas com diferentes atividades como acetilação, adenilação e fosforilação (BENVENISTE; DAVIES, 1973). Porém, com a redução na aplicação de tais antibióticos se verificou um retrocesso na evolução de novos mecanismos até a descoberta da enzima 16S rRNA metilase que pertence à família gênica *armA*, tal enzima impede a ligação dos aminoglicosídeos, ao promover uma metilação no alvo (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016). Diferentemente dos mecanismos envolvendo inativação enzimática que possuem espectro estreito, tal mecanismo confere resistência a uma grande variedade de aminoglicosídeos. Tal mecanismo é transmitido por plasmídeos e está associado as famílias gênicas *Rmt* e *NpmA* (POULIKAKOS; FALAGAS, 2013; YU et al., 2009).

As quinolonas são outra classe de antibióticos que veio a ser utilizada durante os anos de 60, porém foi a partir da aplicação das fluoroquinolonas que se verificou o desenvolvimento de mecanismos de resistência que combinavam mutações genéticas no local, aumento da produção de bombas de efluxo MDR, enzimas modificadoras e/ou proteínas de proteção alvo (NASEEM et al., 2016). O principal mecanismo de resistência relacionados a quinolonas foram as mutações cromossômicas em DNA girase (subunidades *gyrA-gyrB*) e Topoisomerase IV (subunidades *parC-parE*), sendo os principais alvos de ligação de tais drogas (DEGUCHI et al., 1997).

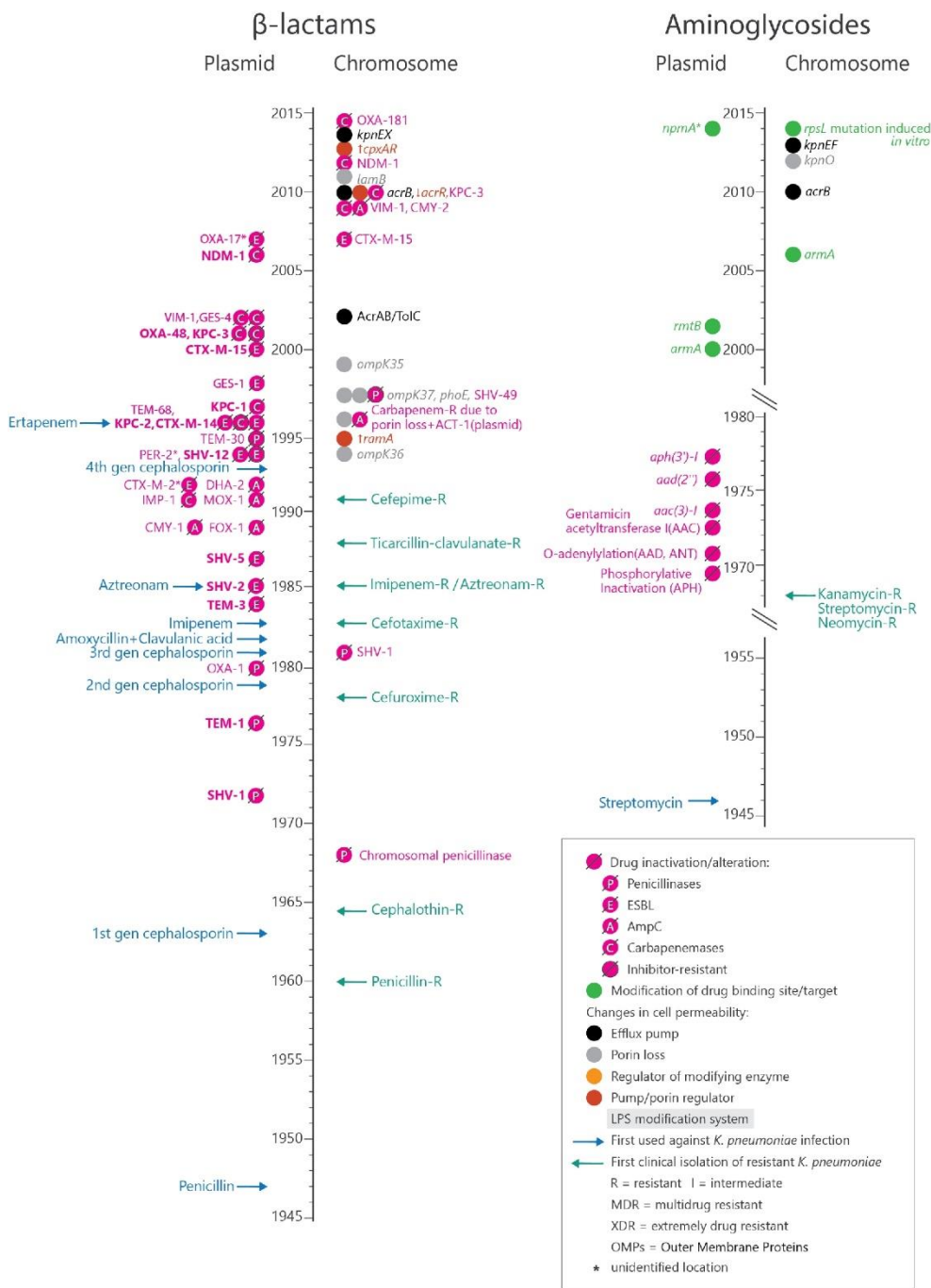
A resistência a polimixina também já foi relatada em *K. pneumoniae*, sendo aplicado um mecanismo cromossômico de alteração do alvo, envolvendo a modificação dos lipolissacarídeos de membrana (LPS). Foi reportado que cepas equipadas com tal sistema alteram a estrutura nativa do LPS, resultando em diminuição da carga aniônica, interferindo na ligação das polimixinas. Essas alterações no LPS são proporcionadas por mutações em

vários genes centrais, responsáveis pela maturação do lipídio A (IpxM e seu regulador ramA) (Clements et al., 2007, DE MAJUMDAR et al., 2015).

Além disso, foram também reportados mudanças na permeabilidade da membrana, sendo relacionados a mecanismos de resistência às quinolonas, incluindo deficiência de OmpK36 e superexpressão de acrAB, este último gene é responsável pela expressão de bombas de efluxo (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1996; MAZZARIOL et al., 2002). Tais mecanismos foram listados de acordo com os genes e cepas envolvidas (Figura 2).

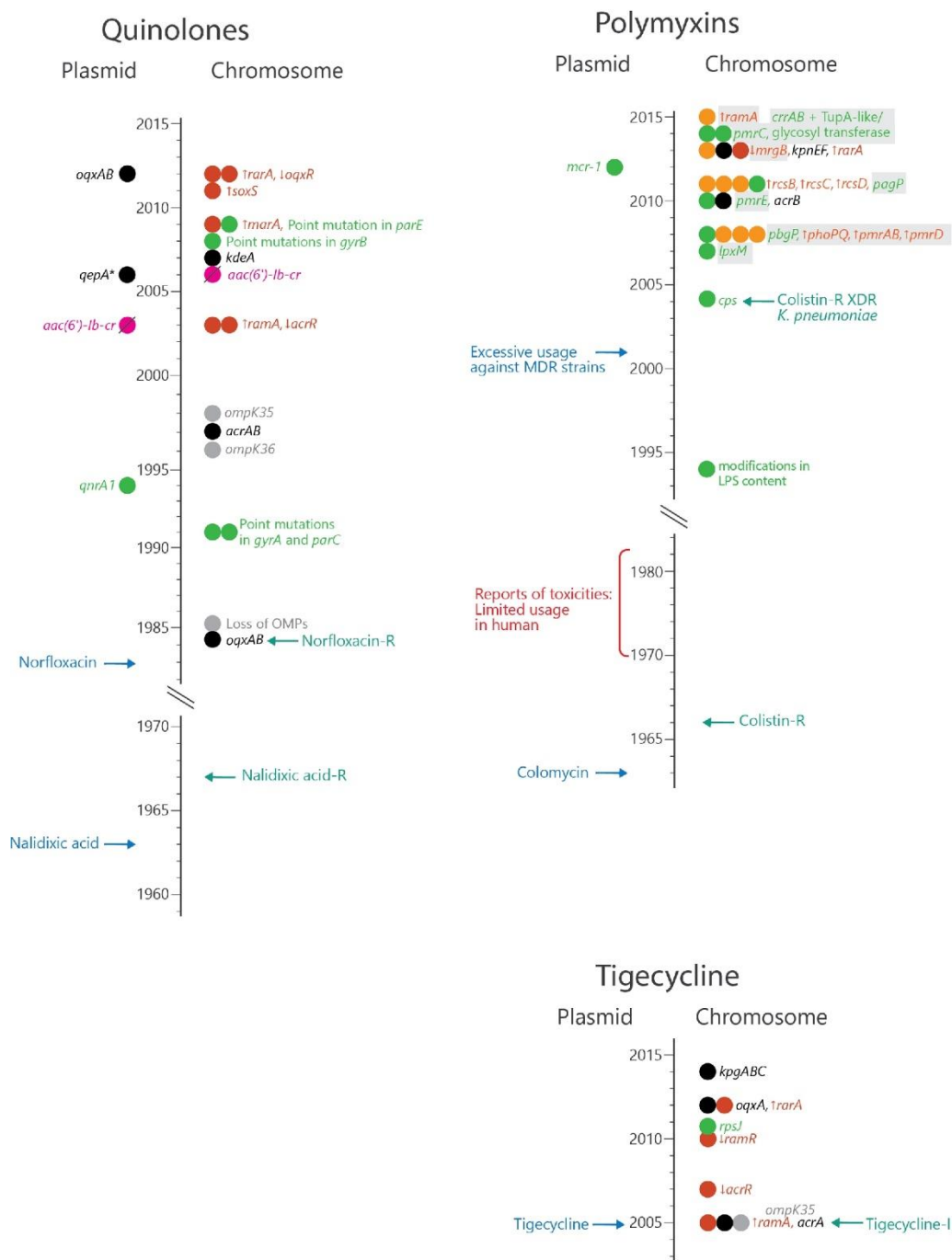
Portanto, verifica-se que a exposição contínua a múltiplos medicamentos levou a uma pressão seletiva constante que levou a mutações constantes adicionais que selecionaram cepas de forma positiva. Tornando tal microrganismo uma preocupação mundial (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATOLLI, 2017).

Figura 2.1 – Genes envolvidos nos mecanismos de resistência em *K. pneumoniae*



Fonte: (Adaptado de NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATOLLI, 2017)

Figura 2.2 Outros genes envolvidos nos mecanismos de resistência em *K. pneumoniae*



Fonte: (Adaptado de NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATOLLI, 2017)

1.3 Peptídeos Antimicrobianos (PAM)

Peptídeos antimicrobianos (PAM) tem se tornado um dos interesses crescentes entre cientistas, profissionais da saúde e empresas farmacêuticas por conta de seu alto potencial terapêutico. Assim, com o grande aumento de microrganismos multirresistentes é preciso adotar novos compostos ativos, sendo os peptídeos antimicrobianos os mais promissores nos últimos 20 anos, desde que já estão presentes na natureza a milhões de anos com o desenvolvimento de resistência bem limitada pelos microrganismos tornando-os muito atraentes em relação aos antibióticos que desenvolvem resistência relativamente rápido (BOPARAI; SHARMA, 2020; RIMA et al., 2021).

É importante ressaltar que os PAM apresentam, em geral, baixa toxicidade em mamíferos, o que os torna potenciais candidatos a medicamentos. (RAMAZI et al., 2022) Além disso, os peptídeos antimicrobianos matam as bactérias principalmente pela disrupção da membrana ou interagindo com componentes celulares ao adentrar as células. Logo, tal modo de ação os tornam menos susceptíveis ao desenvolvimento de mecanismos de resistência (BENFIELD; HENRIQUES, 2020; EL SHAZELY et al., 2020).

1.3.1 Principais características dos PAM

Os peptídeos antimicrobianos são caracterizados por serem proteínas de baixo peso molecular, em geral sendo polipeptídios de sequência de até 60 aminoácidos e normalmente os comprimentos estão entre 15 a 40 aminoácidos. Sua superfície quase sempre é carregada positivamente pela presença de aminoácidos como arginina, lisina e histidina, tendo também a presença de aminoácidos hidrofóbicos. Tal carga positiva induz a formação de estrutura anfipática quando em contato com a membrana celular, garantindo uma atividade antimicrobiana e imunomodulatória contra uma gama de bactérias gram negativas e positivas. Vale ressaltar que embora os peptídeos possuam uma grande variedade, também é possível caracterizá-los de acordo com suas propriedades físico-químicas, como carga líquida, conteúdo estrutural secundário e solubilidade (KANG et al., 2014; BOPARAI; SHARMA, 2020).

A estrutura secundária está ligada ao tipo de atividade observada, assim os PAM são classificados em 4 grupos: lineares, principalmente peptídeos em hélice α ; peptídeos em folha β com dois ou mais pontes dissulfeto; peptídeos lineares estendidos, em geral ricos em resíduos de triptofano, prolina e lisina; e peptídeos cíclicos, formados por uma ponte dissulfeto (HANCOCK; SAHL, 2006). Os peptídeos em hélice α como as magaininas, as cecropinas e as temporinas adotam estruturas aleatórias sem rigidez em solução aquosa, mas sofrem mudanças em um ambiente de membrana hidrofóbica adotando hélices anfipáticas. Peptídeos folha β como defensinas e protegrinas demonstram estruturas mais ordenadas para as quais a rigidez é normalmente dependente da presença de pontes dissulfeto intramolecular. Por outro lado, os outros dois grupos apresentam uma estrutura desordenada (OYSTON et al., 2009).

1.3.2 Mecanismos de ação dos PAMs

Os peptídeos antimicrobianos exercem sua atividade geralmente alterando a permeabilidade da membrana liberando o conteúdo intracelular e levando a morte celular. Assim, a atividade peptídica pode ser descrita por meio de alguns modelos, em específicos incluindo os modelos de barril, toroidal e tapete (ZHANG et al., 2021; HUAN et al., 2020).

O modelo de poro toroidal também é conhecido como modelo buraco de minhoca. Neste mecanismo, a porção hidrofílica dos PAM adsorvem na superfície da membrana por meio da interação com a cabeça polar da membrana lipídica, enquanto que a porção hidrofóbica interage com a cauda apolar. Assim, formam-se agregados com a membrana que impõe o afinamento da membrana, provocado por um dobramento para o interior, induzindo a flexão da bicamada lipídica, formando um poro de aparência toroidal que provoca o extravasamento de conteúdo celular. Exemplos típicos desse modelo são magainina 2 e lacticina Q (OMARDIEN et al., 2018; MIHAJLOVIC; LAZARIDIS, 2010).

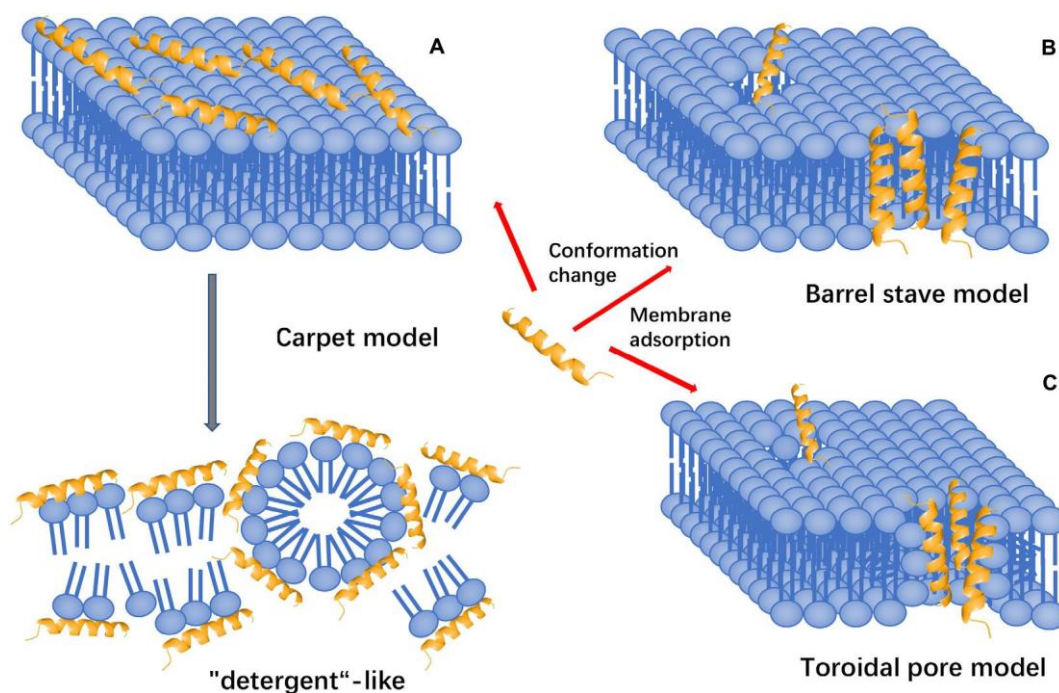
No modelo de barril, os peptídeos antimicrobianos se agregam e penetram na bicamada da membrana celular em forma de multímeros, formando canais iônicos que resultam em um fluxo citoplasmático. Vale ressaltar que os

peptídeos interagem entre si para formar tais canais que irão provocar o extravasamento do conteúdo intracelular. Em casos severos, tal efeito pode provocar o colapso da membrana e induzir a morte celular. A alameticina forma poros usando tal modelo (LOHNER; PROSSNIGG, 2009; LIPKIN; LAZARIDIS, 2014).

No modelo de tapete, os PAMs se dispõem paralelamente à membrana celular. Assim, sua extremidade hidrofílica fica voltada para o meio extracelular e a extremidade hidrofóbica fica voltada para a bicamada fosfolipídica. Os PAMs então cobrem a superfície da membrana de forma similar a um tapete, formando micelas que destroem a membrana celular. No entanto, este mecanismo de formação de poros requer um certo limiar de concentração e a concentração necessária de PAMs é alta. A catelicidina humana LL-37 exibe sua atividade através deste mecanismo (HUAN et al., 2020).

Além de tais mecanismos, existem mecanismos de ação que não tem como alvo a membrana celular, sendo assim os peptídeos antimicrobianos podem entrar nas células ou por via direta ou por endocitose, afetando assim processos celulares essenciais aos microrganismos que podem levar a morte celular. Assim, verificam-se peptídeos antimicrobianos que possuem atividade de inibição da síntese proteica, em que os PAMs afetam a transcrição, tradução e montagem em peptídeos funcionais através do dobramento molecular de chaperonas, interferindo com enzimas relacionadas e moléculas efetoras. Os PAMs também podem interferir na biossíntese de ácidos nucleicos, interferindo em enzimas chave como topoisomerasas. Outro mecanismo relacionado é a inibição de vias metabólicas relacionadas a proteases essenciais. Enquanto que outros peptídeos podem atuar bloqueando a divisão celular e a resposta ao dano em DNA (resposta SOS), interferindo no ciclo celular ou causando falha na separação de cromossomos (HUAN et al., 2020).

Figura 3 – Modelos de ação de Peptídeos antimicrobianos



Fonte: (HUAN et al., 2020)

1.4 Peptídeos antimicrobianos sintéticos

Existem certos problemas e preocupações associadas a aplicação clínica de peptídeos antimicrobianos como toxicidade, imunogenicidade, resistência a medicamentos, atividade hemolítica, baixa estabilidade relacionado a digestão por proteases in vivo, baixa solubilidade e possíveis efeitos colaterais. Principalmente em relação a atividade hemolítica que já foi relatada em muitos peptídeos como indolicidina. Além disso, a aplicação diversa de tais peptídeos exige produções em larga escala, porém as taxas de síntese naturais são baixas e extremamente susceptíveis à degradação por proteases, o que leva a uma baixa biodisponibilidade e baixos rendimentos produtivos. Assim, para ampliar as aplicações clínicas é necessário e importante desenvolver PAMs sintéticos que superem as desvantagens de seus peptídeos naturais e os problemas potenciais para os candidatos a drogas (MORAVEJ et al., 2018; SINHA; SHUKLA, 2019; LEI et al, 2019).

O objetivo na produção de peptídeos sintéticos é maximizar a atividade biológica e a resistência a atividade proteolítica, mantendo uma baixa toxicidade. Assim, podem ser aplicadas algumas metodologias para a produção de tais moléculas, tendo assim alguns parâmetros chave a serem considerados como a sequência, razão hidrofóbica/hidrofílica, carga líquida e estruturas secundárias e terciárias. Sendo o desenho racional a principal metodologia aplicada podendo incorporar vantagens aos peptídeos sintéticos como redução de efeitos colaterais, incorporação de funções secundárias, redução de custos associados a produção e purificação, agregação de funcionalidades que não estão presentes em proteínas originais (TORRES et al., 2019; SOUZA et al., 2020a).

1.4.1 PAMs sintéticos bioinspirados na proteína *Mo-CBP₃*

A proteína *Mo-CBP₃* (18 kDa) é uma proteína de ligação a quitina purificada das sementes de *Moringa oleifera*, sendo caracterizada e avaliada a atividade biológica *in vitro* contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, inibindo a germinação e o crescimento micelial (FREIRE et al., 2015) Tal proteína tem como problema o limitado rendimento de purificação, que ocorre de forma similar com os peptídeos antimicrobianos naturais.

Logo, foi aplicado a metodologia de desenho racional de peptídeos sintéticos, sendo bioinspirado na sequência da proteína *Mo-CBP₃* original, originando três peptídeos sintéticos *Mo-CBP₃-PepI* (CPAIQRCC), *Mo-CBP₃-PepII* (NIQPPCRCC) e *Mo-CBP₃-PepIII* (AIQRCC). Tais peptídeos foram desenhados com a ajuda do software C-PAmP de acesso gratuito (http://bioserver3.bioacademy.gr/Bioserver/C-PAmP/Peptide_index.php). Foram aplicados os parâmetros de carga líquida positiva; baixa massa molecular; índice de Boman $\leq 2,5$; e mínimo de 40% de hidrofobicidade. Todas essas características foram avaliadas através de outra ferramenta, chamada de Banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/>). Por fim, os peptídeos foram analisados por meio de ferramentas *in silico*: iAMPpred tool (<http://cabgrid.res.in:8080/amppred/>), onde é dado um valor entre 0 e 1, correspondente à probabilidade do peptídeo ser antimicrobiano; Cell Penetrating

Peptides (http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/multi_pep.php), que avalia o potencial em alterar a permeabilidade a membrana celular; Predicting antigenic peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>), aplicado para prever o potencial alergênico; Peptide Cutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/), aplicado para prever a estabilidade e localizar possíveis sítios de clivagem por proteases; e o HLP (<http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/help.html>), usado para prever o tempo de meia-vida em ambiente que simula o intestino (OLIVEIRA, J. T. A. et al. , 2019).

1.5 Análise proteômica

A proteômica é uma aplicação que envolve o uso de tecnologias para identificação e quantificação do conteúdo global de proteínas presentes de uma célula, tecido ou organismo. Assim, tal aplicação pode ser usada para diferentes configurações de pesquisa como detecção de vários marcadores de diagnóstico, candidatos para produção de vacinas, compreensão de mecanismos de patogenicidade, alteração de padrões de expressão em resposta a diferentes sinais e interpretação de vias funcionais de proteínas em diferentes doenças (ASLAM et al., 2017).

Tal abordagem permite fornecer uma plataforma abrangente de compreensão de mudanças em vias de proteínas que podem estar associadas com a resistência a antibióticos, de forma a entender melhor o desenvolvimento de mecanismos de resistência, podendo estudar a resposta a componentes antimicrobianos, assim como traçar perfis de adaptabilidade bacteriana (PENG; LI; PENG, 2019; TSAKOU, et al., 2020).

Assim, os estudos em proteômica melhoraram muito a compreensão do mundo microbiano, permitindo estudar proteínas e sua regulação, demonstrando como algumas bactérias patogênicas se adaptaram às ações letais dos antibióticos. Assim, tal ferramenta pode ser aplicada no estudo de microrganismos, dando maior precisão em muitos experimentos (PÉREZ-LLARENA; BOU, 2016).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o mecanismo de ação de um peptídeo sintético bioinspirado na proteína ligante à quitina (*Mo-CBP₃*) de *Moringa oleifera*, contra a bactéria *K. pneumoniae*.

2.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar e estudar os mecanismos de ação, através de técnicas de microscopia de fluorescência e de varredura, após tratamento com o peptídeo *Mo-CBP₃-Pepl*;
- b) Determinar perfil proteico das bactérias *K. pneumoniae* após tratamento com o peptídeo *Mo-CBP₃-Pepl*.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção de material biológico

A bactéria Gram-negativa humana patogênica *K. pneumoniae* (ATCC 10031) foi obtida do Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2 Síntese do peptídeo

O peptídeo sintético Mo-CBP3-PepI (CPAIQRCC) foi desenhado, aplicando-se ferramentas preditivas de bioinformática e modelagem molecular (OLIVEIRA, J. T. A. et al. , 2019) sendo sintetizado quimicamente pela empresa ChemPeptide (Shanghai, China), onde sua pureza e qualidade foram testadas por espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.

3.3 Viabilidade celular por ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

Foi realizado o ensaio de viabilidade celular (SOUZA et al., 2020b) aplicando-se alguns ajustes. Foi realizado o ensaio antimicrobiano para cultivo celular, sendo aplicado cerca de 5 mL de meio de cultura Mueller Hinton (KASVI) com células bacterianas em suspensão, sendo incubado por 24 horas a 37 °C (OLIVEIRA et al., 2019) em microplacas de 96 poços, os poços contendo as células tratadas (solução peptídica com concentração de 50 µg.mL⁻¹) e as células de controle (50 µL) foram incubados por 3h no escuro a 37 °C com 50 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (2 mg mL⁻¹, MTT). Após a incubação, 100 µL de DMSO a 100% foram adicionados aos poços e a placa foi agitada lentamente para dissolver os cristais de formazana. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas (Epoch, BioTek), com comprimento de onda de 495 nm. Os controles utilizados para este ensaio foram 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) preparado em solução salina 0,15M e ciprofloxacina (1000 µg.mL⁻¹) preparada em etanol 5% em solução salina estéril.

3.4 Ensaio antibiofilme

O ensaio antibiofilme foi realizado em microplacas de 96 poços. Uma única colônia de *K. pneumoniae* foi coletada e utilizada como inóculo para 5mL de caldo Mueller Hinton, que foi incubado por 24h no escuro, a 37°C. Em sequência, a densidade óptica da suspensão de células foi medida usando um leitor de microplacas (Epoch, BioTek) e ajustada para 0,1 com caldo Mueller Hinton. Para a inibição da formação de biofilme, 50 µL da suspensão de células foram incubados com 50 µL da solução peptídica (50 µg.mL⁻¹) e com 50 µL dos respectivos controles descritos em 3.3. A incubação durou 48h a 37 °C. Para o ensaio de degradação do biofilme, 50 µL da suspensão de células foram incubados sozinhos por 24h a 37 °C. Após isso, 50 µL da solução peptídica (50 µg.mL⁻¹) e os respectivos controles foram adicionados aos poços contendo o biofilme pré-formado e incubados novamente por mais 24h a 37 °C. Após a incubação, ambos os poços de inibição da formação de biofilme e degradação de biofilme foram lavados uma vez com solução salina estéril. Em seguida, os poços foram fixados com 100 µL de metanol 99% por 15 min. Após, o metanol foi removido e as placas foram secas a 37 °C. Após isso, os poços foram corados com 200 µL de solução de cristal violeta a 0,1% por 20 min. Na sequência, os poços foram lavados três vezes com água destilada. Por fim, os cristais que coraram o biofilme foram diluídos com 200 µL de ácido acético a 33% e foi realizada a medição da densidade óptica usando um comprimento de onda de 600 nm. O ensaio foi feito em triplicata.

3.5 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO POR MICROSCOPIA

3.5.1 Integridade da membrana celular (iodeto de propídio)

A preparação da suspensão de células foi feita como mencionado em 3.3. Após, 50 µL da solução bacteriana diluída foi incubada no escuro por 24h, a 37°C, com 50 µL da solução peptídica [50 µg.mL⁻¹] previamente preparada com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) diluído em NaCl 0,15M. O ensaio foi realizado em microtubos de 1,5 mL. Para o controle, a solução de bactérias diluída foi incubada apenas com a solução de DMSO-NaCl. Após o tempo de incubação, os microtubos foram centrifugados (5000 g, 5 min, 4 °C) e lavados três vezes. Em seguida, as células lavadas foram incubadas com iodeto de

propídio 10 μ M por 30 min, no escuro, a 37 °C. Após isso, as células foram lavadas duas vezes com solução salina para remover o excesso de fluoróforo, e as células foram observadas com um microscópio de fluorescência (Olympus System BX 60; comprimento de onda de excitação, 490 nm; comprimento de onda de emissão, 520 nm).

3.5.2 Detecção da superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Este ensaio foi realizado da mesma forma que na seção anterior, mas com alguns ajustes. A preparação da suspensão de células e o ensaio antimicrobiano foram feitos da mesma forma descrita em 3.3. Após as três rodadas de centrifugação e lavagens, as células foram incubadas com 1 mM de 2,7 – diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) por 30 min, no escuro, a 37°C. Após as lavagens, as células foram observadas também sob um microscópio de fluorescência (Olympus System BX60; comprimento de onda de excitação, 488 nm; comprimento de onda de emissão, 525 nm).

3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

Após o tratamento das células com a solução peptídica, conforme descrito acima, as células foram centrifugadas (5000 g, 5 min, 4 °C), o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas e fixadas por 5h em uma solução de fixação (2,5% glutaraldeído [v/v] em tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH: 7,2). Após centrifugações como descrito acima, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH: 7,2. Para desidratação, as amostras foram incubadas com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 100%, 100% v/v) por 10 min cada e centrifugação conforme descrito acima após cada tempo de incubação. Para completar a desidratação, as amostras foram incubadas com 50/50 etanol/hexametildissilazano (HMDS) por 10 min e centrifugadas, e em seguida o pellet foi lavado com 100% HMDS e transferido para uma lamínula para secar. Após a secagem completa, as lamínulas foram montadas em stubs, revestidas com camada de ouro de 20 nm usando uma máquina de revestimento PET

(EMITECH - Q150TES, Quorum Technologies, Inglaterra), e as análises feitas com um Microscópio Eletrônico de Varredura Inspect™ 50 FEI (Oregon EUA), equipado com um detector de baixa energia (detector EverhartThornley), usando uma tensão de feixe de aceleração de 20.000 kV e ampliação do detector de 20.000x.

3.6 Análise proteômica

3.6.1 Extração de proteínas

Inicialmente, um ensaio antibacteriano foi realizado dentro de 24 horas de incubação, utilizando a melhor concentração inibitória de Mo-CBP3-Pepl de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ como referido na seção 3.3. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, com centrifugações a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em 300 μL no mesmo tampão e congeladas por 24 horas. Em seguida, as amostras congeladas foram sonicadas por 30 minutos para quebrar a parede celular e a membrana. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante foi coletado.

Em seguida, foi realizado o ensaio de quantificação de proteínas (BRADFORD,1976), de modo a determinar a concentração proteica nas amostras. Esta etapa foi seguida pela adição de uma solução de DTT 10 mM sob incubação por 1 hora a 37 ° C para reduzir as proteínas. Em seguida, iodoacetamida foi adicionada a uma concentração final de 15 mM e incubada por 30 minutos em uma sala escura para alquilar as proteínas reduzidas. As proteínas reduzidas e alquiladas foram digeridas com tripsina ouro (Promega, EUA) até uma concentração final de 1:20 (p/p) conforme descrito pelo fabricante. A digestão com tripsina foi realizada por 16 horas a 37°C. Finalmente, as amostras foram secas à vácuo (Eppendorf, Alemanha) por 3 horas e analisadas pelo espectrômetro de massa ESI-QUAD-TOF.

3.6.2 Identificação de proteínas

Os espectros de massa em tandem foram extraídos em arquivos PKL, e as proteínas foram pesquisadas usando a pesquisa de íons MASCOT MS/MS da MATRIX SCIENCE

(https://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS) contra os bancos de dados UP625_E_coli_K12 (AA), UP808_M_pneumoniae e SwissProt (a taxonomia foi definida em bactérias). Os parâmetros para a busca foram: modificações fixas para carbamidoetila (C); modificações variáveis de Oxidação (O); a tolerância do Peptídeo foi ajustada para 1,2 DA (com 1% FDR); a tolerância MS/MS foi ajustada para 0,6 DA; a carga peptídica foi ajustada para 2+,3+ e 4+; e finalmente o instrumento foi ajustado para ESI-QUAD-TOF. As proteínas identificadas em ambas as amostras foram pesquisadas no UNIPROT e separadas em 3 conjuntos (exclusivo de controle, exclusivo de células tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl e proteínas compartilhadas entre ambas as amostras).

As proteínas com um valor de fold change $\geq 1,5$ ($p < 0,05$, teste de Tukey) acumuladas para cima (aumentando sua abundância) e proteínas com um valor de fold change $\leq 0,5$ ($p < 0,05$, teste de Tukey) acumuladas para baixo (diminuindo sua abundância) foram levadas em consideração para comparações. Para cada proteína foi baixado seu arquivo FASTA correspondente. Em seguida, o programa blast2go (<https://www.blast2go.com/>) foi utilizado para categorizar as proteínas detectadas pela anotação Gene Ontology (GO) de acordo com a função molecular, atividade biológica e localização subcelular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade antibiofilme e viabilidade celular

Mo-CBP3-Pepl apresentou uma baixa atividade antibiofilme, com inibição de apenas 11%. Enquanto que não se observou atividade de degradação do biofilme formado após 48 horas (Tabela 1). Vale ressaltar que foi utilizado a concentração inibitória mínima (MIC_{50}) de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Quanto a viabilidade celular, foi observado um decréscimo de mais de 52% da viabilidade celular após o tratamento com o peptídeo (Tabela 1), indicando uma atividade que leva a morte celular.

Tabela 1 - Atividade antibiofilme e viabilidade celular

^a MIC ₅₀ de <i>Mo</i> -CBP ₃ -PepI contra <i>K. pneumoniae</i>			
Tratamentos	Potencial antibiofilme		
	Viabilidade celular (%)	Inibição da formação do biofilme (%)	Degradação do biofilme pré-formado (%)
DMSO	100 ± 0.005	0	0
<i>Mo</i> -CBP ₃ -PepI	47.54 ± 0.008	11.87 ± 0.001	0

Fonte: elaborado pelo autor

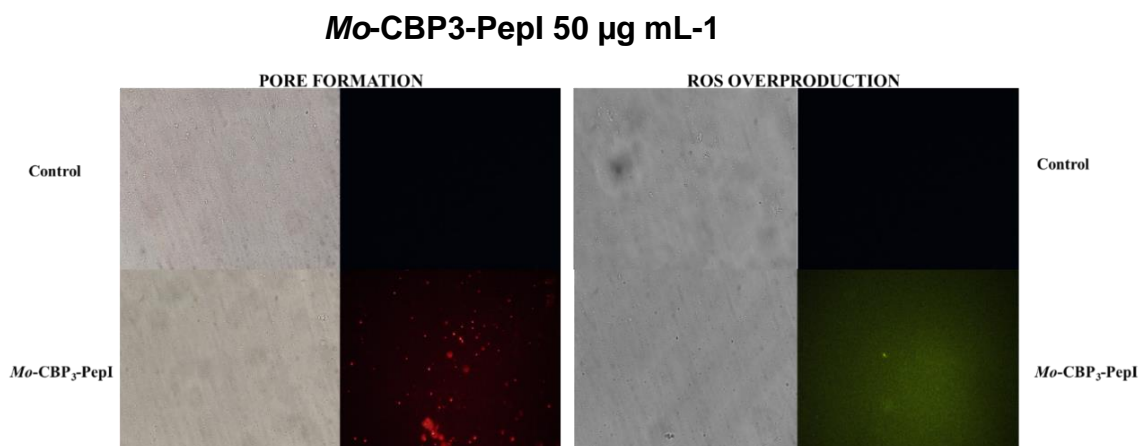
Tal peptídeo sintético já apresentou atividade de inibição no crescimento de algumas bactérias (OLIVEIRA et al.,2019). Além disso, foi observado uma baixa atividade antibiofilme, visto que tais estruturas não são tão sensíveis a atividade antimicrobiana (COSTERTON, 1999), embora já se tenha observado e estudado mecanismos de ação que levam a inibição e degradação do biofilme (YASIR; WILLCOX; DUTTA, 2018). O ensaio de MTT reflete diretamente na viabilidade celular e tal ensaio tem como parâmetro avaliar a atividade metabólica das enzimas oxidorreduções celulares dependentes de NAD(P)H, tais enzimas tem a capacidade de reduzir o corante tetrazólio em cristais de formazana, sendo insolúvel e caracterizado pela coloração azul(MERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011). Logo, ao se observar o decréscimo da densidade óptica, se verifica uma atividade antimicrobiana que leva a morte celular, visto que se observou uma redução em tal atividade enzimática.

4.2 Mecanismos de ação por microscopia de fluorescência

Para elucidar os mecanismos de ação foram feitas análises por microscopia de fluorescência utilizando os fluoróforos iodeto de propídio (PI) e Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA). Sendo demonstrado os efeitos do tratamento com o peptídeo sintético *Mo*-CBP₃-PepI (Figura 4). É possível verificar nos campos escuros o aparecimento das respectivas fluorescências. No caso do iodeto de propídio, se verifica o aparecimento de pontos vermelhos por toda a superfície da lâmina, o que não se observa no

controle, indicando uma possível alteração na permeabilidade da membrana celular das bactérias. Assim, a aplicação do fluoróforo acoplado a análise de microscopia permite entender quais os mecanismos de ação do peptídeo testado. Tal fluoróforo tem como função emitir fluorescência vermelha quando ocorre a sua ligação com as moléculas de DNA. Porém, moléculas de Iodeto de propídio não são permeáveis a membrana celular bacteriana em estado saudável, sendo possível observar a ligação apenas quando há alterações na permeabilidade da membrana, como por exemplo a formação de poro, portanto tornando sua aplicação muito interessante para uso em análise de mecanismo de ação de moléculas antimicrobianas (RAJA et al., 2011). Logo, ao verificar tais resultados é possível apontar que o peptídeo leva a alterações na membrana celular bacteriana, alterando sua estrutura nativa.

Figura 4 – Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos após o tratamento com o peptídeo *Mo*-CBP3-PepI. Verifica-se campo claro á esquerda e campo escuro á direita. Ambas as lâminas foram tratadas da mesma forma, observando-se controle seguido a baixo do tratamento com peptídeo sintético.



Fonte: Elaborado pelo autor

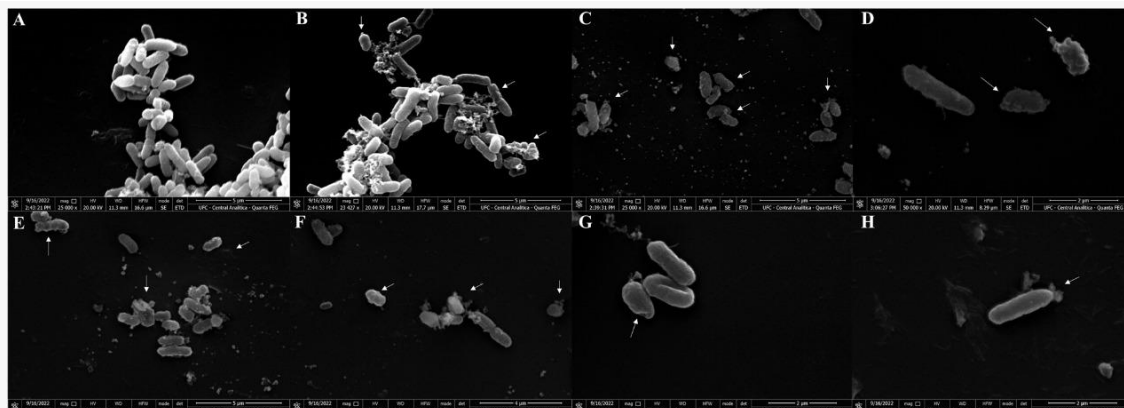
O fluoróforo Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA) é um indicativo do estresse oxidativo provocado pelo tratamento com peptídeo sintético, já sendo apontando em outros estudos na literatura, tal mecanismo de ação induz a rápida formação de espécies reativas de oxigênio após a entrada no periplasma, mas antes da permeabilização da membrana citoplasmática.

Como observado no peptídeo antimicrobiano LL-37, a presença de tais moléculas pode induzir a morte celular (CHOI; YANG; WEISSHAR, 2017). Tal reagente não fluorescente é permeável a membrana, ao atravessar é desacetilado em dicloro-dihidro-fluoresceína por estereases, posteriormente sendo oxidado por espécies reativas de oxigênio, formando dicloro-fluoresceína que irá emitir uma fluorescência detectável. Logo observou-se que o efeito ocorreu em um pequeno agregado de células, o que não pode ser observado no controle, sendo assim um indicativo da indução da super produção de espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com o peptídeo sintético de estudo.

4.3 Mecanismos de ação por microscopia eletrônica de varredura

As análises por microscopia eletrônica de varredura já foram utilizadas anteriormente para verificar efeitos e alterações na ultraestrutura da membrana de bactérias induzida por peptídeos antimicrobianos, visto que observar tais alterações na integridade da membrana bacteriana por microscopia eletrônica podem ajudar a esclarecer os mecanismos detalhados de morte celular (HARTMANN et al., 2010). Essa análise foi executada no presente trabalho com o objetivo de verificar possíveis alterações e evidenciar esse mecanismo de ação do peptídeo em torno da membrana ou parede celular (Figura 5).

Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura, demonstrando os efeitos após o tratamento com peptídeo sintético antimicrobiano ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). (A) controle com DMSO, (B-H) indica as alterações após o tratamento com o peptídeo *Mo*-CBP3-PepI



Fonte: Elaborado pelo autor

Ao se comparar o controle, que demonstra a conformação nativa de uma membrana saudável (Figura 5A), com o tratamento (Figura 5B-G) é possível evidenciar alterações notáveis na superfície da bactéria, com alterações estruturais visíveis com deformações similares observadas em diferentes perspectivas, destacando-se até mesmo extravasamento de conteúdo intracelular (Figura 5H). Tal resultado corrobora com aquilo verificado nas análises de microscopia de fluorescência com o fluoróforo iodeto de propídio, confirmando que um dos mecanismos de ação do peptídeo *Mo*-CBP3-PepI envolve a indução de danos na membrana que podem levar até mesmo ao extravasamento de conteúdo intracelular, levando a morte celular. Portanto, comprovando um dos mecanismos de ação mais intrínsecos a aplicação de peptídeos sintéticos antimicrobianos.

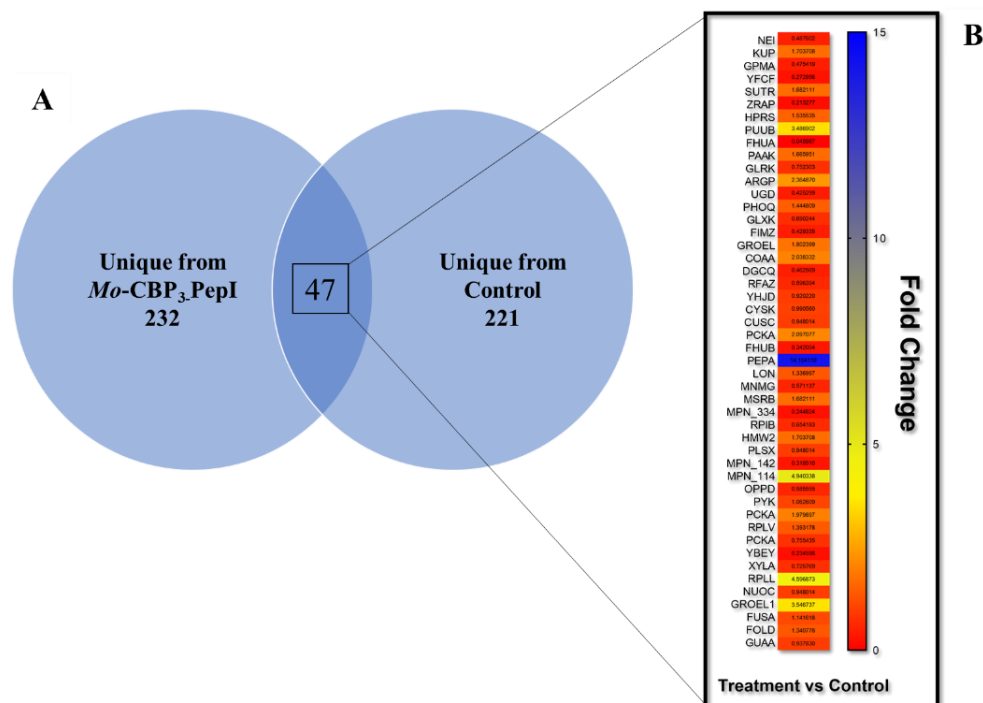
4.4 Análise proteômica

4.4.1 Visão geral

A análise proteômica foi empregada para ter uma visão geral da mudança na expressão de proteínas de *K. pneumoniae* após o tratamento com *Mo*-CBP3-PepI, utilizando a concentração referida acima. No total, 547 proteínas

foram identificadas (Figura 6). Destas, 279 proteínas foram identificadas em células de *K. pneumoniae* tratadas com Mo-CBP3-Pepl e 268 de células controle de *K. pneumoniae* (Figura 6A). No entanto, as células de *K. pneumoniae* tratadas com Mo-CBP3-Pepl apresentaram 232 proteínas únicas identificadas apenas neste grupo e 221 proteínas únicas nas células controle de *K. pneumoniae* (Figura 6A). Além das proteínas únicas, que são aquelas encontradas exclusivamente em um grupo, foram detectadas proteínas em ambos os grupos (Tabela 2). Para entender os padrões de acúmulo diferencial dessas proteínas, foi aplicada uma regra de mudança de dobra levando em consideração a intensidade das proteínas expressas após tratamento com Mo-CBP3-Pepl/Controle *K pneumoniae*. Proteínas com um valor de mudança de dobra $\geq 1,5$ ($p < 0,05$, teste de Tukey) foram consideradas hiperexpressas (aumentaram a abundância) e proteínas com um valor de mudança de dobra $\leq 0,5$ ($p < 0,05$, teste de Tukey) foram consideradas hipoexpressas (diminuindo a abundância). Foram identificadas 47 proteínas comuns a ambos os grupos, 19 acumuladas para cima, 19 acumuladas para baixo e 9 não se alteraram nas células tratadas com Mo-CBP3-Pepl quando comparadas com as células controle (Figura 6B).

Figura 6 – Distribuição de Venn e mapa de calor das proteínas. O gráfico demonstra a distribuição numérica das proteínas em ambos os tratamentos, assim como as proteínas compartilhadas são mostradas de acordo com o escore de mudança dobra (Fold-change) em um mapa de calor.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2 – Proteínas identificadas expressas em ambas as amostras

Nome da proteína	ID (Uniprot)	Organismo de referência	Compartimento celular	Fold Change <i>Mo-CBP₃-PepI</i> vs. DMSO (Controle)
<u>Metabolismo de DNA</u>				
Endonuclease 8	P50465	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.487
<u>Regulação da transcrição</u>				
HTH-type transcriptional regulator SutR	P77626	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	2.566
HTH-type transcriptional regulator ArgP	P0A8S1	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	2.364
Fimbriae Z protein	P0AEL8	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.690

Transportadores de membrana

Low affinity potassium transport system protein kup	P63183	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane	1.704
Ferrichrome outer membrane transporter/phage receptor	P06971	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane	1.063
Cation efflux system protein CusC	P77211	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	cell outer membrane	0.920
Iron (3+)-hydroxamate import system permease protein FhuB	P06972	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane	0.948

Resposta ao estresse e Defesa

Zinc resistance-associated protein	P0AAA9	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasm space	1.682
Chaperonin GroEL	P0A6F5	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	1.444
Undecaprenyl-diphosphatase	Q2KX31	<i>Bordetella avium</i> (strain 197N)	Plasma membrane	1.340
Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	P75129	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm	14.104
Periplasmic trehalase	Q4UZ12	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (strain 8004)	Periplasmic space	0.937
Lon protease	P78025	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm	0.342

Metabolismo energético

2.3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	P62707	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.519
Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase	P37906	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.985

2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase	P17109	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane	3.486
UDP-glucose 6-dehydrogenase	P76373	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.902
Glycerate 3-kinase	P77364	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.745
Phenylacetate-coenzyme A ligase	P76085	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	1.666
Pantothenate kinase	P0A6I3	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.548
Pyruvate kinase	P78031	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Membrane	3.139
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	A8AQV7	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.990
Xylose isomerase	B5ZQV6	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (strain WSM2304)	Cytoplasm	1.062
Bifunctional protein FOLD	Q88WM8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (strain ATCC BAA-793 / NCIMB 8826 / WCFS1)	Periplasmic space	0.726
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	Q6APU2	<i>Desulfotalea psychrophila</i> (strain LSv54 / DSM 12343)	Cytoplasm	4.596
Sensor histidine kinase GlrK	P52101	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell inner membrane	0.752
Sensor protein PhoQ	P23837	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane	0.823
Putative ABC transporter ATP-binding protein MPN_334	P75444	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane	1.336
Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	P75552	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane	0.948
Pantothenate synthetase	B8I2Z3	<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i> (strain ATCC 35319 / DSM 5812 / JCM 6584 / H10)	Cytoplasm	1.142

Patogenicidade

Lipopolysaccharide core biosynthesis protein RfaZ	P27241	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	2.038
Inner membrane protein YhjD	P37642	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane	0.462

Metabolismo e Biossíntese de proteínas

50S ribosomal protein L22	A5IYY1	<i>Mycoplasmopsis agalactiae</i>	Large ribosomal subunit	0.387
50S ribosomal protein L7/L12	P0A466	<i>Aquifex aeolicus</i> (strain VF5)	Large ribosomal subunit	1.979

Diaminopimelate decarboxylase	Q8K9C4	<i>Buchnera aphidicola</i> subsp. <i>Schizaphis graminum</i> (strain Sg)	Cytoplasm	3.546
Cysteine synthase A	P0ABK5	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.596
<u>Fatores de regulação e Processamento de RNA</u>				
tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG	P75221	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm	0.487
Elongation factor G	Q7NAV3	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> (strain R(low / passage 15 / clone 2))	Cytoplasm	0.234
Methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase TrmFO	A4WRQ2	<i>Cereibacter sphaeroides</i> (strain ATCC 17025 / ATH 2.4.3)	Cytoplasm	0.948
<u>Organização e manutenção estrutural da parede celular</u>				
Cytadherence high molecular weight protein 2	P75471	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm	1.682
Mgp-operon protein 3	Q50341	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane	0.654
<u>Transferase</u>				
Glutathione S-transferase YfcF	P77544	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm	0.273
Phosphate acyltransferase	P75232	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm	3.096
Sensor histidine kinase HprS	P76339	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane	0.213
<u>Desconhecido</u>				
Probable cytosol aminopeptidase	P75206	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm	2.097
Putative acetyltransferase MPN_114	P75448	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Unknown	1.703

Tabela 3 – Proteínas identificadas expressas somente após o tratamento com o peptídeo *Mo*-CBP3-Pepl

Nome da proteína	ID (Uniprot)	Organismo de referência	Compartimento celular
<u>Metabolismo de Carboidratos</u>			
3-dehydro-D-guloside 4-epimerase	P76044	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
D-xylonate dehydratase YjhG	P39358	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Apulose kinase	Q6D5T8	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (strain SCRI 1043 / ATCC BAA-672)	Cytoplasm
<u>Metabolismo de lipídios</u>			
7alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	P0AET8	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	P0A9Q5	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Fatty acid oxidation complex subunit alpha	P21177	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
3-ketoacyl-CoA thiolase	Q48GW4	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> (strain 1448A / Race 6)	Cytoplasm
Lipid-A-disaccharide synthase	B7V7U5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain LESB58)	Cytoplasm
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Q1GYU3	<i>Methylobacillus flagellatus</i> (strain KT)	Plasma membrane

		/ ATCC 51484 / DSM 6875)	
3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	B9DY11	<i>Clostridium kluyveri</i> (strain NBRC 12016)	Cytoplasm
4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase 1	Q47G67	<i>Dechloromonas</i> <i>aromatica</i> (strain RCB)	Cytoplasm

Processos redox e homeostase celular

Hydroxylamine reductase	P75825	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Periplasmic serine endoprotease DegP	P0C0V0	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Protein-methionine-sulfoxide reductase catalytic subunit MsrP	P76342	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
Catalase-peroxidase	Q1GCU3	<i>Ruegeria sp.</i> (strain TM1040)	Cytoplasm

Resposta ao estresse e defesa

Probable L,D-transpeptidase YcbB	P22525	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Zinc resistance-associated protein	P0AAA9	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
Chaperone protein HtpG	P0A6Z3	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Co-chaperonin GroES	B5F2K9	<i>Salmonella agona</i> (strain SL483)	Cytoplasm
ATP-dependent Clp protease ATP- binding subunit ClpX	Q2RU44	<i>Rhodospirillum</i> <i>rubrum</i> (strain ATCC 11170 / ATH 1.1.1 / DSM 467 / LMG	Cytoplasm

4362 / NCIMB 8255
/ S1)

Chaperone protein DnaJ	Q5FGQ8	<i>Ehrlichia ruminantium</i> (strain Gardel)	Cytoplasm
------------------------	--------	--	-----------

Metabolismo energético

Multiphosphoryl transfer protein 1	P77439	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnG	P16685	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	P45568	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Aspartate ammonia-lyase	Q8XDS0	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Cytoplasm
Trehalose synthase	Q1ARU5	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> (strain DSM 9941 / NBRC 16129 / PRD-1)	Cytoplasm
Cytochrome bc1 complex Rieske iron-sulfur subunit	Q9X807	<i>Streptomyces coelicolor</i> (strain ATCC BAA-471 / A3(2) / M145)	Plasma membrane
Fructose-1,6-bisphosphatase class 1 2	B2JVN8	<i>Paraburkholderia phymatum</i> (strain DSM 17167 / CIP 108236 / LMG 21445 / STM815)	Cytoplasm
1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB	A7FNX5	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Cytoplasm

		<i>serotype O:1b</i> (strain IP 31758)	
ATP synthase subunit a	Q4FPE9	<i>Pelagibacter ubique</i> (strain HTCC1062)	Plasma membrane
Glycogen synthase	B1I4F5	<i>Desulforudis audaxviator</i> (strain MP104C)	Cytoplasm
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	P09062	<i>Pseudomonas putida</i>	Cytoplasm
Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	A5CS38	<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> (strain NCPPB 382)	Plasma membrane
Enolase	Q98Q50	<i>Mycoplasmopsis pulmonis</i> (strain UAB CTIP)	Extracellular
<hr/>			
NAD kinase	Q39JD3	<i>Burkholderia lata</i> (strain ATCC 17760 / DSM 23089 / LMG 22485 / NCIMB 9086 / R18194 / 383)	Cytoplasm
<u>Metabolismo de DNA</u>			
UvrABC system protein B	P0A8F8	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
DNA-3-methyladenine glycosylase 2	P04395	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
UvrABC system protein A	P0A698	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Probable endonuclease 4	P75457	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain	Cytoplasm

		ATCC 29342 / M129)	
UvrABC system protein C	Q5P080	<i>Aromatoleum aromaticum</i> (strain EbN1)	Cytoplasm
DNA recombination protein RmuC	P0AG71	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
Prophage integrase IntA	P32053	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvA	P75243	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Tyrosine recombinase XerD	Q88MV0	<i>Pseudomonas putida</i> (strain ATCC 47054 / DSM 6125 / CFBP 8728 / NCIMB 11950 / KT2440)	Cytoplasm

Organização e manutenção estrutural de parede celular

Soluble lytic murein transglycosylase	P0AGC3	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacB	P24228	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
Cell shape-determining protein MreB	P0A9X4	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Probable L,D-transpeptidase ErfK/SrfK	P39176	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
Cell shape-determining protein MreC	P16926	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Membrane-bound lytic murein transglycosylase A	P0A935	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane

Murein tetrapeptide carboxypeptidase	P76008	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Murein DD-endopeptidase MepH	P76190	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
Bifunctional protein GlmU	Q0BSR5	<i>Granulibacter bethesdensis</i> (strain ATCC BAA-1260 / CGDNIH1)	Cytoplasm
Sensor protein LytS	Q5HLG3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (strain ATCC 35984 / RP62A)	Plasma membrane
UDP-N-acetylglucosamine 1- carboxyvinyltransferase	A8GW63	<i>Rickettsia bellii</i> (strain OSU 85-389)	Cytoplasm
Undecaprenyl-phosphate alpha- N-acetylglucosaminyl 1- phosphate transferase	Q9X1N5	<i>Thermotoga maritima</i> (strain ATCC 43589 / DSM 3109 / JCM 10099 / NBRC 100826 / MSB8)	Plasma membrane
D-alanine--D-alanine ligase	Q3IFY2	<i>Pseudoalteromonas</i> <i>translucida</i> (strain TAC 125)	Cytoplasm
Inner membrane protein YdcZ	P76111	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Flagellar basal-body rod protein FlgG	P24500	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	Unknown
Flagellin	Q06968	<i>Salmonella berta</i>	Extracellular
Cell division protein FtsZ	P0A9A6	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Probable septum site-determining protein MinC	Q63RS4	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (strain K96243)	Cytoplasm
Cytadherence high molecular weight protein 3	Q50360	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	cytoplasm

Metabolismo e Biossíntese de proteínas

50S ribosomal protein L3	P60438	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Ribosome
30S ribosomal protein S17	P0AG63	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
50S ribosomal protein L4	P75579	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Ribosome
30S ribosomal protein S2	A1TN69	<i>Acidovorax citrulli</i> (strain AAC00-1)	Cytoplasm
50S ribosomal protein L14	A9BH95	<i>Petrotoga mobilis</i> (strain DSM 10674 / SJ95)	Ribosome
30S ribosomal protein S11	A3N380	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 5b</i> (strain L20)	Ribosome
30S ribosomal protein S5	Q5P315	<i>Aromatoleum aromaticum</i> (strain EbN1)	Small ribosomal unit
30S ribosomal protein S6	Q3JEJ6	<i>Nitrosococcus oceani</i> (strain ATCC 19707 / BCRC 17464 / JCM 30415 / NCIMB 11848 / C-107)	Ribosome
30S ribosomal protein S3	Q8R7W0	<i>Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis</i> (strain DSM 15242 / JCM 11007 / NBRC 100824 / MB4)	Ribosome
50S ribosomal protein L28	Q5PAC9	<i>Anaplasma marginale</i> (strain St. Maries)	Ribosome
50S ribosomal protein L24	A9KJI3	<i>Lachnoclostridium phytofermentans</i> (strain ATCC 700394 / DSM 18823 / ISDg)	Ribosome
Chromophore lyase CpcS/CpeS 2	Q10XT3	<i>Trichodesmium erythraeum</i> (strain IMS101)	Cytoplasm

Aspartate aminotransferase	P00509	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
D-amino acid dehydrogenase	P0A6J5	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Bifunctional protein TrpGD	P00904	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Elongation factor P--(R)-beta-lysine ligase	B7LC16	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
4-aminobutyrate aminotransferase PuuE	P50457	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Acetolactate synthase isozyme 1 large subunit	P08142	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Cystathionine gamma-synthase	P00935	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Glutamate synthase [NADPH] large chain	P09831	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Glutamate decarboxylase beta	P69910	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Ornithine carbamoyltransferase	A7ZVD3	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Cytoplasm
Aspartate aminotransferase	Q56114	<i>Salmonella typhi</i>	Cytoplasm
GMP synthase [glutamine- hydrolyzing]	A3MZV8	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 5b (strain L20)	Cytoplasm
Chorismate synthase	Q1QQ46	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> (strain DSM 10229 / NCIMB 13809 / X14)	Cytoplasm
3-dehydroquinate dehydratase	B4RCS3	<i>Phenylobacterium zucineum</i> (strain HLK1)	Cytoplasm
Diaminopimelate epimerase	A1SAP5	<i>Shewanella amazonensis</i> (strain ATCC BAA-1098 / SB2B)	Cytoplasm
Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ	Q81M96	<i>Bacillus anthracis</i>	Cytoplasm
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	A9HE99	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (strain ATCC 49037 / DSM 5601 / CCUG)	Cytoplasm

		37298 / CIP 103539 / LMG 7603 / PA15)	
Tryptophan synthase beta chain	Q13EQ2	<i>Rhodospseudomonas palustris</i> (strain BisB5)	Cytoplasm
Acetolactate synthase large subunit IlvB1	P9WG41	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (strain ATCC 25618 / H37Rv)	Cytoplasm
Glycine--tRNA ligase beta subunit	A4J7C9	<i>Desulfotomaculum reducens</i> (strain MI-1)	Cytoplasm
o-succinylbenzoate synthase	Q838J7	<i>Enterococcus faecalis</i> (strain ATCC 700802 / V583)	Cytoplasm
Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))	Q17X66	<i>Helicobacter acinonychis</i> (strain Sheeba)	Cytoplasm
Glycine cleavage system H protein	A3QHI1	<i>Shewanella loihica</i> (strain ATCC BAA-1088 / PV-4)	Cytoplasm
Cysteine synthase A	P0ABK6	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Cytoplasm
Diaminopimelate decarboxylase	Q8K9C4	<i>Buchnera aphidicola subsp.</i> <i>Schizaphis graminum</i> (strain Sg)	Cytoplasm
3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyltransferase	B2U886	<i>Ralstonia pickettii</i> (strain 12J)	Cytoplasm
Histidinol-phosphate aminotransferase	B9KDN6	<i>Campylobacter lari</i> (strain RM2100 / D67 / ATCC BAA-1060)	Cytoplasm
Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxT	Q9KGN5	<i>Alkalihalobacillus halodurans</i> (strain ATCC BAA-125 / DSM 18197 / FERM 7344 / JCM 9153 / C-125)	Cytoplasm
Kynurenine formamidase	Q2T0N2	<i>Burkholderia thailandensis</i> (strain ATCC 700388 / DSM 13276 / CIP 106301 / E264)	Cytoplasm
Cytosol non-specific dipeptidase	P15288	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Dipeptidyl carboxypeptidase	P24171	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm

ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	Q928C4	<i>Listeria innocua</i> serovar 6a (strain ATCC BAA-680 / CLIP 11262)	Cytoplasm
Protease HtpX homolog	B4S7I8	<i>rosthochloris aestuarii</i> (strain DSM 271 / SK 413)	Plasma membrane
Carbamoyl dehydratase HypE	P24193	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Cysteine--tRNA ligase	P75423	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Leucine--tRNA ligase	P75398	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Serine--tRNA ligase	P75107	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Valine--tRNA ligase	P75304	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	P75534	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	Q5GTJ5	<i>Wolbachia</i> sp. subsp. <i>Brugia malayi</i> (strain TRS)	Cytoplasm
Valine--tRNA ligase	P36420	<i>Lactobacillus casei</i>	Cytoplasm
Proline--tRNA ligase	B8CW65	<i>Halothermothrix orenii</i> (strain H 168 / OCM 544 / DSM 9562)	Cytoplasm
Alanine--tRNA ligase	Q03YQ2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (strain ATCC 8293 / DSM 20343 / BCRC 11652 / CCM 1803 / JCM 6124 / NCDO 523 / NBRC 100496 / NCIMB 8023 / NCTC 12954 / NRRL B-1118 / 37Y)	Cytoplasm
Threonine--tRNA ligase	B0TT20	<i>Shewanella halifaxensis</i> (strain HAW-EB4)	Cytoplasm

Peptide chain release factor 1	B8HB03	<i>Pseudarthrobacter chlorophenicus</i> (strain ATCC 700700 / DSM 12829 / CIP 107037 / JCM 12360 / KCTC 9906 / NCIMB 13794 / A6)	Cytoplasm
<u>Fatores de Regulação e metabolism de RNA</u>			
Multifunctional CCA protein	P06961	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase D	P0ADX9	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Ribonuclease 3	P0A7Y0	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
tRNA threonylcarbamoyladenine dehydratase	Q46927	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
tRNA-2-methylthio-N(6)- dimethylallyladenine synthase	P0AEI1	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative pre-16S rRNA nuclease	P57114	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Ribonuclease Y	P75506	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	A7I2L9	<i>Campylobacter hominis</i> (strain ATCC BAA-381 / LMG 19568 / NCTC 13146 / CH001A)	Cytoplasm
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	A4YJT3	<i>Bradyrhizobium sp.</i> (strain BTai1 / ATCC BAA-1182)	Cytoplasm
Ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO	Q7VKK2	<i>Haemophilus ducreyi</i> (strain 35000HP / ATCC 700724)	Cytoplasm

Probable RNA 2'-phosphotransferase	Q395F2	<i>Burkholderia lata</i> (strain ATCC 17760 / DSM 23089 / LMG 22485 / NCIMB 9086 / R18194 / 383)	Cytoplasm
tRNA uridine (34) hydroxylase	Q7UFS5	<i>Rhodopirellula baltica</i> (strain DSM 10527 / NCIMB 13988 / SH1)	Cytoplasm
tRNA modification GTPase MnmE	A5VA82	<i>Rhizorhabdus wittichii</i> (strain DSM 6014 / CCUG 31198 / JCM 15750 / NBRC 105917 / EY 4224 / RW1)	Cytoplasm
Elongation factor Ts	A8MHH0	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> (strain OhILAs)	Cytoplasm
Ribosomal RNA large subunit methyltransferase H	Q2NUV2	<i>Sodalis glossinidius</i> (strain morsitans)	Cytoplasm
Ribonuclease Z	A6LU82	<i>Clostridium beijerinckii</i> (strain ATCC 51743 / NCIMB 8052)	Cytoplasm
Elongation factor Tu	A7HBL7	<i>Anaeromyxobacter sp.</i> (strain Fw109-5)	Cytoplasm
GTPase Der	A1SU43	<i>Psychromonas ingrahamii</i> (strain 37)	Cytoplasm
Elongation factor G 2	Q3IJW9	<i>Pseudoalteromonas translucida</i> (strain TAC 125)	Cytoplasm
<u>Regulação da transcrição</u>			
Uxu operon transcriptional regulator	P39161	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
HTH-type transcriptional regulator ZntR	P0ACS5	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Psp operon transcriptional activator	P37344	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Propionate catabolism operon regulatory protein	P77743	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm

Sugar fermentation stimulation protein B	P0ACH1	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
DNA polymerase I	P00582	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
OriC-binding nucleoid-associated protein	P64467	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Q50295	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Biofilm growth-associated repressor	Q8UAA8	<i>Agrobacterium fabrum</i> (strain C58 / ATCC 33970)	Cytoplasm
Transcriptional regulatory protein PrrA	Q50136	<i>Mycobacterium leprae</i> (strain TN)	Cytoplasm

Replicação de DNA

Beta sliding clamp	P0A988	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	P28903	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha	P78027	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
LexA repressor	O33927	<i>Thermotoga maritima</i> (strain ATCC 43589 / DSM 3109 / JCM 10099 / NBRC 100826 / MSB8)	Cytoplasm
Flap endonuclease Xni	A1S8B8	<i>Shewanella amazonensis</i> (strain ATCC BAA-1098 / SB2B)	Cytoplasm
Chromosomal replication initiator protein DnaA	Q1MSG8	<i>Lawsonia intracellularis</i> (strain PHE/MN1-00)	Cytoplasm

Sinalização celular

Signal recognition particle protein	P0AGD7	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Ribosome
Bacteriophage adsorption protein A	P31600	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell outer membrane
Sensor protein EvgS	P30855	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Sensor histidine kinase EnvZ	P0AEJ4	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane

Assimilação de Ions

Ferric iron reductase protein FhuF	P39405	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Periplasmic nitrate reductase	P33937	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
Anaerobic nitric oxide reductase flavorubredoxin	A0KEJ1	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> (strain ATCC 7966 / DSM 30187 / BCRC 13018 / CCUG 14551 / JCM 1027 / KCTC 2358 / NCIMB 9240 / NCTC 8049)	Cytoplasm

Transferase

3-oxoadipyl-CoA/3-oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA thiolase	P0C7L2	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Trehalose-6-phosphate synthase	P31677	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm

Propionyl-CoA:succinate CoA transferase	P52043	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative phosphotransferase enzyme IIB component MPN_268	P75507	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase	A8LQ43	<i>Dinoroseobacter shibae</i> (strain DSM 16493 / NCIMB 14021 / DFL 12)	Cytoplasm
tRNA-cytidine (32) 2-sulfurtransferase	A4G9W3	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	Cytoplasm
Probable transaldolase	A5GBY8	<i>Geotalea uraniireducens</i> (strain Rf4)	Cytoplasm

Metabolismo de Nucleotídeos

Nucleoside diphosphate kinase	A8AD67	<i>Citrobacter koseri</i> (strain ATCC BAA-895 / CDC 4225-83 / SGSC4696)	Cytoplasm
Probable dihydroorotate dehydrogenase A (fumarate)	P59626	<i>Enterococcus faecalis</i> (strain ATCC 700802 / V583)	Cytoplasm
Uridine phosphorylase	O08444	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Cytoplasm
Thymidylate kinase	C4KZW9	<i>Exiguobacterium sp.</i> (strain ATCC BAA-1283 / AT1b)	Cytoplasm
Thymidylate synthase	A7MXJ9	<i>Vibrio campbellii</i> (strain ATCC BAA-1116 / BB120)	Cytoplasm
Adenosine deaminase	P22333	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Allantoinase	Q9RV76	<i>Deinococcus radiodurans</i> (strain ATCC 13939 / DSM 20539 / JCM 16871 / LMG 4051 / NBRC 15346 / NCIMB 9279 / R1 / VKM B-1422)	Cytoplasm

Putative carbamate hydrolase RutD	Q32HQ2	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1 (strain Sd197)	Unknown
Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+))	Q8EUY2	<i>Mycoplasma penetrans</i> (strain HF-2)	Cytoplasm
Probable glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 1	B5Y9D4	<i>Coprothermobacter</i> <i>proteolyticus</i> (strain ATCC 35245 / DSM 5265 / OCM 4 / BT)	Cytoplasm

Transportadores de membrana

Protein TonB	P02929	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
Sodium/pantothenate symporter	P16256	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Proline-specific permease ProY	P0AAE2	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
D-allose import ATP-binding protein AlsA	P32721	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Glutamate/aspartate import ATP-binding protein GltL	P0AAG3	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
L-cystine-binding protein TcyJ	P0AEM9	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Inner membrane metabolite transport protein YdjE	P38055	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Outer membrane porin C	P06996	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell outer membrane
Miniconductance mechanosensitive channel YbdG	P0AAT4	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Polyamine export protein	P0AE45	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell outer membrane
Putative nucleoside permease NupX	P33021	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane

AI-2 transport protein TqsA	P0AFS5	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell inner membrane
Multiphosphoryl transfer protein	P32670	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Flagellar biosynthetic protein FlhB	P76299	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeA	P46481	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Nitrate/nitrite transporter NarU	P37758	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Phosphate import ATP-binding protein PstB	P75186	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
Methionine import ATP-binding protein MetN	Q8RFN2	<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i> (strain ATCC 25586 / DSM 15643 / BCRC 10681 / CIP 101130 / JCM 8532 / KCTC 2640 / LMG 13131 / VPI 4355)	Plasma membrane
Probable TonB-dependent receptor NMB0964	Q9JZN9	<i>Neisseria meningitidis serogroup B</i> (strain MC58)	Plasma membrane
Probable membrane transporter protein YdhB	O05493	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	Plasma membrane
Putative multidrug export ATP-binding/permease protein SA1683	Q7A4T3	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain N315)	Plasma membrane
Protein translocase subunit SecA	Q9K6W8	<i>Alkalihalobacillus halodurans</i> (strain ATCC BAA-125 / DSM 18197 / FERM 7344 / JCM 9153 / C-125)	Cytoplasm
C4-dicarboxylate-binding periplasmic protein DctP	Q9HU18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / IC / PRS 101 / PAO1)	Periplasmic space

Biosíntese de isoprenos

4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)	Q6G104	<i>Bartonella quintana</i> (strain Toulouse)	Cytoplasm
Bifunctional enzyme IspD/IspF	A5V2U9	<i>Rhizorhabdus wittichii</i> (strain DSM 6014 / CCUG 31198 / JCM 15750 / NBRC 105917 / EY 4224 / RW1)	Cytoplasm

Processos dependentes de luminosidade

Light-independent protochlorophyllide reductase subunit B	Q132N3	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (strain BisB5)	Cytoplasm
Protein Thf1	Q8YZ41	<i>Nostoc sp.</i> (strain PCC 7120 / SAG 25.82 / UTEX 2576)	Cytoplasm

Patogenicidade

Cytolysin RtxA	A1YKW7	<i>Kingella kingae</i>	Extracelular
Putative colanic acid biosynthesis glycosyl transferase WcaI	P32057	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Lipopolysaccharide 1,2-N-acetylglucosaminetransferase	P27242	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm

Desconhecido

Oxidoreductase UcpA	P37440	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative inactive recombination-promoting nuclease-like protein YjiQ	P0DP22	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Lipoprotein YfjS	O52982	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Protein YhfA	P0ADX1	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Hydrogenase-4 component I	P77668	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Probable ATP-dependent helicase lhr	P30015	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Hydrogenase-4 component J	P77453	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Insertion element IS150 protein InsJ	P19768	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Protein YrdA	P0A9W9	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Probable cyclic di-GMP phosphodiesterase PdeI	P75800	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Probable ATP-dependent RNA helicase MG425 homolog	P75172	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Putative adhesin P1-like protein MPN_370	P75411	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Extracellular
UPF0134 protein MPN_675	P75117	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Unknown
Translation initiation factor IF-2	C5CDZ4	<i>Kosmotoga olearia</i> (strain ATCC BAA-1733 / DSM 21960 / TBF 19.5.1)	Cytoplasm
NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	B9M9X5	<i>Acidovorax ebreus</i> (strain TPSY)	Unknown
General stress protein 26	P80238	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	Unknown

7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin synthase	P73191	<i>Synechocystis sp.</i> (strain PCC 6803 / Kazusa)	Cytoplasm
UPF0102 protein Sama_3355	A1SB01	<i>Shewanella amazonensis</i> (strain ATCC BAA-1098 / SB2B)	Cytoplasm
Oligoribonuclease	Q2L2P5	<i>Bordetella avium</i> (strain 197N)	Cytoplasm
UPF0229 protein Meso_0256	Q11LR5	<i>Chelativorans sp.</i> (strain BNC1)	Cytoplasm
Quinone-reactive Ni/Fe-hydrogenase large chain	P31883	<i>Wolinella succinogenes</i> (strain ATCC 29543 / DSM 1740 / LMG 7466 / NCTC 11488 / FDC 602W)	Plasma membrane
Lipoprotein LpqB	Q47LZ	<i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)	Plasma membrane

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4 - Proteínas identificadas expressas somente no controle (DMSO).

Nome da proteína	ID (uniprot)	Organismo de referência	Compartimento celular
<u>Metabolismo de DNA</u>			
Maltodextrin phosphorylase	P00490	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
L-fuculokinase	P11553	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Hexitol phosphatase B	P77247	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative beta-xylosidase	P77713	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
Lactaldehyde dehydrogenase	P25553	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
3-oxo-tetronate kinase	Q46889	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase	P27833	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Sulfoquinovose isomerase	P32140	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative 1-phosphofructokinase	P75038	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
Transaldolase	Q66ET5	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> serotype I (strain IP32953)	Cytoplasm

5-oxoprolinase subunit A

A0JR24

Arthrobacter sp.
(strain FB24)

Unknown

Processos REDOX e homeostase
celular

Alkyl hydroperoxide reductase C

P0AE08

Escherichia coli (strain
K12)

Cytoplasm

Alkyl hydroperoxide reductase subunit
F

P35340

Escherichia coli (strain
K12)

Cytoplasm

Probable NADH oxidase

P75389

Mycoplasma
pneumoniae (strain
ATCC 29342 / M129)

Cytoplasm

Resposta ao estresse e defesa

ATP-dependent RNA helicase DeaD

P0A9P6

Escherichia coli
(strain K12)

Periplasmic space

UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose--
oxoglutarate aminotransferase

P77690

Escherichia coli
(strain K12)

Cytoplasm

Multidrug resistance protein MdtN

P32716

Escherichia coli
(strain K12)

Plasma membrane

UPF0194 membrane protein YbhG

P75777

Escherichia coli
(strain K12)

Plasma membrane

Probable multidrug resistance protein
EmrK

P52599

Escherichia coli
(strain K12)

Plasma membrane

Chaperone protein ClpB

Q88VX7

Escherichia coli
(strain K12)

Cytoplasm

Protein GrpE

P78017

Mycoplasma
pneumoniae (strain
ATCC 29342 /
M129)

Cytoplasm

Chaperonin GroEL

P78012

Mycoplasma
pneumoniae (strain

Cytoplasm

		ATCC 29342 / M129)	
Co-chaperonin GroES	A7ZCV1	<i>Campylobacter concisus</i> (strain 13826)	Cytoplasm
Chaperone protein DnaK	C4K3I6	<i>Hamiltonella defensa subsp. Acyrthosiphon pisum</i> (strain 5AT)	Cytoplasm
Chaperone protein ClpB	Q88VX7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (strain ATCC BAA-793 / NCIMB 8826 / WCFS1)	Cytoplasm

Metabolismo energético

Pyruvate dehydrogenase E1 component	P0AFG8	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Phosphoglucomutase	P36938	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Glucose-6-phosphate isomerase	P0A6T1	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Acyl carrier protein	P0A6A8	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Citrate synthase	P0ABH7	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1	P0ABI8	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Phosphoglycerate kinase	P0A799	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Formate hydrogenlyase subunit 7 dehydrogenase C2	P16433	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Glutathione-specific gamma- glutamylcyclotransferase	P39163	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm

NADH-quinone oxidoreductase subunit I	P0AFD6	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Galactokinase	P0A6T3	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Fructose-bisphosphate aldolase	P75089	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Enolase	P75189	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Acetate kinase	P75245	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Phosphoglycerate kinase	A7MJQ4	<i>Cronobacter sakazakii</i> (strain ATCC BAA-894)	Cytoplasm
Adenylate kinase	A5FZU4	<i>Acidiphilium cryptum</i> (strain JF-5)	Cytoplasm
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q07234	<i>Buchnera aphidicola</i> subsp. <i>Schizaphis graminum</i> (strain Sg)	Cytoplasm
Phosphoenolpyruvate synthase	P23538	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
methylglyoxal synthase	P0A731	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Phosphoribosyl 1,2-cyclic phosphate phosphodiesterase	P16692	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Malate dehydrogenase	B1XHK9	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
Phosphoenolpyruvate carboxylase	A1U2U4	<i>Marinobacter nauticus</i> (strain	Cytoplasm

		ATCC 700491 / DSM 11845 / VT8)	
Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	Q8DLB7	<i>Thermosynechococcus vestitus</i> (strain IAM M-273 / NIES-2133 / BP-1)	Cytoplasm
Glycerol kinase	B9JZR4	<i>Agrobacterium vitis</i> (strain S4 / ATCC BAA-846)	Cytoplasm
NADPH-Fe(3+) oxidoreductase subunit alpha	Q74FU6	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (strain ATCC 51573 / DSM 12127 / PCA)	Cytoplasm
ATP synthase subunit delta	A6H2D8	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> (strain ATCC 49511 / DSM 21280 / CIP 103535 / JIP02/86)	Plasma membrane
Glucokinase	C5BCK8	<i>Edwardsiella ictaluri</i> (strain 93-146)	Cytoplasm
1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB	Q04KG8	<i>Streptococcus pneumoniae</i> serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466)	Cytoplasm
PTS system glucose-specific EIICBA component	P20166	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	Plasma membrane
Phosphoglycerate kinase	Q47XD4	<i>Colwellia psychrerythraea</i> (strain 34H / ATCC BAA-681)	Cytoplasm
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	A4W879	<i>Enterobacter</i> sp. (strain 638)	Cytoplasm

ATP synthase gamma chain

Q3IK49

*Pseudoalteromonas
translucida* (strain
TAC 125)

Plasma membrane

Metabolismo de DNA

DNA base-flipping protein

P0AFP2

Escherichia coli
(strain K12)

Unknown

Transcription-repair-coupling factor

P30958

Escherichia coli
(strain K12)

Cytoplasm

Exodeoxyribonuclease I

Q2A0L0

Escherichia coli
(strain K12)

Cytoplasm

Holliday junction ATP-dependent DNA
helicase RuvB

P75242

*Mycoplasma
pneumoniae* (strain
ATCC 29342 /
M129)

Cytoplasm

Formamidopyrimidine-DNA glycosylase

P42371

Lactococcus lactis
subsp. cremoris

Cytoplasm

Holliday junction ATP-dependent DNA
helicase RuvB 2

Q2JTJ1

Synechococcus sp.
(strain JA-3-3Ab)

Cytoplasm

DNA repair protein RecN

P17894

Bacillus subtilis
(strain 168)

Cytoplasm

DNA mismatch repair protein MutS

Q38YR4

*Latilactobacillus
sakei subsp. sakei*
(strain 23K)

Cytoplasm

Formamidopyrimidine-DNA glycosylase

B1MDL2

*Mycobacteroides
abscessus* (strain
ATCC 19977 / DSM
44196 / CIP 104536 /
JCM 13569 / NCTC
13031 / TMC 1543)

Cytoplasm

Protein RecA

Q05358

*Legionella
pneumophila*

Cytoplasm

DNA utilization protein HofM	P45753	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
RecBCD enzyme subunit RecB	P08394	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
5'-3' exonuclease	P75403	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Exodeoxyribonuclease 7 large subunit	Q2RIB5	<i>Moorella thermoacetica</i> (strain ATCC 39073 / JCM 9320)	Cytoplasm
Crossover junction endodeoxyribonuclease RuvC	Q820F5	<i>Streptomyces avermitilis</i> (strain ATCC 31267 / DSM 46492 / JCM 5070 / NBRC 14893 / NCIMB 12804 / NRRL 8165 / MA-4680)	Cytoplasm
<u>Sinalização celular</u>			
Signal recognition particle receptor <i>FtsY</i>	P75362	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
Methyl-accepting chemotaxis protein I	P02942	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell inner membrane

Metabolismo e Biossíntese de proteínas

50S ribosomal protein L14	P0ADY3	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
50S ribosomal protein L27	P0ABI8	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Protein NrdI	P0A772	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
50S ribosomal protein L16	P41204	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
50S ribosomal protein L17	Q59547	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Ribosome
50S ribosomal protein L22	A8AQL2	<i>Citrobacter koseri</i> (strain ATCC BAA-895 / CDC 4225-83 / SGSC4696)	Ribosome
50S ribosomal protein L29	Q6A6M8	<i>Cutibacterium acnes</i> (strain DSM 16379 / KPA171202)	Ribosome
50S ribosomal protein L22	Q3KLH4	<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar A (strain ATCC VR-571B / DSM 19440 / HAR-13)	Ribosome
Pup--protein ligase	D1BS28	<i>Xylanimonas cellulosilytica</i> (strain DSM 15894 / CECT 5975 / LMG 20990 / XIL07)	Cytoplasm

50S ribosomal protein L6	Q88XX1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (strain ATCC BAA-793 / NCIMB 8826 / WCFS1)	Ribosome
50S ribosomal protein L30	B9K8A4	<i>Thermotoga neapolitana</i> (strain ATCC 49049 / DSM 4359 / NBRC 107923 / NS-E)	Ribosome
30S ribosomal protein S11	Q9PJN3	<i>Chlamydia muridarum</i> (strain MoPn / Nigg)	Ribosome
Ribosome-recycling factor	C3MBQ5	<i>Sinorhizobium fredii</i> (strain NBRC 101917 / NGR234)	Cytoplasm
LexA repressor	B8HG97	<i>Pseudarthrobacter chlorophenicus</i> (strain ATCC 700700 / DSM 12829 / CIP 107037 / JCM 12360 / KCTC 9906 / NCIMB 13794 / A6)	Cytoplasm
50S ribosomal protein L15	Q6CZY9	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (strain SCRI 1043 / ATCC BAA-672)	Ribosome
Protein translocase subunit SecA	Q8K9C4	<i>Buchnera aphidicola</i> subsp. <i>Schizaphis graminum</i> (strain Sg)	Plasma membrane
30S ribosomal protein S4	B0C9F5	<i>Acaryochloris marina</i> (strain MBIC 11017)	Ribosome
30S ribosomal protein S11	B3WAJ3	<i>Lactocaseibacillus casei</i> (strain BL23)	Ribosome

5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	P0AEZ1	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
S-adenosylmethionine synthase	B7UHY9	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
D-cysteine desulfhydrase	P76316	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative aminodehydroquininate synthase	Q3J830	<i>Amycolatopsis</i> <i>mediterranei</i> (strain S699)	Cytoplasm
Glutamate mutase epsilon subunit	Q05509	<i>Clostridium</i> <i>tetanomorphum</i>	Cytoplasm
N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	A5WH78	<i>Psychrobacter</i> sp. (strain PRwf-1)	Cytoplasm
Tyrosine phenol-lyase	Q9CMK9	<i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> (strain Pm70)	Cytoplasm
3-dehydroquininate synthase	A3PC83	<i>Prochlorococcus</i> <i>marinus</i> (strain MIT 9301)	Cytoplasm
3-isopropylmalate dehydratase large subunit	Q7VAV9	<i>Prochlorococcus</i> <i>marinus</i> (strain SARG / CCMP1375 / SS120)	Cytoplasm
Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	B1M0Q0	<i>Methylobacterium</i> <i>radiotolerans</i> (strain ATCC 27329 / DSM 1819 / JCM 2831 / NBRC 15690 / NCIMB 10815 / 0-1)	Cytoplasm
1D-myo-inositol 2-acetamido-2-deoxy- alpha-D-glucopyranoside deacetylase	D6Y7M2	<i>Thermobispora</i> <i>bispora</i> (strain ATCC 19993 / DSM 43833 / CBS 139.67 / JCM	Cytoplasm

Chorismate synthase	Q0S0N2	10125 / KCTC 9307 / NBRC 14880 / R51)	<i>Rhodococcus jostii</i> (strain RHA1)	Cytoplasm
3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyltransferase	B9MQK4		<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> (strain ATCC BAA-1888 / DSM 6725 / Z-1320)	Cytoplasm
Glycine cleavage system H protein	A1T9T8	13017 / BCRC 16820 / KCTC 9966 / NRRL B-24157 / PYR-1)	<i>Mycolicibacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / JCM	Cytoplasm
Selenide, water dikinase	C4ZDB0		<i>Agathobacter rectalis</i> (strain ATCC 33656 / DSM 3377 / JCM 17463 / KCTC 5835 / VPI 0990)	Cytoplasm
Serine hydroxymethyltransferase	A6VXM6		<i>Marinomonas sp.</i> (strain MWYL1)	Cytoplasm
Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	P60601		<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (strain ATCC BAA-98 / CGA009)	Cytoplasm
Glutamine synthetase	P10583		<i>Azospirillum brasilense</i>	Cytoplasm
Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ	Q67KC5		<i>Symbiobacterium thermophilum</i> (strain T / IAM 14863)	Cytoplasm
3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyltransferase	B8D9A1		<i>Buchnera aphidicola subsp. Acyrthosiphon pisum</i> (strain 5A)	Cytoplasm

Dihydroxy-acid dehydratase	Q2SA20	<i>Hahella chejuensis</i> (strain KCTC 2396)	Cytoplasm
		<i>Akkermansia muciniphila</i> (strain ATCC BAA-835 / DSM 22959 / JCM 33894 / BCRC 81048 / CCUG 64013 / CIP 107961 / Muc)	
Carbamoyl-phosphate synthase small chain	B2URJ0	<i>Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae serovar copenhageni</i> (strain Fiocruz L1-130)	Cytoplasm
Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	P62392	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (strain K96243)	Cytoplasm
Argininosuccinate synthase	Q63U95	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Glycine--tRNA ligase beta subunit	P00961	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system	P37177	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Methionyl-tRNA formyltransferase	P75235	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Arginine--tRNA ligase	P75222	<i>Clostridium acetobutylicum</i> (strain ATCC 824 / DSM 792 / JCM	Cytoplasm
GTPase Era	Q97JI5		Plasma membrane

Alanine--tRNA ligase	B0TK15	1419 / LMG 5710 / VKM B-1787)	<i>Shewanella halifaxensis</i> (strain HAW-EB4)	Cytoplasm
Proline--tRNA ligase	A4IMD1		<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (strain NG80-2)	Cytoplasm
Threonine--tRNA ligase	A0L4J6		<i>Magnetococcus marinus</i> (strain ATCC BAA-1437 / JCM 17883 / MC-1)	Cytoplasm
Glycine--tRNA ligase beta subunit	B3PRI2		<i>Rhizobium etli</i> (strain CIAT 652)	Cytoplasm
Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	A4XQK5		<i>Pseudomonas mendocina</i> (strain <i>ymp</i>)	Cytoplasmx
Isoleucine--tRNA ligase	Q9RUP8		<i>Deinococcus radiodurans</i> (strain ATCC 13939 / DSM 20539 / JCM 16871 / LMG 4051 / NBRC 15346 / NCIMB 9279 / R1 / VKM B- 1422)	Cytoplasm

Fatores de regulação e metabolism de RNA

Ribosomal RNA large subunit methyltransferase K/L	P0A8I8		<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
tRNA-modifying protein YgfZ	P75810		<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
RNA 2'-phosphotransferase	P39380		<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown

Ribonuclease J	P75497	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Elongation factor Tu 1	P0CE47	<i>Escherichia coli</i> O139:H28 (strain E24377A / ETEC)	Cytoplasm
Elongation factor G	Q492B1	<i>Blochmannia pennsylvanicus</i> (strain BPEN)	Cytoplasm
Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	Q88WM8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (strain ATCC BAA-793 / NCIMB 8826 / WCFS1)	Cytoplasm
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	P59505	<i>Buchnera aphidicola</i> subsp. <i>Baizongia pistaciae</i> (strain Bp)	Cytoplasm
Elongation factor 4	C3K6G8	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (strain SBW25)	Cytoplasm
tRNA modification GTPase MnmE	Q1MPF1	<i>Lawsonia intracellularis</i> (strain PHE/MN1-00)	Cytoplasm

Transferase

L-carnitine CoA-transferase	P31572	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Phosphate acetyltransferase EutD	P77218	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Protein adenylyltransferase SelO	Q0THC2	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Unknown
3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	P31057	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm

Nicotinate-nucleotide-- dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase	P36562	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative acetyltransferase MPN_114	P75448	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Ornithine carbamoyltransferase	Q93JF1	<i>Streptomyces coelicolor</i> (strain ATCC BAA-471 / A3(2) / M145)	Cytoplasm
Sulfate adenylyltransferase	A5D5R7	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> (strain DSM 13744 / JCM 10971 / SI)	Cytoplasm
4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D- erythritol kinase	Q1LTH3	<i>Baumannia cicadellinicola subsp.</i> <i>Homalodisca coagulata</i>	Unknown
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	A3MYS9	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> <i>serotype 5b</i> (strain L20)	Cytoplasm
Phosphatidylglycerol--prolipoprotein diacylglyceryl transferase	Q8NNU2	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (strain ATCC 13032 / DSM 20300 / BCRC 11384 / JCM 1318 / LMG 3730 / NCIMB 10025)	Cytoplasm
Light-independent protochlorophyllide reductase subunit N	Q7V2D5	<i>Prochlorococcus marinus subsp.</i> <i>pastoris</i> (strain CCMP1986 / NIES- 2087 / MED4)	Cytoplasm

Glutamyl-tRNA reductase	A5UU33	<i>Roseiflexus sp.</i> (strain RS-1)	Cytoplasm
<u>Transportadores de membrana</u>			
p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeB	P46481	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
D-galactose-binding periplasmic protein	P0AEE5	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Inner membrane transport protein RhmT	P76470	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Putative outer membrane porin protein NmpC	P21420	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell outer membrane
Thiosulfate-binding protein	P16700	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF	P75551	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
Spermidine/putrescine import ATP-binding protein PotA	P75059	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
Phosphate import ATP-binding protein PstB 1	Q8RCU0	<i>Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis</i> (strain DSM 15242 / JCM 11007 / NBRC 100824 / MB4)	Plasma membrane
Fe(3+) ions import ATP-binding protein FbpC 2	Q6D2F6	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (strain SCRI 1043 / ATCC BAA-672)	Plasma membrane

Replicação de DNA

DNA adenine methylase	P0AEE8	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
50S ribosomal protein L2	P60422	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Probable DNA helicase II homolog	P75437	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm

Regulação da transcrição

Arabinose operon regulatory protein	P0A9E0	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
HTH-type transcriptional regulator GadX	P37639	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Periplasmic protein TorT	P38683	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Periplasmic space
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	P0A7Z4	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative acyl-CoA dehydrogenase AidB	P33224	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Antitoxin VapB2	O07227	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (strain ATCC 25618 / H37Rv)	Unknown
HTH-type transcriptional regulator BetI	B7VQ27	<i>Vibrio atlanticus</i> (strain LGP32)	Cytoplasm
Catabolite control protein A	O07329	<i>Streptococcus mutans</i> <i>serotype c</i> (strain ATCC 700610 / UA159)	Cytoplasm

DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	Q0BUQ5	<i>Granulibacter bethesdensis</i> (strain ATCC BAA-1260 / CGDNIH1)	Cytoplasm
---	--------	--	-----------

Biosíntese de antibióticos

Cytochrome P-450 monooxygenase DoxA	Q93MI2	<i>Streptomyces peucetius subsp. caesius</i>	Cytoplasm
-------------------------------------	--------	--	-----------

Metabolismo de nucleotídeos

Allantoate amidohydrolase	P77425	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
---------------------------	--------	--------------------------------------	-----------

Bifunctional protein FofD	P75096	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
---------------------------	--------	---	-----------

Thymidylate kinase	Q6FZU8	<i>Bartonella quintana</i> (strain Toulouse)	Cytoplasm
--------------------	--------	--	-----------

dTTP/UTP pyrophosphatase	Q82ZA4	<i>Enterococcus faecalis</i> (strain ATCC 700802 / V583)	Cytoplasm
--------------------------	--------	--	-----------

Phosphoribosylamine--glycine ligase	P15640	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
-------------------------------------	--------	--------------------------------------	-----------

Phosphotransferase RcsD	P39838	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
-------------------------	--------	--------------------------------------	-----------------

DNA translocase FtsK 2	Q8XWX9	<i>Ralstonia solanacearum</i> (strain GMI1000)	Plasma membrane
------------------------	--------	--	-----------------

Dihydroorotase	P96081	<i>Thermus aquaticus</i>	Cytoplasm
----------------	--------	--------------------------	-----------

Patogenicidade

LPS-assembly protein LptD	P31554	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell outer membrane
3-deoxy-D-manno-octulosonic acid kinase	Q9PBJ1	<i>Xylella fastidiosa</i> (strain 9a5c)	Plasma membrane
T-DNA border endonuclease VirD2	P18592	<i>Agrobacterium</i> <i>fabrum</i> (strain C58 / ATCC 33970)	Cytoplasm

Organização e manutenção estrutural da parede celular

D-alanyl-D-alanine dipeptidase	P77790	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
1,6-anhydro-N-acetylmuramyl-L-alanine amidase AmpD	P13016	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	P0AGC5	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cell outer membrane
Undecaprenyl-diphosphatase	G0FS62	<i>Amycolatopsis</i> <i>mediterranei</i> (strain S699)	Plasma membrane
Acyl carrier protein phosphodiesterase	B1XEZ2	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Crotonobetainyl-CoA reductase	P60584	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA	P77398	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Protein containing complex
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	P69451	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Medium/long-chain-fatty-acid--[acyl- carrier-protein] ligase MbtM	P0A4X9	<i>Mycobacterium bovis</i> (strain ATCC BAA- 935 / AF2122/97)	Plasma membrane

Phosphatidylglycerol--prolipoprotein diacylglyceryl transferase	Q17X31	<i>Helicobacter acinonychis</i> (strain Sheeba)	Plasma membrane
<u>Desconhecido</u>			
Putative lipoprotein YfiB	P07021	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Putative aminopeptidase FrvX	P32153	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Probable ATP-binding protein YheS	P63389	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Ureidoglycolate dehydrogenase (NAD(+))	W1F386	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Inner membrane protein YbjJ	P75810	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
Probable lipoprotein YiaD	P37665	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Plasma membrane
tRNA-dihydrouridine(20/20a) synthase	P32695	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	Cytoplasm
Putative phosphatase MPN_427	P75360	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Putative MgpC-like protein MPN_092	P75600	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Unknown
Probable ATP-dependent RNA helicase MG308 homolog	P75335	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm

Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	P75168	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
Putative esterase/lipase 1	P75333	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Unknown
ATP synthase subunit alpha	Q50329	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
Acyl carrier protein homolog	P75378	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Plasma membrane
Protein MPN_376	P75405	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (strain ATCC 29342 / M129)	Cytoplasm
UPF0597 protein DP0591	Q6AQQ3	<i>Desulfotalea psychrophila</i> (strain LSv54 / DSM 12343)	Cytoplasm
L-lactate oxidase	C0XII3	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i> (strain ATCC 8290)	Cytoplasm
Flagellin	P06175	<i>Salmonella rubislaw</i>	Extracellular
5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine deaminase	A4J675	<i>Desulfotomaculum reducens</i> (strain MI-1)	Cytoplasm
Surface layer protein	P38538	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	Extracellular
ESX-5 secretion system protein EccA5	P63745	<i>Mycobacterium bovis</i> (strain ATCC BAA-935 / AF2122/97)	Cytoplasm

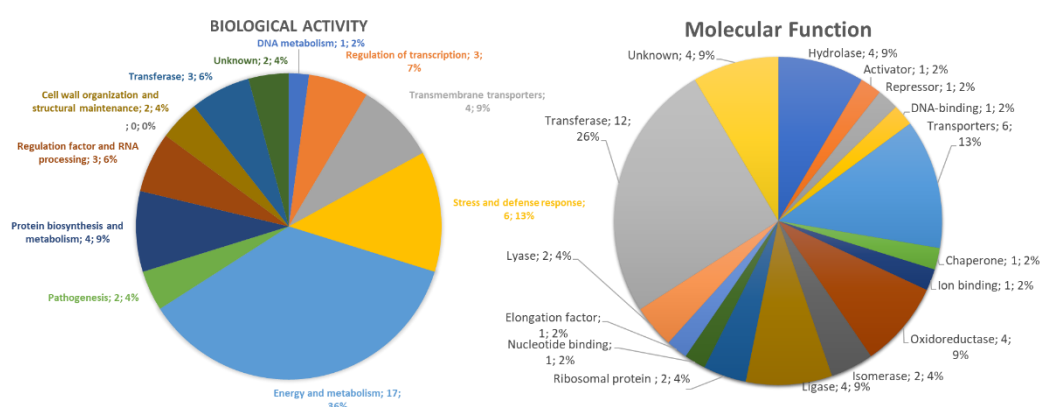
Protein adenylyltransferase SelO	Q1H0D2	<i>Methylobacillus flagellatus</i> (strain KT / ATCC 51484 / DSM 6875)	Cytoplasm
Sugar fermentation stimulation protein homolog	A6W2V7	<i>Marinomonas sp.</i> (strain MWYL1)	Cytoplasm
Phase 2 flagellin	P52615	<i>Salmonella abortus-equi</i>	Extracellular
Putative membrane protein insertion efficiency factor	Q11JM2	<i>Chelativorans sp.</i> (strain BNC1)	Plasma membrane
UPF0358 protein BH2626	Q9K9L9	<i>Alkalihalobacillus halodurans</i> (strain ATCC BAA-125 / DSM 18197 / FERM 7344 / JCM 9153 / C-125)	Cytoplasm
UPF0114 protein PC1_0431	C6DJS4	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i> (strain PC1)	Plasma membrane
D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase	B2DFG5	<i>Delftia sp.</i> (strain HT23)	Cytoplasm
Methionine import ATP-binding protein MetN 1	Q63H29	<i>Bacillus cereus</i> (strain ZK / E33L)	Plasma membrane
FHA domain-containing protein FhaB	A0QNG6	<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	Plasma membrane

Fonte: Elaborado pelo autor

A classificação do gene ontology (GO) das proteínas compartilhadas pelas células tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl e controle revelou 11 e 16 grupos de proteínas em relação, respectivamente, à atividade biológica e função molecular (Figura 7). Em relação à atividade biológica, o grupo que deteve o maior número de proteínas identificadas foi “Energia e metabolismo”

com 36% do total de proteínas e o grupo “Metabolismo do DNA” deteve o menor número, com 2% do total de proteínas identificadas (Figura 7). No caso de função molecular, o grupo “Transferase” possui a maior quantidade, 26%, de proteínas identificadas. Muitos grupos como “Chaperona e ligação iônica” apresentaram um pequeno número de proteínas, 2%, do total identificado (Figura 7).

Figura 7 – Distribuição estatística das proteínas compartilhadas de acordo com atividade biológica e função molecular segundo a anotação no GO.



Fonte: Elaborado pelo autor

Os grupos de proteínas envolvidas na regulação da transcrição, transportadores transmembranares, resposta ao estresse e defesa, energia e metabolismo, patogênese, biossíntese e metabolismo de proteínas, organização da parede celular e manutenção estrutural e transferase foram compostos por proteínas que possuem $\text{score} > 1$ (Up-regulated) ou $\text{score} < 1$ (Down-regulated) (Tabela 2). Em contraste, os grupos Fator de Regulação e Processamento de RNA e Metabolismo de DNA são compostos apenas por proteínas que diminuem a abundância nas células de *K. pneumoniae* após tratamento com Mo-CBP3-Pepl (Tabela 2 e Figura 6B). Da mesma forma, as proteínas que reduziram sua abundância também foram relacionadas a fatores de regulação e transferase (figura 6B).

Foi identificado uma proteína chamada Peptídeo metionina sulfóxido redutase MsrB que tem o maior acúmulo diferencial (14,104 vezes up-regulated). Esta proteína está envolvida na defesa e resposta ao estresse oxidativo (SINGH; SINGH; BAUM, 2018), seguida pela GMP sintase [hidrólise de

glutamina] (4,596 vezes up-regulated) que está envolvida na energia e no metabolismo, seguido pela Diaminopimelato descarboxilase (3.546 up-regulated) que está envolvida na biossíntese de proteínas (PEVERELLI et al., 2016). Entre as proteínas que foram observadas uma redução na abundância após tratamento estão Lon protease (0,342), Endonuclease 8 (0,487), proteína de membrana interna YhjD (0,462), proteína ribossômica 50S L22 (0,387), tRNA uridina 5-carboximetilaminometil enzima de modificação MnmG (0,487), Glutathione S-transferase YfcF (0,273), Sensor histidina quinase HprS (0,213 vezes) e fator de alongamento G (0,234 vezes) (Tabela 2), com os menores escores de mudança após o tratamento.

Dentre as proteínas identificadas exclusivamente no tratamento, foi identificado uma proteína associada à resistência ao zinco que está relacionada com condições de estresse de zinco e a subunidade catalítica da proteína-metionina-sulfóxido redutase MsrP que está relacionada ao reparo do periplasma em condições de estresse.

4.4.2 Metabolismo de DNA

Neste grupo, uma proteína foi encontrada em ambos os grupos *Mo*-CBP3-Pepl e DMSO, Endonuclease 8 (Tabela 2), que foi acumulada em células de *K. pneumoniae* tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl em comparação com células DMSO (controle). A Endonuclease 8 é uma enzima envolvida no processo de reparo do DNA após dano por oxidação por ROS (BURGESS et al., 2002; JIANG et al., 1997; OSHIMA et al., 1996). A redução da abundância de Endonuclease 8 em células tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl é interessante porque demonstrou um maior acúmulo de ROS (Figura 4) nessas células. Assim, o alto acúmulo de espécies reativas de oxigênio e a redução na acumulação da Endonuclease 8 sugere que o DNA das células de *K. pneumoniae* está sendo danificado por ROS induzida por *Mo*-CBP3-Pepl (LEE et al., 2008).

Ao analisar proteínas detectadas exclusivamente em células de *K. pneumoniae* após o tratamento com *Mo*-CBP3-Pepl (Tabela 3) e ausentes em células de controle, como a proteína A do sistema UvrABC, a proteína B do sistema UvrABC e a proteína C do sistema UvrABC, fica claro que *Mo*-CBP3-

PepI induz vários e diferentes tipos de danos no DNA de *K. pneumoniae*, pois essas enzimas estão envolvidas em danos em ambas as fitas de DNA (VERHOEVEN et al., 2002). Curiosamente, apenas nas células controle (Tabela 4), mas não nas células tratadas, foi detectada a proteína de reparo do DNA RecN, que é a primeira linha celular responsável pela proteção de danos ao DNA (KIDANE et al., 2004). De alguma forma, Mo-CBP3-PepI induz uma acumulação negativa em células de *K. pneumoniae* que combinada com a acumulação de ROS leva a danos no DNA e morte celular.

4.4.3 Resposta ao estresse e defesa

Neste grupo uma proteína realmente merece ser destacada, é a Peptídeo metionina sulfóxido redutase (MsrB), que foi altamente acumulada em células de *K. pneumoniae* tratadas com Mo-CBP3-PepI em comparação com células controle, com um escore de 14,104 (Tabela 2). Tal molécula é uma proteína altamente conservada e importante no mecanismo de defesa celular a altos níveis de ROS. Atua na reparação de proteínas inativadas por ROS (DELAYE et al., 2007). O aumento de MsrB em células tratadas com Mo-CBP3-PepI em comparação ao controle corrobora totalmente com o alto acúmulo de ROS nas células (Figura 4). Proteínas assim como outras moléculas vitais para a célula são atacadas e inativadas por ROS (WANG et al., 2015). O valor de fold-change apresentado pela proteína MsrB indica um dano severo nas proteínas das células de *K. pneumoniae* após o tratamento com Mo-CBP3-PepI, demonstrando que as células estão tentando se recuperar desse estresse.

A análise proteômica das células revelou uma redução no acúmulo de uma proteína importante, a Lon protease, em células tratadas com Mo-CBP3-PepI em comparação com células de controle (Tabela 2). A Lon protease é uma serina protease multifuncional altamente conservada, dependente de ATP, envolvida na renovação de proteínas em células bacterianas (LUO et al., 2007; HE et al., 2018). A Lon protease está envolvida na degradação de proteínas naturais ou mal dobradas induzidas por ROS, levando ao aminoácido livre para produzir novas proteínas funcionais (STADMAN; LEVINE, 2003). A redução na

abundância da Lon protease em células tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl pode sugerir um acúmulo de proteínas mal dobradas que mitigam a chance de respostas ao estresse impostas por *Mo*-CBP3-Pepl. Além disso, a Lon protease é importante para processos como encapsulamento, motilidade, resposta ao choque térmico, formação de persistência e resistência a drogas e produção de fator de virulência (TORRES-CABASSA, et al., 1987; MUKHERJEE, et al., 2014; BISSONNETTE, et al., 2010; SHAN, et al., 2017). Ao induzir a redução do acúmulo de Lon protease nas células de *K. pneumoniae*, *Mo*-CBP3-Pepl reduziu drasticamente as chances da célula responder ao estresse e inibiu vários processos essenciais ao funcionamento normal da célula levando à morte.

Observando as proteínas exclusivas das células controle (Tabela 4) notou-se que proteínas como a proteína de resistência a múltiplas drogas MdtN, proteína de membrana UPF0194 YbhG e proteína de resistência a múltiplas drogas EmrK estavam exclusivamente de células de controle, portanto estavam ausentes após o tratamento com *Mo*-CBP3-Pepl. MdtN é uma proteína envolvida na resistência contra puromicina e acriflavina (RICCI; BLAIR; PIDDOCK, 2013). EmrK é parte da bomba de efluxo envolvida na resistência a múltiplas drogas (de acordo com o registro no UNIPROT, EmrK - Provável Proteína de Resistência a Multidrogas EmrK - Escherichia Coli (Strain K12) | UniProtKB | UniProt Disponível online: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P52599/entry> (acesso em 7, nov. 2022).). YbhG está envolvida na resistência ao cloranfenicol (de acordo com o registro no UNIPROT, YbhG - UPF0194 Proteína de Membrana YbhG - Escherichia Coli (Espécie K12) | UniProtKB | UniProt Disponível online: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P75777/entry> (acesso em 7, nov. 2022).). Este é um resultado importante, pois a ausência destas proteínas em células tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl indica que elas podem se tornar suscetíveis a esses antibióticos novamente.

4.4.4 Biossíntese e Metabolismo de Proteínas

A análise das proteínas relacionadas à biossíntese e metabolismo protéico revelou um cenário bastante complexo em células de *K. pneumoniae* após tratamento com *Mo*-CBP3-Pepl (Tabela 2,3 e 4). Por exemplo, entre as

proteínas observadas em ambas as amostras, a proteína ribossômica 50S L22 e a proteína ribossômica 50S L7/L12, respectivamente, apresentaram redução e aumento da abundância em células de *K. pneumoniae* tratadas com Mo-CBP3-PepI em comparação com células de controle. A proteína ribossomal 50S L22 é uma importante proteína central de ribossomos bacterianos envolvida na agregação e estabilização de proteínas ribossomais para formar o ribossomo em bactérias (DAVYDOVA, et al., 2002). A subunidade L22 é tão importante para o ribossomo bacteriano que é alvo de antibióticos como os macrolídeos (MOORE; SAUER, 2008). A redução da abundância desta proteína induzida por Mo-CBP3-PepI indica uma desestabilização dos ribossomos bacterianos levando à inibição da síntese proteica em bactérias. Foi observado um aumento na abundância da proteína ribossômica 50S L7/L12 nas células tratadas com Mo-CBP3-PepI (Tabela 2) em relação ao controle. O aumento dessa proteína talvez seja um mecanismo celular para suprir a deficiência da proteína ribossômica L22. No entanto, a L7/L12 é uma proteína GTPase envolvida em processos como iniciação, alongamento e terminação da tradução pelo ribossomo 70S maduro (CARLSON, et al., 2017). No entanto, o aumento dessa proteína não ajudará as células a realizar a síntese proteica na ausência da subunidade L22.

Ao avaliar as proteínas exclusivas após tratamento com Mo-CBP3-PepI (tabelas 3 e 4), verifica-se um resultado interessante. Entre as proteínas detectadas exclusivamente em células de *K. pneumoniae* tratadas com Mo-CBP3-PepI estão Cisteína-tRNA ligase, Leucina-tRNA ligase, Serina-tRNA ligase, Valina-tRNA ligase, Glutamina-tRNA, Fenilalanina-tRNA ligase alfa subunidade, Valina--tRNA ligase, Prolina--tRNA ligase, Alanina--tRNA ligase e Treonina--tRNA ligase. Todas essas proteínas estão envolvidas na entrega de aminoácidos aos ribossomos durante a síntese de proteínas. O aumento na abundância dessas proteínas indica uma tentativa das células de aumentar ou manter a síntese proteica em níveis normais para permitir que a célula lute contra o estresse imposto pelo Mo-CBP3-PepI.

As proteínas são importantes para todos os organismos vivos. As bactérias precisam detectar o que está acontecendo em seu ambiente para responder de acordo com isso. Tudo isso é feito por proteínas. Para responder a agentes que promovem estresse, como Mo-CBP3-PepI, *K. pneumoniae*

precisa reprogramar todo o seu perfil proteico para produzir proteínas de defesa (STAROSTA, et al., 2014). Por exemplo, para se defender da superprodução de ROS, as células de *K. pneumoniae* deveriam produzir proteínas scavenger, mas isso não é possível. Isso acontece porque o *Mo*-CBP3-Pepl reduziu a abundância de uma proteína importante para a atividade ribossômica. Como consequência, as células de *K. pneumoniae* não podem produzir proteínas scavenger levando ao acúmulo de ROS e, portanto, danos ao DNA (como relatado acima) e danos a outras proteínas levando a célula à morte, conforme revelado por danos presentes na microscopia eletrônica de fluorescência e varredura.

4.4.5 Processamento de RNA e Fatores de regulação

Neste grupo de proteínas, deve-se destacar o fator de alongamento proteico (Q7NAV3) G que diminuiu em abundância em *K. pneumoniae* tratada com *Mo*-CBP3-Pepl (Tabela 2). Ao olhar para proteínas únicas de células controle (tabela 4), uma isoforma do fator de alongamento G (Q492B1) e outros fatores, como o fator de alongamento Tu 1 e o fator de alongamento 4, estão presentes, mas desaparecem completamente nas células tratadas. O fator de alongamento G é importante para o processo de translocação durante a síntese de proteínas procarióticas. Ele usa a energia contida no GTP para realizar a interação entre tRNA e mRNA (CHEN, et al., 2016). A diminuição da abundância do fator de alongamento G levou ao desligamento da síntese proteica nas células de *K. pneumoniae*. Conforme discutido acima na seção de metabolismo de proteínas, a síntese de proteínas em células de *K. pneumoniae* é dramaticamente afetada por *Mo*-CBP3-Pepl, dado que elas não têm chance de responder ao estresse imposto pelo peptídeo.

4.4.6 Organização e manutenção da estrutura da parede celular

Neste grupo de proteínas, as mais importantes foram encontradas exclusivamente em células de *K. pneumoniae* tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl

(Tabela 3). Entre eles, transglicosilase de mureína lítica solúvel, D-alanil-D-alanina carboxipeptidase DacB, proteína determinante da forma celular MreB, L,D-transpeptidase ErfK/SrfK, proteína determinante da forma celular MreC, carboxipeptidase tetrapeptídica de mureína, DD-endopeptidase de mureína MepH, proteína Sensor LytS, D-alanina--D-alanina ligase e proteína de membrana interna YdcZ. Todas essas proteínas estão envolvidas na renovação da parede celular, manutenção da estrutura celular e estabilização da forma (DIVAKARUNI, et al., 2007; DIK, et al., 2017). O aumento da abundância dessas proteínas indica que as células de *K. pneumoniae* estão sofrendo com o estresse na parede celular imposto pelo *Mo*-CBP3-Pepl e estão tentando superar o estresse.

No entanto, conforme revelado pela análise de microscopia eletrônica de varredura (Figura 5), as células de *K. pneumoniae* tratadas apresentaram vários danos à parede e morfologia celular. Como exemplo, tem sido relatado que *Mo*-CBP3-Pepl tem a capacidade de se ligar à parede celular da levedura *C. albicans* (LIMA, et al., 2020)

A parede celular bacteriana é um componente importante da célula envolvida na defesa mecânica sob vários estresses ambientais (MUELLER; LEVIN, 2020). Durante o estresse é exigida da célula a capacidade de recuperar a parede celular toda vez que o dano ocorrer. A detecção exclusiva dessas proteínas em células tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl indica que está ocorrendo estresse à parede celular e a célula está tentando se recuperar, conforme revelado pela análise microscópica (Figuras 4 e 5).

4.4.7 Transferase

Neste grupo uma proteína é essencialmente relevante, o sensor histidina quinase HprS, que apresentou uma abundância reduzida nas células tratadas com *Mo*-CBP3-Pepl em relação às células controle (Tabela 2). Os sensores de histidina quinase são elementos importantes usados por bactérias para detectar o ambiente e responder de acordo (SZURMANT, et al., 2008). Principalmente, esses sensores são responsáveis por perceber e responder ao

estresse oxidativo (KIM, et al., 2014). Neste caso, a redução na abundância de HprS corrobora com o alto acúmulo de ROS (Figura 4) em células de *K. pneumoniae* tratadas com Mo-CBP3-Pepl. Este resultado mostra que Mo-CBP3-Pepl impõe dois estresses às células de *K. pneumoniae*. Primeiro, é a indução do acúmulo de ROS em níveis mais elevados; segundo, é a redução do acúmulo da proteína envolvida na percepção e resposta ao estresse causado pelas Espécies reativas de oxigênio. Neste caso, Mo-CBP3-Pepl, ao mesmo tempo, induz um estresse e inibe a capacidade da célula de desenvolver uma resposta a ele.

4.4.8 Processos Redox e Homeostase celular

Este grupo é particularmente importante dado o cenário de altos níveis de acúmulo de ROS em células de *K. pneumoniae* induzidos por Mo-CBP3-Pepl. Neste grupo não foram encontradas proteínas sobrepostas, apenas proteínas exclusivas de células de *K. pneumoniae* tratadas com Mo-CBP3-Pepl e de controle separadamente (Tabelas 3 e 4). Por exemplo, Alquil hidroperóxido redutase C e Alquil hidroperóxido redutase subunidade F foram detectadas apenas no controle de *K. pneumoniae* (Tabela 4). Essas enzimas são tiol-peroxidases e a primeira linha de defesa celular responsável pelo sequestrador de H₂O₂ exibindo um papel crítico na proteção de células bacterianas de H₂O₂ endogenamente (WANG, et al., 2013; CHEN, et al., 1998).

Curiosamente, essas enzimas não foram detectadas em células tratadas com Mo-CBP3-Pepl indicando uma depleção completa dessas enzimas. A ausência dessas enzimas nas células tratadas pode levar ao acúmulo de H₂O₂ (Figura 4), conforme revelado por microscopia de fluorescência. Para lidar com os altos níveis de ROS induzidos por peptídeos, as células de *K. pneumoniae* aumentam a abundância de uma enzima catalase-peroxidase, detectada apenas em células tratadas, que está envolvida no mecanismo de defesa contra altos níveis de ROS (WANG, et al., 2013; CHEN, et al., 1998; YUAN, et al., 2021). Os dados revelaram que, embora as células de *K. pneumoniae* tratadas com Mo-CBP3-Pepl tenham aumentado a abundância de uma enzima catalase para

remover o excesso de ROS, não é suficiente para prevenir os danos produzidos por elas, uma vez que as microscopias mostraram danos na estrutura celular (Figuras 4 e 5) e muitas enzimas sugerem danos no DNA e proteína.

5. Conclusão

O presente trabalho revelou os possíveis mecanismos de ação que levam a inibição do crescimento bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* por meio do tratamento com o peptídeo sintético *Mo-CBP3-Pepl*. Os resultados verificados na proteômica revelam um perfil proteico interessante que demonstram alterações graves após tratamento com o peptídeo, demonstrando os efeitos e o estresse provocado por tal molécula, esses resultados corroboram também com as visualizações dos ensaios com microscopia bem como com o ensaio de viabilidade celular. Assim, tais resultados demonstram um efeito positivo na aplicação do peptídeo para a inibição do crescimento bacteriano. Portanto, faz-se necessário o avanço dos estudos, como ensaios in vivo e ensaios de sinergismos com drogas.

REFERÊNCIAS

- AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. 134, 8 dez. 2010.
- ARNOLD, R. S. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Bacteria. **Southern Medical Journal**, v. 104, n. 1, p. 40–45, jan. 2011.
- ASLAM, B. et al. Proteomics: Technologies and Their Applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182–196, 18 out. 2016.
- BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 471–506, jun. 1973.
- BOPARAI, J. K.; SHARMA, P. K. Mini review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein & Peptide Letters**, v. 26, 22 ago. 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, maio 1976.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 7 dez. 2009.
- CLEMENTS, A. et al. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15569–15577, 25 maio 2007.
- CHOI, H.; YANG, Z.; WEISSHAAR, J. C. Oxidative stress induced in *E. coli* by the human antimicrobial peptide LL-37. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. e1006481, 30 jun. 2017.
- COSTERTON, J. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, n. 3-4, p. 217–221, maio 1999.
- DE MAJUMDAR, S. et al. Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004627, 29 jan. 2015.
- DEGUCHI, T. et al. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella*

pneumoniae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 699–701, mar. 1997.

DOI, Y.; WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 523–537, 1 jun. 2016.

EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. YU. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. **Acta Naturae**, v. 10, n. 4, p. 33–48, 2018.

EL SHAZELY, B. et al. Resistance Evolution Against Antimicrobial Peptides in *Staphylococcus aureus* Alters Pharmacodynamics Beyond the MIC. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 14 fev. 2020.

GIEDRAITIENĖ, A. et al. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **Medicina**, v. 47, n. 3, p. 19, 22 mar. 2011.

GOLD, H. S.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial-Drug Resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 19, p. 1445–1453, 7 nov. 1996.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, dez. 2006.

HARTMANN, M. et al. Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3132–3142, 7 jun. 2010.

HUAN, Y. et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 16 out. 2020.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, out. 2019.

JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, 1 jan. 2009.

KANG, S.-J. et al. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 12, p. 1477–1486, 5 nov. 2014.

KIDD, T. J. et al. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. **EMBO Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 430–447, 1 abr. 2017.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KOLÁŘ, M.; URBÁNEK, K.; LÁTAL, T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 5, p. 357–363, maio 2001.

LECLERCQ, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 482–492, 15 fev. 2002.

LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 7, p. 3919–3931, 15 jul. 2019.

LIPKIN, R. B.; LAZARIDIS, T. Implicit Membrane Investigation of the Stability of Antimicrobial Peptide β -Barrels and Arcs. **The Journal of Membrane Biology**, v. 248, n. 3, p. 469–486, 28 nov. 2014.

LOHNER, K.; PROSSNIGG, F. Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1656–1666, ago. 2009.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. et al. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 342–348, fev. 1996.

MAZZARIOL, A. et al. AcrAB Efflux System: Expression and Contribution to Fluoroquinolone Resistance in *Klebsiella* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3984–3986, dez. 2002.

MIHAJLOVIC, M.; LAZARIDIS, T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1798, n. 8, p. 1485–1493, ago. 2010.

MORAVEJ, H. et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 24, n. 6, p. 747–767, 2018.

NASEEM, A. et al. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 268, 28 mar. 2016.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252–275, 1 maio 2017.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 119–146, jun. 2009.

OLIVEIRA, J. T. A. et al. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, v. 157, p. 10–21, fev. 2019.

OMARDIEN, S. et al. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1860, n. 11, p. 2404–2415, nov. 2018.

PÉREZ-LLARENA, F. J.; BOU, G. Proteomics As a Tool for Studying Bacterial Virulence and Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 31 mar. 2016.

PENG, B.; LI, H.; PENG, X. Proteomics approach to understand bacterial antibiotic resistance strategies. **Expert Review of Proteomics**, v. 16, n. 10, p. 829–839, 3 out. 2019.

PEVERELLI, M. G. et al. Dimerization of Bacterial Diaminopimelate Decarboxylase Is Essential for Catalysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 18, p. 9785–9795, 29 abr. 2016.

RAJA, A. F. et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 54, 2011.

RAMAZI, S. et al. A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. **Database**, v. 2022, 1 jan. 2022.

RIMA, M. et al. Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1095, 10 set. 2021.

SINGH, V.; SINGH, K.; BAUM, K. The Role of Methionine Sulfoxide Reductases in Oxidative Stress Tolerance and Virulence of *Staphylococcus aureus* and Other Bacteria. **Antioxidants**, v. 7, n. 10, p. 128, 28 set. 2018.

SINHA, R.; SHUKLA, P. Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological Interventions and Future Perspectives. **Protein & Peptide Letters**, v. 26, n. 2, p. 79–87, 20 fev. 2019.

SOUZA, P. F. N. et al. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, v. 175, p. 132–145, 1 ago. 2020a.

SOUZA, P. F. N. et al. Antidermatophytic activity of synthetic peptides: Action mechanisms and clinical application as adjuvants to enhance the activity and decrease the toxicity of Griseofulvin. **Mycoses**, v. 63, n. 9, p. 979–992, 1 set. 2020b.

SKÖLD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3/4, p. 261–273, maio 2001.

TOOKE, C. L. et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472–3500, ago. 2019.

TORRES, M. D. T. et al. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3547–3567, ago. 2019.

TSAKOU, F. et al. The Role of Proteomics in Bacterial Response to Antibiotics. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 214, 1 set. 2020.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 237–245, 2011.

VARELA, M. F. et al. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 593, 17 maio 2021.

WEBBER, M. A. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9–11, 12 dez. 2002.

YASIR, M.; WILLCOX, M.; DUTTA, D. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. **Materials**, v. 11, n. 12, p. 2468, 5 dez. 2018.

YU, F. et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of *rmtB* and *armA* genes in the same isolate. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 1, p. 57–63, maio 2009.

ZAFFIRI, L.; GARDNER J.; TOLEDO-PEREYRA L. H. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. **Journal of Investigative Surgery**, v. 25, n.2, p. 67-77, 25 abr. 2012.

ZAMORANO, L. et al. Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC β -lactamases or carbapenemases from Enterobacteriaceae: findings from a multicenter study in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5260–5266, 1 set. 2015.

ZHANG, Q.-Y. et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, v. 8, p. 48, 9 set. 2021.