

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**Daniela Sofia Moreira Proença**

Estudo da actividade de lisinas  
codificadas por bacteriófagos que  
infectam *Enterococcus* sp

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientadores:**

Prof<sup>ª</sup>. Doutora Madalena Pimentel (FF/UL)

Doutor Carlos São-José (IMM)

**Co-orientador:**

Prof. Doutor Miguel Garcia (Technophage)

**LISBOA**

**2009**



**n.º de arquivo**

**“Copyright”**

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**Daniela Sofia Moreira Proença**

Estudo da actividade de lisinas codificadas  
por bacteriófagos que infectam

*Enterococcus* sp

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientadores:**

Prof<sup>a</sup>. Doutora Madalena Pimentel (FF/UL)  
Doutor Carlos São-José (IMM)

**Co-orientador:**

Prof. Doutor Miguel Garcia (Technophage)

**LISBOA**

**2009**

## Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Madalena Pimentel, pela orientação e pelo apoio prestado que tornou possível a realização desta dissertação.

Agradeço ao Professor Doutor Miguel Garcia, co-orientador deste trabalho, por me ter possibilitado as condições necessárias à realização desta trabalho.

Quero ainda deixar o meu agradecimento especial ao Doutor Carlos São-José, por me ter apoiado em todo o trabalho experimental.

À minha colega de bancada, Sofia Fernandes, deixo o meu agradecimento por toda a amizade e pelo companheirismo sempre prestado ao longo deste ano de trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, Clara Leandro, Filipa Silva, e Sara Lourenço agradeço toda a colaboração e partilha de conhecimentos na realização do trabalho experimental.

Agradeço profundamente à minha tia Paula que fez o papel de mãe e de amiga, por toda a disponibilidade incansável e por todo o apoio emocional sempre prestados em todos os momentos .

Ao Marcelo deixo o meu agradecimento especial pela paciência, pela ajuda, pela compreensão e pelo apoio incondicional sempre demonstrado.

A todos os meus amigos deixo o meu agradecimento pelo apoio e estímulo sempre prestados que tornaram possível a realização desta dissertação.

O último agradecimento deixo-o aos meus pais por toda a paciência, incentivo, ajuda, compreensão sempre demonstrados em todas as etapas da minha vida.



## **Abreviaturas**

**As unidades não são abreviaturas**

**Amp** sensibilidade à ampicilina

**ATCC** *American Type Culture Collection*

**bp** pares de bases

**DNA** ácido desoxirribonucleico

**DO** densidade óptica

**EDTA** ácido etilenodiamino tetra-acético

**EN** *Enterococcus* sp

**EFS** *Enterococcus faecalis*

**EFM** *Enterococcus faecium*

**LB** meio Luria Bertani

**MCS** local de clonagem múltiplo

**MRSA** *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

**MSSA** *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina

**PBS** solução salina tamponada por fosfatos

**PCR** reacção de polimerização em cadeia

**PEG** polietileno glicol

**RNA** ácido ribonucleico

**rpm** rotações por minuto

**SDS-PAGE** electroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio

**Tween 20** monolaurato de polioxietileno – sorbitano





## Resumo

As endolisinas são proteínas codificadas no genoma de bacteriófagos de DNA de cadeia duplas. São produzidas na fase tardia do ciclo de vida lítico do fago e apresentam actividade hidrolítica ao nível do peptidoglicano, que permite a libertação da progenia viral. Quando aplicadas exogenamente, como proteínas recombinantes purificadas, a células bacterianas, as endolisinas podem degradar o peptidoglicano causando a lise rápida da célula.

O potencial uso de endolisinas como agentes antibacterianos tem vindo a ser proposto como uma alternativa para combater o aumento significativo de espécies resistentes a antibióticos.

O presente trabalho teve como principal objectivo o estudo da actividade lítica de duas lisinas produzidas pelos fagos F168 e F170, que infectam *Enterococcus sp.*

A análise da sequência aminoacídica das lisinas Lis168 e Lis170 identificou a presença de um domínio CHAP e de um domínio amidase-2 nestas proteínas, respectivamente. Tendo por base esta informação, construiu-se uma proteína quimera, Lis170-168 a fim de avaliar a sua actividade lítica comparativamente às lisinas Lis168 e Lis170

A estratégia adoptada resultou na produção de três amostras proteicas solúveis, que foram testadas sobre *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus sp.*

Dos resultados obtidos concluiu-se que as lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 são activas sobre espécies *Enterococcus sp* e que a Lis170-168 contribuiu para alargar o espectro de acção destas lisinas.



## **Abstract**

Endolysins are double-stranded DNA bacteriophage-encoded proteins produced at the end of a lytic life cycle, designed to attack the peptidoglycan in order to allow the release of the newly synthesized phage particles. Endolysins are also capable of degrading peptidoglycan when applied externally to the cell wall, as purified recombinant proteins, which results in a rapid lysis of the bacterial cell.

The increased antibiotic resistance has drawn the attention to the potential use of phage lysins as antibacterial agents.

The present work aims to study the lytic activity of two lysins from phage F168 and F170 both infecting *Enterococcus* sp.

Amino acid sequence analysis of Lys168 and Lys170 identified a CHAP domain and an amidase-2 domain in these proteins, respectively. With this information a chimeric protein was constructed in order to evaluate the possibility of improving the lytic activity. The strategy drawn allowed the production of soluble proteins, which were used to test the activity against *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and *Enterococcus* sp.

Our overall results led to the conclusion that Lys168, Lys170 and Lys170-168 proteins exhibited antibacterial activity towards *Enterococcus* sp. In addition, Lys170-168 appeared to increase the lytic spectrum.



## Índice

Agradecimentos .....	i
Abreviaturas .....	iii
Resumo.....	v
Abstract .....	vii
Índice.....	ix
1.Introdução.....	1
1.1 Bacteriófagos .....	1
1.1.1 Classificação .....	1
1.1.2 Ciclo de vida .....	3
1.2 Endolisinas fágicas.....	6
1.2.1 Estrutura das endolisinas fágicas.....	7
1.2.2 Modo de acção das endolisinas .....	8
1.3 Terapia fágica.....	9
1.3.1 Uso de endolisinas fágicas como terapia antibacteriana .....	10
1.3.2 Resistência às endolisinas fágicas .....	12
1.3.4 Resposta imunitária às endolisinas .....	13
1.3 Género <i>Enterococcus</i> .....	14
1.3.1 Importância médica .....	14
1.3.2 Endolisinas produzidas por fagos que infectam <i>Enterococcus</i> .....	15
2. Materiais e Métodos .....	17
2.1 Estirpes bacterianas e vectores .....	17
2.2 Pesquisa e caracterização das sequências das lisinas Lis168 e Lis170.....	20
2.3 Construção dos plasmídeos recombinantes .....	20
2.4 Expressão, purificação e quantificação das endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 .....	24
2.4.1 Expressão das endolisinas fágicas Lis168, Lis170 e Lis170-168.....	24

2.4.2	Purificação das endolisinas no sistema de cromatografia <i>AKTA-prime</i> .....	25
2.4.3	Quantificação das endolisinas pelo método de Bradford.....	26
2.5	Actividade lítica das endolisinas em estirpes clínicas .....	26
2.5.1	Actividade lítica em meio sólido em células inviáveis e viáveis .....	26
2.5.2	Actividade lítica em meio líquido .....	27
3.	Resultados .....	29
3.1	Análise da sequência das lisinas Lis168 e Lis170.....	29
3.2	Construção do gene químera <i>lis170-168</i> .....	30
3.3	Construção dos plasmídeos recombinantes .....	33
3.4	Expressão, purificação e quantificação das endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168.....	38
3.4.1	Expressão/Produção das endolisinas fágicas Lis168, Lis170 e Lis170-168 .....	38
3.4.2	Purificação e quantificação das endolisinas no sistema de cromatografia <i>AKTA-prime</i> .....	40
3.5	Actividade lítica das endolisinas em estirpes clínicas.....	43
3.5.1	Actividade lítica em meio sólido.....	44
3.5.2	Actividade lítica em meio líquido .....	46
4.	Discussão dos resultados .....	49
5.	Conclusão .....	53
6.	Perspectivas Futuras.....	55
7.	Bibliografia.....	57







## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1 Bacteriófagos**

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que têm a capacidade de infectar bactérias (Hanlon, 2007 e Duckworh, 1976). São dez vezes mais numerosos que as bactérias no meio ambiente, fazendo dos fagos as entidades mais abundantes na Terra, sendo frequentemente isolados de meios aquáticos (Hanlon, 2007 e Achermann, 2001)).

O estudo dos bacteriófagos, teve início em 1915 quando Frederick W. Twort isolou das fezes de um paciente com disenteria, um “agente infeccioso e filtrável” (Pennazio, 2006). Em 1917, D’Herelle numa investigação independente, ou não (Duckworh, 1976), descobriu uma entidade “antagonista” de bactérias, que provocavam a sua lise em culturas líquidas e levavam à formação de placas de lise na superfície de meios de cultura com agar semeados com bactérias. A designação de bacteriófago foi introduzida por este autor para denominar os “vírus que comem bactérias” (Summers, 2005 e 1999).

O impulso decisivo para o protagonismo dos fagos em Biologia, surgiu com o investigador Delbrück, que formou um grupo de investigação que dava pelo nome de "*phage group*", cujo estudo se focou em perceber o mecanismo de infecção, multiplicação e lise dos fagos (Pennazio, 2006).

#### **1.1.1 Classificação**

Os bacteriófagos são agrupados em 13 famílias tendo em conta a morfologia das suas partículas virais e natureza do ácido nucleico (Figura 1.1 e Tabela 1.1). Os fagos que possuem na sua estrutura uma cauda, pertencem à ordem *Caudovirales* e correspondem a cerca de 96% dos fagos descritos. A cauda pode ser contráctil, característica que define os fagos pertencentes à família *Myoviridae*, ou não contráctil específica dos fagos da família *Siphoviridae* (por exemplo o fago  $\lambda$ ) e *Podoviridae* (Hanlon, 2007 e Matsuzaki *et al.*, 2005), apresentando estes últimos uma cauda curta. Os restantes 4% dos fagos descritos distribuem-se pelas outras 10 famílias.

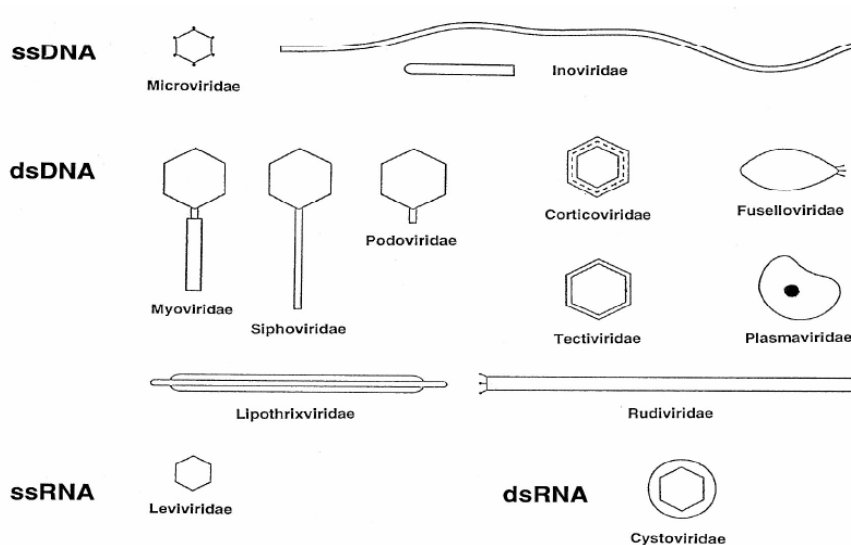


Figura 1.1 – Representação esquemática das 13 famílias descritas para a classificação de bacteriófagos

Tabela 1.1 – Descrição das famílias dos bacteriófagos.

Ordem	Família	Morfologia	Ácido Nucleico	
<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>	Cauda Contráctil	DNA cadeia dupla	
	<i>Siphoviridae</i>	Cauda longa, não contráctil		
	<i>Podoviridae</i>	Cauda curta, não contráctil		
	<i>Tectiviridae</i>	Cápside icosaedra com vesículas lipoproteicas internas		
	<i>Corticoviridae</i>	Cápside icosaedra com camada lipídica		
	<i>Lipothrixviridae</i>	Filamentos, lípidos		
	<i>Plasmaviridae</i>	Pleiomórficos, envelope, lípidos e sem cápside		
	<i>Fuselloviridae</i>			
	<i>Rudiviridae</i>	Helicoidal		
	<i>Inoviridae</i>	Forma redonda com simetria helicoidal		DNA cadeia simples
	<i>Microviridae</i>	Cápside icosaedra		
	<i>Leviviridae</i>	Cápside pseudo-icosaedra		RNA cadeia simples
	<i>Cytoviridae</i>	Envelope, cápside icosaedra, lípidos		RNA cadeia dupla, segmentado

Relativamente à natureza do ácido nucleico, a grande maioria dos fagos apresentam um genoma de DNA em cadeia dupla (dsDNA). Existem fagos que possuem um genoma de DNA

de cadeia simples (ssDNA) (pertencem à família *Inoviridae* e *Microviridae*), ou de RNA em cadeia simples (ssRNA) (da família *Leviviridae*) ou dupla (da família *Cytoviridae*).

### 1.1.2 Ciclo de vida

Os bacteriófagos, como todos os parasitas obrigatórios, não apresentam um ciclo metabólico próprio e dependem do hospedeiro para se manterem e replicarem. Alguns apresentam uma especificidade muito restrita em relação ao hospedeiro, enquanto outros apresentam um espectro de infecção mais abrangente.

Como tal, o ciclo de vida de um bacteriófago ocorre na sua totalidade no interior da célula bacteriana hospedeira. Com base no tipo de ciclo de vida, os bacteriófagos podem ser de dois tipos: fagos líticos, que apresentam um ciclo de vida lítico; ou fagos temperados, que apresentam ciclo de vida lisogénico e lítico (Hanlon, 2007; Matsuzaki *et al.*, 2005; Bernhardt *et al.*, 2002 e Young *et al.*, 2000) (Figura 1.2).

Os bacteriófagos temperados podem realizar um ciclo de vida lisogénico. Os fagos adsorvem à superfície bacteriana, através do reconhecimento de receptores presentes na parede celular e posteriormente injectam o genoma viral na célula hospedeira. O DNA fágico pode, na maioria dos casos, integrar-se no genoma bacteriano, como é o caso do fago  $\lambda$  e a replicação do genoma viral ocorre aquando da replicação do genoma bacteriano, passando para todas as células filhas durante a divisão celular. Em determinadas condições, o genoma viral é excisionado do cromossoma bacteriano podendo ocorrer um ciclo lítico.

No ciclo de vida lítico, as primeiras fases, a adsorção e injeção do DNA, são comuns ao ciclo de vida lisogénico. Depois de atingir o citoplasma, o DNA viral começa a expressar proteínas essenciais à rápida replicação do DNA fágico, seguida da transcrição de genes tardios que codificam para os componentes estruturais. Posteriormente ocorre a encapsidação do genoma viral, levando à formação de partículas virais que se vão acumulando no citoplasma bacteriano. Os novos fagos são libertados após a lise celular, mediada pela produção das proteínas tardias holina e endolisina (Young, 2005).

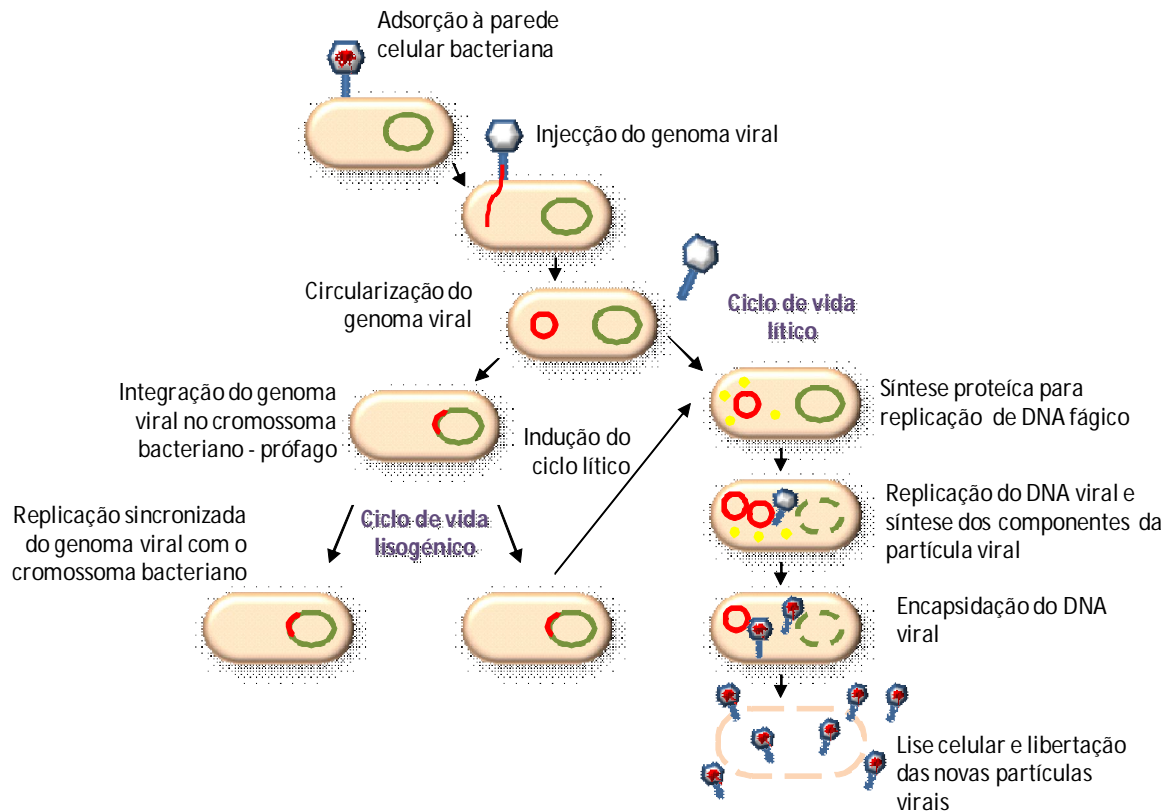


Figura 1.2 - Esquema representativo dos dois tipos de ciclos de vida do fago  $\lambda$  (adaptado de Thiel, 2004).

O sistema lítico holina-endolisina está codificado no genoma de fagos de dsDNA. As endolisinas são enzimas muralíticas com actividade hidrolítica para as ligações específicas que se estabelecem na camada de peptidoglicano. A holina é uma proteína membranar de pequenas dimensões, que tem a capacidade de se integrar na membrana plasmática, conduzindo a uma alteração do potencial de membrana como consequência da abertura de poros na mesma. No modelo de lise do fago  $\lambda$ , a endolisina acumula-se no citoplasma e, após um dado período de tempo geneticamente determinado, a holina integrada na membrana, abre poros letais, através dos quais a endolisina, acede ao peptidoglicano (Figura 1.3) (Young *et al.*, 2000).

Estudos realizados com o fago T4 de *E. coli*, revelaram que as endolisinas são fundamentais para a libertação da progenia viral dada a sua capacidade em hidrolisar o peptidoglicano. Num estudo em que se substituiu o gene que codifica para a endolisina do fago T4 por uma outra proteína sem actividade lítica, verificou-se que durante a infecção fágica e após a multiplicação do fago, a célula era destruída mas a progenia viral não era libertada. (Thiel, 2001).

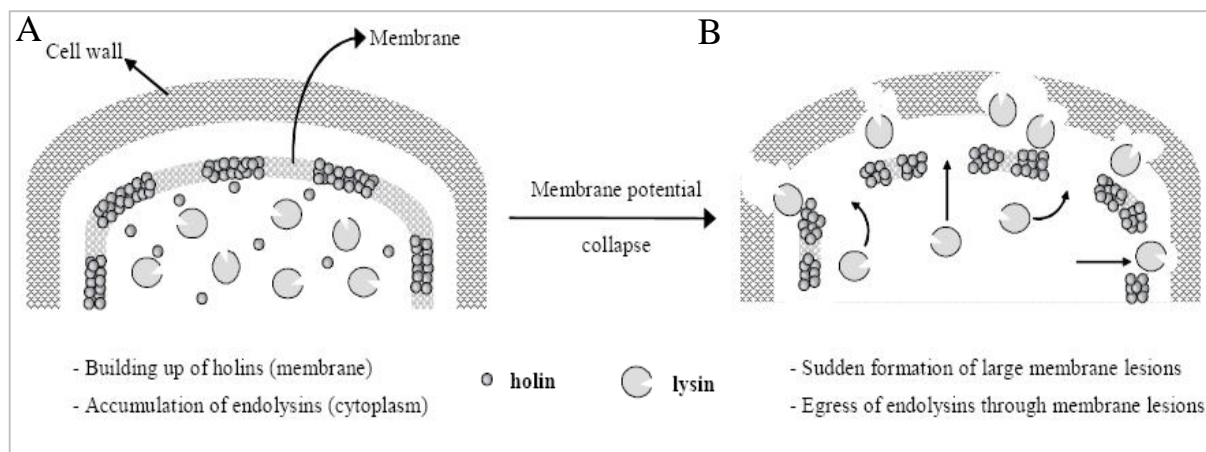


Figura 1.3 – Modelo representativo da lise provocada pela infecção do fago  $\lambda$  (sistema lítico holina-lisina). (A) As endolisinas acumulam-se no citoplasma e as holinas integram-se na membrana citoplasmática. (B) As holinas oligomerizam e formam poros letais na membrana permitindo que as endolisinas atravessem estes poros e acedam à camada de peptidoglicano, hidrolisando-o (São-José *et al.*, 2003).

Actualmente sabe-se que existem fagos que produzem endolisinas cujo transporte não é dependente da holina, utilizando os sistemas de transporte bacterianos, para acederem ao substrato. Estas lisinas em particular, apresentam na sua estrutura uma sequência sinal, que permite a translocação da proteína, através do sistema *sec* (translocase) do hospedeiro, pela membrana citoplasmática até ao espaço periplásmico (Figura 1.4). Na literatura já estão descritas lisinas deste tipo, que apresentam no domínio N-terminal um péptido sinal, como é o caso da Lys44 produzida pelo fago de *Oenococcus oeni*, fOG44 (São-José *et al.*, 2000) e a lisina do fago  $\Phi$ gle de *Lactobacillus plantarum* (Kakikawa, 2002). Noutros casos, de que é exemplo a lisozima Lyz do colifago P1 (Xu *et al.*, 2005 e Xu *et al.*, 2004), a sequência aminoacídica apresenta na extremidade N-terminal uma região de carácter hidrofóbico, designada por *Signal-Arrest-Release* (SAR), que permite igualmente, o transporte da endolisina através do sistema *sec*, com a particularidade de não ser clivada. Apesar de nestes casos a holina não participar no transporte da endolisina, pensa-se que possa desempenhar um papel na activação de lisinas que se encontram no espaço periplásmico e na determinação do tempo de lise (São-José, *et al.*, 2007 e Xu *et al.*, 2004). Pensa-se que este sinal esteja associado à desregulação da membrana provocada pela integração das moléculas de holina nesta estrutura (São-José *et al.*, 2003). Alguns fagos codificam uma proteína adicional designada por anti-holina que permite uma regulação apertada do programa lítico (Young, 2005).

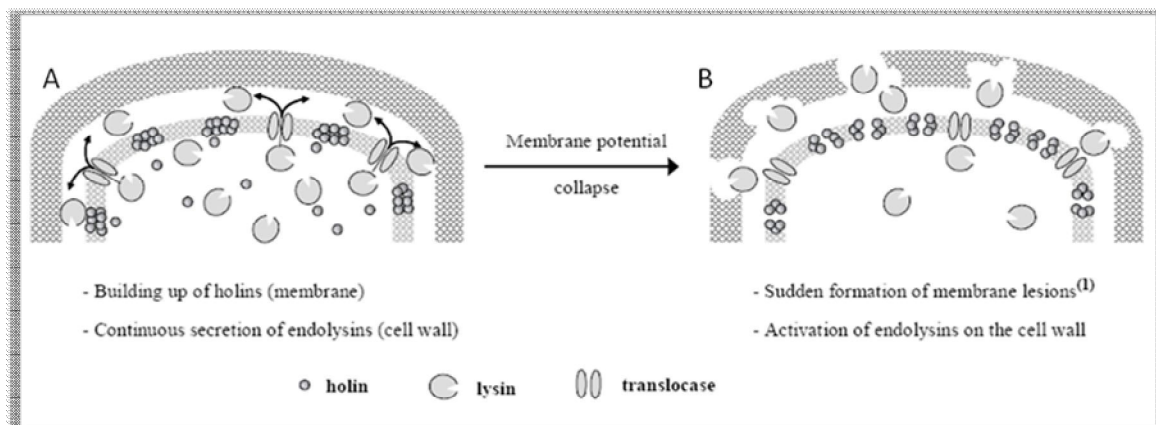


Figura 1.4 – Mecanismo lítico mediado por holinas e endolisinas portadoras de péptido sinal. (A) A endolisina é translocada pelo sistema sec para o espaço periplásmico, onde se acumula. A holina integra-se na membrana citoplasmática. (B) A holina oligomeriza abrindo poros na membrana desregulando o potencial de membrana, seguindo-se a degradação do peptidoglicano pela lisina (São-José *et al.*, 2003).

Para além do modelo holina-endolisina, existem outros fagos líticos que, como consequência do seu pequeno genoma, codificam uma única proteína lítica que interfere com o mecanismo de síntese da camada de peptidoglicano. São exemplo a lisina E do fago  $\Phi$ X174 (ssDNA) (Bernhardt *et al.*, 2000 e Young *et al.*, 2000), a lisina L do MS2 (ssRNA) e a lisina A2 do Q $\beta$  (RNA de cadeia simples) (Karnik e Billeter, 1983).

Em contraste com o que ocorre no ciclo de vida de fagos líticos e temperados, no ciclo de vida dos fagos filamentosos (família *Inoviridae*), ocorre um fenómeno curioso que consiste na fusão dos fagos com a membrana da célula, dando-se a libertação das partículas virais do hospedeiro sem que ocorra destruição da célula hospedeira (Russel e Model, 2005).

## 1.2 Endolisinas fágicas

A designação de endolisina surgiu em 1958 para designar uma substância lítica proteica, sintetizada nas células bacterianas durante a multiplicação de um fago, com capacidade de actuar na parede celular a partir do interior da bactéria (Jacob *et al.*, 1958).

### 1.2.1 Estrutura das endolisinas fágicas

Como já foi referido, as endolisinas são produzidas na fase mais tardia do ciclo de vida de infecção do fago. Muitas destas proteínas apresentam uma estrutura modular composta por dois domínios com funções distintas: um domínio catalítico e um domínio de ligação à parede celular (Figura 1.5) (Diaz *et al.*, 1990 e Garcia *et al.*, 1990). Na região N-terminal localiza-se o domínio catalítico (representado a amarelo e azul na Figura 1.4), que pode exibir diferentes actividades catalíticas consoante o tipo de ligação que hidrolisam (Loessner, 2005 e Young, 1992). Já são conhecidas lisinas fágicas que possuem nesta região 2 ou mais domínios catalíticos com actividade distinta, associados ao mesmo domínio de ligação (Navarre *et al.*, 1999).



Figura 1.5 – Estrutura básica de uma lisina fágica. A amarelo e a azul estão representados dois domínios catalíticos distintos, localizados na região N-terminal. A cinzento com a letra L está localizado o *linker*, sequência aminoacídica que liga os dois domínios. A cor-de-rosa está representado o domínio de ligação, que se localiza na região C-terminal (Fischetti, 2008; Fischetti, 2005).

Na região C-terminal localiza-se o domínio de ligação (representado a cor-de-rosa) à parede celular, que se liga a uma molécula específica presente nesta estrutura (Lopez *et al.*, 1997; Lopez. *et al.*, 1992 e Garcia *et al.*, 1988). Este domínio, para além de contribuir para a eficácia da actividade enzimática na hidrólise do peptidoglicano, é responsável pela especificidade da endolisina, visto que o substrato do domínio de ligação apenas se encontra em bactérias sensíveis à acção das lisinas (Hermoso *et al.*, 2003). Os dois domínios funcionais estão ligados entre si por uma sequência *linker* (representado a cinzento e pela letra L).

Apesar do domínio C-terminal desempenhar a função de ligação da endolisina à parede celular, nem sempre é requerido para que ocorra actividade lítica. Estudos efectuados por Vasala *et al.*(1995) mostraram que a truncagem da região C-terminal, domínio catalítico, da lisina Mur (lisina do fago LL-H de *Lactobacillus delbrueckii*) mantém a sua capacidade lítica mesmo na ausência da região C-terminal.

A estrutura modular das endolisinas foi demonstrada experimentalmente através de análise enzimática por mutação na região C-terminal (Loessner *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2003 e Navarre *et al.*, 1999), da construção de enzimas quimeras funcionais (Lopez *et al.*, 1997) e através de cristalografia de raios-X (Hermoso *et al.*, 2001).

A estrutura modular das endolisinas é bastante vantajosa pois torna possível conjugar domínios catalíticos de umas enzimas com domínios de ligação de outras enzimas, resultando em enzimas diferentes com um espectro de acção mais alargado (Weiss *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 1997 e Garcia *et al.*, 1990). Um estudo realizado por Garcia e colaboradores, consistiu em trocar o domínio catalítico de uma autolisina de *S. pneumoniae*, com o domínio de ligação de uma lisina produzida por um bacteriófago das mesma espécie, criando uma nova enzima com a capacidade de clivar outra ligação do peptidoglicano (Lopez *et al.*, 1997 e Croux *et al.*, 1993). Esta tecnologia permite desenhar enzimas com uma elevada especificidade e com actividade catalítica variada.

### 1.2.2 Modo de acção das endolisinas

Como já foi referido anteriormente, as endolisinas actuam ao nível da camada de peptidoglicano. O peptidoglicano que é composto por várias cadeias de açúcar amino N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, ligadas entre si por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas e cadeias tetrapeptídicas ligadas ao grupo lactil do ácido murâmico, através de uma ligação amida (Donovan *et al.*, 2006).

As endolisinas têm como alvo as diferentes ligações que se estabelecem entre os constituintes do peptidoglicano. Tendo em conta o tipo de ligação que hidrolisam, as endolisinas são divididas em 5 classes principais (Figura 1.6): (i) amidase N-acetilmuramoil-L-alanina; (ii) endopeptidase L-alanoil-D-glutamato; (iii) endopeptidase intraespecífica; (iv) N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase e (v) N-acetil- $\beta$ -D-muramidase (também conhecida como muramoil-hidrolase) (Fischetti *et al.*, 2008; Fischetti *et al.*, 2005; Loessner, 2005; Fischetti *et al.*, 2004 e Young *et al.*, 2000).

De um modo geral, as lisinas de bacteriófagos que infectam bactérias Gram-positivas, quando aplicadas exogenamente, são activas para a espécie bacteriana da qual deriva o fago que as produziu. Por exemplo, enzimas produzidas por fagos de *Pneumococcus* apenas lisam pneumococos (Loeffler *et al.*, 2001 e Nelson *et al.*, 2001). Outro exemplo, é o caso da lisina



produzida por um fago de *Streptococcus* do grupo C (a endolisina PlyC), que apresenta actividade enzimática contra estreptococos dos grupos A, C e E e ainda tem acção sobre *S. uberis* e *S. equi*, mas não apresentam qualquer acção sobre estreptococos da flora comensal da cavidade oral humana (Borysowski *et al.*, 2005).

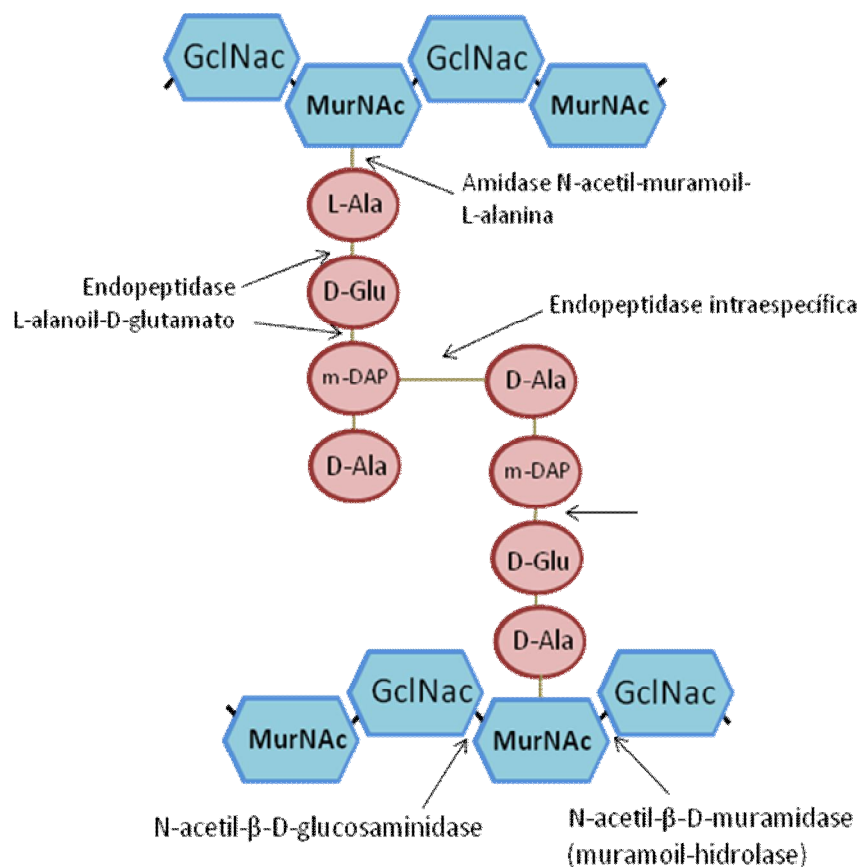


Figura 1.6 – Esquema representativo dos alvos das endolisinas no peptidoglicano. Abreviaturas: GclNac, N-acetil glucosamina; m-DAP, ácido meso-diaminopimelico; MurNAc, ácido murâmico N-acetil; L-ala, L-alanina; D-Ala, D-alanina; D-Glu, D-glutamato (adaptado de Loessner, 2005).

### **1.3 Terapia fágica**

A terapia fágica consiste na aplicação de bacteriófagos na sua totalidade ou de produtos por eles produzidos, como agentes antibacterianos para combater infecções bacterianas.

O estudo da terapia fágica foi iniciado por Félix d'Herelle, um dos investigador que descobriu os fagos em 1917 (Summers *et al*, 1999). Desde essa data, na Europa de Leste e na antiga União Soviética os bacteriófagos eram usados como tratamento de infecções bacterianas. No entanto, as investigações em terapia fágica foram postas de lado com o aparecimento da era dos antibióticos.

Actualmente, a problemática do crescente aparecimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos, estimulou a necessidade de encontrar alternativas ao uso de antibióticos numa tentativa de ultrapassar esta dificuldade.

A procura de novas terapias eficazes no combate às infecções bacterianas, conduziu as investigações nesta área a voltarem novamente a atenção para a potencial capacidade terapêutica dos bacteriófagos, ou produtos por eles produzidos. Já se encontram registados estudos sobre a utilização de bacteriófagos como tratamento clínico ou mesmo como profilaxia de doenças infecciosas, quer causadas por bactérias Gram-negativas quer causadas por Gram-positivas (Bull *et al.*, 2005 e Matsuzaki *et al.*, 2005) e também no controlo de agentes patogénicos de produtos alimentares, tais como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp (Greer, 2005).

No entanto, a área de maior relevo para o presente trabalho consiste no hipotético uso de produtos com origem fágica, mais concretamente das endolisinas, e não no uso de bacteriófagos na sua totalidade. Estas enzimas fágicas têm vindo a ser estudadas como possíveis novas terapias, em alternativa ou como complemento às terapias de antibióticos já existentes, no combate a infecções provocadas por bactérias resistentes à terapêutica convencional.

### **1.3.1 Uso de endolisinas fágicas como terapia antibacteriana**

As endolisinas parecem constituir uns bons candidatos no combate a bactérias resistentes aos antibióticos convencionais, dado que diferem destes no mecanismo de acção. Estudos recentes revelaram que já existem endolisinas activas contra estirpes de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, como é o caso da PlyC (Jado, 2003; Loeffler *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2001), contra *S. aureus* resistentes à metilcilina, como é o caso da LysK (Horgan *et al.*, 2008 e O'Flaherty *et al.*, 2005) e contra *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina, como é o caso da lisina PlyV12 (Yoong *et al.*, 2004).

Outra questão de elevado interesse, consiste na possibilidade de usar endolisinas no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Nestas bactérias a camada fina de peptidoglicano está rodeada por uma membrana externa impermeável a macromoléculas (Vaara *et al.*, 1992) que, à primeira vista, parece dificultar a actividade das endolisinas quando aplicadas exogenamente (Loessner, 2005). Porém, verificou-se que existe

uma endolisina, produzida por um fago de *Bacillus amyloliquefaciens*, que apresenta a capacidade de lisar a espécie Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* apesar da presença da membrana externa. Esta lisina apresenta na região C-terminal uma sequência aminoacídica com carácter hidrofóbico que permite a passagem da lisina através da membrana externa e o acesso do domínio catalítico ao peptidoglicano (Orito *et al.*, 2004 e Morita *et al.*, 2001).

Uma característica que distingue as endolisinas dos antibióticos convencionais é o seu espectro de acção. Normalmente estas enzimas são específicas para o género da qual deriva o fago que as produz. Pelo contrário, os antibióticos apresentam um espectro de acção muito mais alargado e não havendo distinção entre as bactérias causadores da infecção e as bactérias que constituem a flora comensal do organismo, levando a um desequilíbrio na população bacteriana (Dancer, 2004). Um outro ponto a favor das endolisinas é o facto de até à data ainda não terem sido descritos casos de efeitos secundários no modelo animal.

Por outro lado, as endolisinas podem ser aplicadas em conjugação com antibióticos convencionais, exibindo um efeito sinérgico. Como é o caso da lisina Cpl-1 que, em conjugação com a penicilina, tem a acção aumentada sobre estirpes de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina (Djurkovic *et al.*, 2004).

Grande parte das endolisinas, quando aplicadas exogenamente a uma bactéria apresentam um espectro de actividade lítica, que pode ser determinado por três factores distintos: (i) clivagem de ligações específicas na parede celular; (ii) activação enzimática específica por componentes presentes exclusivamente na parede celular de uma dada bactéria e (iii) especificidade no reconhecimento do substrato e na posterior ligação à parede celular. Como já foi referido, geralmente os espectros de acção de uma lisina fágica restringem-se à espécie bacteriana da qual a enzima deriva (Shuch *et al.*, 2002; Zimmer *et al.*, 2002 e Loeffler *et al.*, 2001), ou ao género (Loessner *et al.*, 2002 e Loessner *et al.*, 1997). No entanto, lisinas com actividade de amidase parecem apresentar um espectro de acção mais alargado do que as outras classes de endolisinas, devido ao facto da ligação amida entre o ácido N-acetil murâmico e o resíduo L-alanina no peptidoglicano ser comum a várias espécies bacterianas (Navarre *et al.*, 1999). Um exemplo é o caso da lisina PlyV12, produzida pelo fago de *Enterococcus*  $\Phi$ 1, que apresentou actividade lítica sobre estirpes de *Streptococcus pyogenes* e de *Staphylococcus aureus* (Yoong *et al.*, 2004)

As endolisinas poderão vir a ser aplicadas nas mais diversas áreas como agentes antimicrobianos: (i) na eliminação de bactérias patogénicas que colonizam a mucosa da

cavidade oral; (ii) no tratamento de infecções bacterianas; (iii) no biocontrolo de alimentos e (iv) na protecção de plantas contra bactérias fitopatogénicas (Parisien *et al.*, 2007; Borysowski *et al.*, 2005 e Payne *et al.*, 2004).

A lisina produzida pelo fago de *Streptococcus* do grupo C, C1, foi a primeira endolisina a ser administrada topicamente como um agente antimicrobiano, para o tratamento de uma infecção na cavidade oral em ratinhos. Esta lisina mostrou ser eficiente na eliminação de várias estirpes de *Streptococcus* dos grupos A e M, e apresentou alguma actividade lítica contra *Streptococcus* dos grupos C e E. As estirpes de *Streptococcus* dos grupos B, D, F, G, L e N parecem ser resistentes à actividade desta lisina (Borysowski *et al.*, 2005).

Na literatura já foram registados estudos do uso intravenoso da endolisina Cpl-1, codificada no fago Cp-1 de pneumococos, em ratinhos previamente infectados com *S. pneumoniae*. Este estudo revelou que a administração da lisina em múltiplas doses, de 12 em 12 horas, era eficaz na eliminação da infecção na totalidade (Loeffler *et al.*, 2003).

A aplicação de produtos fágicos traz algumas vantagens à terapia antimicrobiana convencional: (i) são efectivos contra bactérias patogénicas multi-resistentes; (ii) não alteram a flora comensal do organismo, uma vez que a maior parte das endolisinas são específicas para as espécies alvos; (iii) combatem rapidamente o aparecimento de estirpes patogénicas resistentes a antibióticos; (iv) não se conhecem efeitos secundários no modelo animal; (v) a terapia com fagos ou com os seus produtos requer menos custos que desenvolver um novo antibiótico e (vi) nem os fagos nem os produtos fágicos têm acção contra células eucarióticas (Matsuzaki *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Resistência às endolisinas fágicas

Até à data ainda não são conhecidos mecanismos de resistência às endolisinas. Pensa-se que a razão de não se desenvolverem resistências a estas enzimas, seja o facto de elas se ligarem a moléculas bacterianas essenciais à vida do hospedeiro (Fischetti *et al.*, 2004; Fischetti, 2003 e Loeffler *et al.*, 2001). Esta teoria é suportada pelo facto de lisinas de fagos de pneumococos se ligarem à colina, um amino álcool presente no peptidoglicano, indispensável à viabilidade dos pneumococos (Loeffler *et al.*, 2001). Outra evidência, é o caso da lisina com acção em estreptococos do grupo A que se liga à polirramnose, uma molécula indispensável ao crescimento destas bactérias (Fischetti, 2003).

Alguns estudos de resistências efectuados, quer em meio sólido quer em meio líquido, provaram que a exposição continuada a baixas doses de endolisina não levava ao desenvolvimento de mutantes resistentes às lisinas testadas (Schuch *et al.*, 2002 e Loeffler *et al.*, 2001).

### 1.3.4 Resposta imunitária às endolisinas

Um dos potenciais obstáculos à terapia antimicrobiana com endolisinas, é a resposta imunitária induzida após o tratamento sistémico e de administração oral (Fischetti, 2005). A resposta humoral pode levar à diminuição ou bloqueio total da actividade lítica, principalmente após a aplicação repetitiva em casos de infecção crónica.

Em estudos pré-clínicos realizados em ratinhos sujeitos a um tratamento intravenoso com a endolisina Cpl-1, mostrou-se que a actividade lítica desta enzima não sofreu qualquer diminuição com a presença de anticorpos. Testes *in vitro* realizados com soros de coelhos hiperimunizados para esta lisina, revelaram uma diminuição pouco significativa na actividade lítica da lisina Cpl-1 (Loeffler *et al.*, 2003). Jado e colaboradores verificaram que, após uma segunda administração de lisina nos mesmos ratinhos 10 dias após a primeira administração, a actividade lítica mantinha a sua eficácia (Jado *et al.*, 2003).

Um outro estudo em que se produziram anticorpos contra lisinas de estreptococos e de antrax em coelhos hiperimunizados para estas lisinas, mostrou que não ocorria a neutralização da actividade enzimática das proteínas em causa, provavelmente por estas lisinas apresentarem uma elevada afinidade do domínio de ligação para o seu substrato. Esta explicação pode estar na base da não neutralização das endolisinas pelos anticorpos através da região C-terminal (Fischetti, 2005). O que permanece por explicar é a razão pela qual os anticorpos não neutralizaram as enzimas pela região N-terminal.

Os resultados obtidos por estes testes pré-clínicos, indicam que a aparente imunogenicidade às endolisinas, manifestou-se através da produção de anticorpos. No entanto, a presença destes anticorpos não é suficiente para impedir o uso das proteínas como tratamento de infecções bacterianas. No caso da lisostafina, a conjugação com polietilenoglicol (PEG) diminuiu a ligação dos anticorpos. Apesar da PEGuilação inibir ligeiramente a actividade lítica da lisostafina, verificou-se que aumenta o tempo de meia-vida desta lisina para 24 horas, em comparação com 1 hora, exibida pela enzima sem modificação.

A resposta imunitária e a produção de anticorpos contra as endolisinas é uma questão que merece a devida atenção, no entanto ainda não consiste numa problemática à administração terapêutica de lisinas. Pensa-se que a acção bacteriolítica das endolisinas seja tão rápida, que no fim do seu efeito, ainda não se iniciou a produção de anticorpos.

### **1.3 Género *Enterococcus***

#### **1.3.1 Importância médica**

O género bacteriano *Enterococcus* pertence à família *Enterococcaceae* juntamente com os géneros *Atopobacter*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*. Actualmente este género engloba 40 espécies (<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>), destacando-se as espécies de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, com especial interesse para o presente trabalho. São cocos Gram-positivos, que pode aparecer associados aos pares, diplococos, ou em cadeia, não têm a capacidade de formar esporos, são catalase-negativos, são anaeróbios facultativos e fermentativas. A maior parte das estirpes de *E. faecalis* e *E. faecium* não são hemolíticas.

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* estão documentadas como patogénicos oportunistas nos humanos e, têm vindo a ser associados a infecções humanas. Já na década de 70 e 80, as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foram consideradas as principais responsáveis por doenças nosocomiais. Actualmente são a 4ª principal causa de infecções adquiridas em hospitais (Emori *et al.*, 1993).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* fazem parte da flora comensal do tracto intestinal e da cavidade oral nos humanos (Uchiyama *et al.*, 2008 (a); Uchiyama *et al.*, 2008 (b) e Yoong *et al.*, 2004). Em indivíduos saudáveis a colonização por estas bactérias não conduz a nenhuma condição patológica. No entanto, devido à aquisição de factores de virulência e ao aparecimento de estirpes resistentes a antibióticos, nomeadamente à vancomicina (Deshponde *et al.*, 2007 e Fujita, 2005), começaram-se a registar infecções nosocomiais associadas a enterococos em indivíduos imunocomprometidos (Centikaya *et al.*, 2000; Jett *et al.*, 1994; Johnson, 1994 e Murray, 1990).

As patologias mais comumente associadas a uma infecção por enterococos incluem endocardite, abscesso abdominal e infecções do tracto urinário (Fujita, 2005 e Kayser, 2003).

### 1.3.2 Endolisinas produzidas por fagos que infectam *Enterococcus*

A problemática da aquisição de resistências aos antibióticos de uso comum tem sido cada vez mais observada em espécies do género *Enterococcus*. Existe portanto uma crescente necessidade em trabalhar para se desenvolverem novas terapias antimicrobianas que possam contribuir para controlar esta situação.

A quantidade de endolisinas produzidas por fagos que infectam enterococos, registadas, é ainda muito reduzida. A única lisina deste tipo descrita até hoje é a lisina PlyV12, produzida pelo fago  $\Phi$ 1 que tem acção lítica contra a estirpe V12 de *E. faecalis* (Yoong *et al.*, 2004). A PlyV12 apresenta um domínio catalítico com actividade de amidase que tem acção sobre múltiplas estirpes de *E. faecalis*, incluindo estirpes resistentes à vancomicina. No entanto, a principal característica desta endolisina é o facto de apresentar um espectro de acção que se estende não só a outras espécies do género *Enterococcus*, mas também a espécies fora deste género, como é o caso de algumas estirpes patogénicas de *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Na base desta observação pode estar a partilha de um polímero da parede celular comum a todas as estirpes.

A investigação na área das lisinas é extremamente importante, pois estas enzimas, na sua forma purificada, podem vir a ser utilizadas para fins terapêuticos ou profiláticos, *in vivo*, para eliminar bactérias patogénicas colonizadoras das mucosas, responsáveis por infecções adquiridas na comunidade, infecções nosocomiais, ou que existam na corrente sanguínea, sem afectar a flora circundante normal (Fischetti, 2006, Fischetti *et al.*, 2006 e Fischetti, 2005). Devido aos sérios problemas de bactérias resistentes em hospitais, particularmente estafilococos, pneumococos e mais recentemente enterococos, estas enzimas podem ser um benefício imediato neste tipo de ambientes.

É no seguimento desta linha condutora, que o presente trabalho tem como objectivo a identificação, caracterização e avaliação do potencial antibacteriano, de duas endolisinas fágicas, a Lis168 e Lis170, codificadas respectivamente no genoma de dois fagos de *Enterococcus* designados por F168 e F170.

Na tentativa de melhorar e alargar o espectro de acção destas enzimas, pretende-se ainda construir uma sequência quimera resultante da conjugação do domínio catalítico da Lis170

com o domínio de ligação da Lis168 e registar quais os benefícios de produzir este tipo de enzimas modificadas.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Estirpes bacterianas e vectores

Os vectores pIVEX 2.3d (*Roche*) e pTrCHisA (*Invitrogen*) foram usados para a clonagem dos genes que codificam para as endolisinas Lis168 e Lis170, bem como para o fragmento de DNA que codifica para a quimera Lis170-168. Usou-se como estirpe de clonagem a *E. coli* MRF' XL1-blue (*Stratagene*), crescida em meio *Luria-Bertani* (LB) a 37°C, com agitação, a uma velocidade de 150rpm. As estirpes de expressão usadas foram a *E. coli* CG61 [*E. coli* BL21 (pGP1-2)] (São-José *et al.*, 2000) e *E. coli* BL21, crescidas em meio LB à temperatura de 28°C e 37°C, respectivamente, com agitação e à velocidade de 150rpm. A marca de selecção de ambos os vectores é a ampicilina, sendo esta adicionada ao meio de crescimento numa concentração final de 100µg/mL. O plasmídeo pGP1-2, presente na estirpe de expressão *E. coli* CG61, apresenta resistência à canamicina, sendo esta adicionada ao meio de crescimento numa concentração final de 30µg/mL.

Para o ensaio da actividade lítica das proteínas, foram testadas estirpes clínicas provenientes de amostras biológicas variadas recolhidas em diferentes unidades hospitalares, que estão sumariadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Tabela representativa das estirpes bacterianas de origem clínica utilizadas nos ensaios clínicos para testar a actividade lítica das lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168.

Estirpe	Espécie	Amostra Biológica
1/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Pús
1902/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Líquido ascítico
344/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Exsudado de escara
363/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Líquido pleural
46/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Pús peritoneal
497/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
834/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
838/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
911/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
953/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Exsudado
1130/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Exsudado
1451/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1665/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Pús
1915/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
2092/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
45/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
604/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina

71/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
786/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
993/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Pús
1553/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
556/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
73/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
857/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
882/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
926/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
958/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1113/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
127/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1408/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1409/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1551/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1554/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1558/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1853/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
2/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
2093/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
3/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
307/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
43/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
44/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Pús
563/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
750/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
751/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
81/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
952/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
954/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
1/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
110/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
139/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
158/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemocultura
310/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
311/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
328/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
332/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
514/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
606/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
1000/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Urina
1131/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Pús
1132/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Pús
1607/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Exsudado de escara
1729/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Urina
1793/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Pús
1795/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Urina
1866/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Urina
1903/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Pús

969/05	<i>Enterococcus faecium</i>	Urina
184/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Pús
185/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Cateter
186/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Pús
187/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Pús
188/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Hemocultura
198/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Bilis
226/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Urina
267/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Exsudado anal
268/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Pús
269/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Hemocultura
388/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Hemocultura
389/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Hemocultura
390/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Hemocultura
729/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Líquido pleural
515/07	<i>Enterococcus faecium</i>	Exsudado vaginal
1040/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
1041/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
1271/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
1285/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
140/07	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
1403/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Líquido ascítico
1404/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
1405/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
263/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
1654/05	<i>Enterococcus</i> sp.	Bilis
1710/05	<i>Enterococcus</i> sp.	Cateter
264/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
470/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Pús
992/06	<i>Enterococcus</i> sp.	Urina
1518/05	<i>Enterococcus</i> sp.	Pús
926/05	<i>Enterococcus</i> sp.	Hemocultura
1020/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Líquido sinuial
590/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Pús
586/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	Exsudado
5/06	<i>Staphylococcus</i> <i>haemoliticus</i>	Hemocultura
546/06	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	Urina
1/09	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC
2/09	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC
12/08	<i>Streptococcus</i> grupo A	Exsudado faríngeo
13/08	<i>Streptococcus</i> grupo A	Exsudado faríngeo
3/09	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC
44/08	<i>Escherichia coli</i>	Urina
35/08	<i>Escherichia coli</i>	Urina

As espécies pertencentes aos géneros *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus* usadas neste trabalho foram crescidas a 37°C em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), com agitação de 135rpm. As estirpes clínicas de *E. coli* e as espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* foram crescidas em meio LB a 37°C com agitação de 150rpm. As espécies do género *Streptococcus* foram crescidas em meio *Todd-Heit Yeast* (THY), à temperatura de 37°C sem agitação.

## **2.2 Pesquisa e caracterização das sequências das lisinas Lis168 e Lis170**

Recorrendo a ferramentas de bioinformática, pesquisaram-se os genes que codificam para as lisinas Lis168 e Lis170, respectivamente no genoma dos fagos F168 e F170. Inicialmente identificaram-se os locais de iniciação, como sendo a presença de codões de iniciação da tradução e a sequência de ligação aos ribossomas (*RBS*), utilizando os programas *SECentral* e *Gene Runner*. A pesquisa de sequências homólogas na base de dados foi efectuada usando o programa *BLAST-X* e *BLAST-P* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a análise da sequência aminoacídica recorreu-se ao servidor de proteómica *ExpASY* (*Expert Protein Analysis System*, [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)), ao programa *Predict Protein* (<http://www.predictprotein.org/>) e à base de dados online *Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

## **2.3 Construção dos plasmídeos recombinantes**

O plasmídeo pDP1 foi obtido por clonagem de um fragmento de DNA contendo a sequência nucleotídica que codifica para o gene *lis168*, no vector pIVEX2.3d. O fragmento de DNA de 714pb, foi obtido por reacção de polimerização em cadeia (PCR), com o par de *primers* F168-Nco e F168-Xma (Tabela 2.2), usando o DNA genómico do fago F168 como molde. De seguida, foi purificado usando o *kit* comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), digerido com as enzimas NcoI (Fermentas) e XmaI (Fermentas) e clonado no vector pIVEX2.3d previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição.

O plasmídeo pDP2 foi obtido, por clonagem do gene *lis170* no mesmo vector. O fragmento de 870pb foi amplificado com os *primers* F170-Bsp e F170-Xma (Tabela 2.2), usando como molde o DNA do fago F170, purificado, usando o *kit* comercial referido anteriormente,

digerido com as enzimas de restrição BspI (Fermentas) e XmaI (Fermentas) e clonado no vector pIVEX2.3d, previamente digerido com as enzimas NcoI e XmaI.

O plasmídeo pDP3 foi obtido pela técnica *Overlap Extension PCR*, através da amplificação paralela de parte do gene *lis168*, com os *primer* F168-CWBD e F168-Xma, e de parte do gene *lis170*, com os *primers* F170-Bsp e F170-168 (Tabela 2.2), usando como molde o DNA fágico do fago F168 e do fago F170, respectivamente. Os fragmentos de 279pb e 573pb obtidos foram adicionados à mesma mistura reaccional e procedeu-se a uma segunda reacção de PCR com os *primers* F170-Bsp e F168-Xma (Tabela 2.2). O fragmento de 852pb obtido foi purificado com o *kit* comercial referido anteriormente, digerido com as enzimas BspI e XmaI e clonado no vector pIVEX2.3d, digerido com as enzimas NcoI e XmaI.

As reacções de restrição referidas anteriormente foram efectuadas sequencialmente devido à incompatibilidade entre os tampões das enzimas de restrição. Primeiramente digeriram-se os produtos amplificados e o vector com a enzima NcoI ou BspI, (no caso dos genes *lis170* e *lis170-168*), durante 2h 30min a 37°C. Procedeu-se à inactivação da enzima a 80°C durante 20min. Dialisaram-se as amostras durante 1h com discos de diálise (Millipore) contra água bidestilada e seguiu-se a digestão com a enzima XmaI durante 2h 30min a 37°C. As amostras foram novamente dialisadas pelo método descrito anteriormente.

Tabela 2.2 – Estirpes, plasmídeos e *primers* usados neste estudo.

Estirpe, bacteriófagos, plasmídeos e oligonucleótidos	Descrição	Referência ou marca
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
XL1- Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)]$	Stratagene
CG61	BL21 (pGP1-2)	São-José <i>et al.</i> , 2000
BL21	<i>E. coli</i> B F <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) <i>gal</i> [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )	
<b>Plasmídeos</b>		
pIVEX2.3d	Vector de expressão	Roche
pTrcHisA	Vector de expressão	Invitrogen
pDP1	Gene <i>lis168</i> _ clonado em pIVEX2.3d	Presente estudo
pDP2	Gene <i>lis170</i> clonado em pIVEX2.3d	
pDP3	Gene <i>lis170-168</i> clonado em pIVEX2.3d	
pDP4	Gene <i>lis168</i> _ clonado em pTrcHisA	
pDP5	Gene <i>lis170</i> clonado em pTrcHisA	
pDP6	Gene <i>lis170-168</i> clonado em pTrcHisA	
<b>Oligonucleótidos (5'-3')</b>		

F168-Nco	<u>gATTCATCCATggTTAAATTA</u> AAATgATgTACTTAgC	
F168-Xma	TCTTATACCC <u>gggTA</u> ACTTAACTTgTggATAAgC	
F168-Bam	gAT <u>ggATCCgTTAAATTA</u> AAATgATgTACTTAgCT	
F168-Pst	CTTCTgCAgTTATAACTTAACTTgTggATAAgC	
F168-CWBD	AAgCCTAAACCACCTgCACC	Presente estudo
F170-Bsp	gTTAATTCATgACA <u>ggAgAAgTATTTAgTAGCTTg</u>	
F170-Xma	AAATCTACCC <u>gggAgATTTTTTAgTAATACCTACTA</u>	
F170-Bam	gTT <u>ggATCCgCAggAgAAgTATTTAgTAGCT</u>	
F170-Pst	AATCTgCAgTTAAgATTTTTTAgTAATACCTACTA	
<b>F170-168</b>	<u>CTggTTTTggTgCAggTggTTTAggCTTTggCTCCggCTTAACTgCATTgTTAgAgC</u>	
pTrc HisA-1	gAggTATATATTAATgTATCg	
pTrc HisA-2	TCggATCATgACgATCCTgg	
pIVEX-T7 terminator	gCTATTATgCTCAGCgg	
pIVEX-T7 promoter	ATTAATACgACTCACTATAgg	

A sublinhado simples estão indicados os locais de restrição incluídos nos oligonucleótidos. O duplo sublinhado indica a região complementar ao *primer* F168-CWBD

O plasmídeo pDP4 foi obtido de forma semelhante aos anteriores. Amplificou-se o gene *lis168* com os *primers* F168-Bam e F168-Pst (Tabela 2.2), usando como molde o DNA do fago F168. O fragmento de 714pb obtido foi purificado do mesmo modo já referido, digerido com as enzimas BamHI (Fermentas) e PstI (Fermentas) e clonado no vector pTrcHisA, igualmente digerido com as mesmas enzimas.

Para a construção do plasmídeo pDP5, amplificou-se o gene *lis170* com os *primers* F170-Bam e F170-Pst (Tabela 2.2), usando como molde o genoma do fago F170. O fragmento de 870pb foi purificado e digerido com as enzimas BamHI e PstI, clonado no vector pTrcHisA, previamente digerido com as mesmas enzimas.

O plasmídeo recombinante pDP6 obteve-se do seguinte modo: efectuou-se uma amplificação paralela de parte do gene *lis168*, com os *primers* F168-CWBD e F168-PstI (Tabela 2.2), e de parte do gene *lis170*, com os *primers* F170-Bam e F170-168. Obtiveram-se dois fragmentos cada um com 279pb e 573pb, que foram adicionadas à mesma mistura reaccional e sujeitas a uma nova reacção de PCR com os *primers* F170-Bam e F168-PstI (Tabela 2.2). O fragmento obtido com 852pb foi purificado seguindo o método já referido, clivado pelas enzimas de restrição BamHI e PstI e clonado no vector pTrcHisA, também ele clivado pelas mesmas enzimas.

O vector pTrcHis A e os fragmentos amplificados a clonar neste vector foram digeridos duplamente durante 2h 30min a 37°C. Após a digestão, as enzimas foram inactivadas pelo calor e as amostras foram dialisadas, pelo método descrito anteriormente.

Antes da reacção de ligação ambos os vectores e os produtos amplificados digeridos foram, novamente purificados usando o mesmo *kit* comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), seguindo as instruções do fabricante.

A mistura reaccional de todas as reacções de PCR, cuja composição está resumida na Tabela 2.3, foi sujeita às seguintes condições: 1min a 95°C; 35 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 58°C e 2min a 72°C; e 10min a 72°C. As reacções ocorreram no termociclador *BioRad MyCycler* (Bio-Rad).

Tabela 2.3 – Condições da mistura reaccional das reacções de PCR.

Mistura Reaccional de PCR	Concentração final
Tampão da polimerase	1x
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM
DNA molde	2 ng/μL
dNTP's (Fermentas)	0,25mM
Primer Fw	0,4pmol/ μL
Primer Rev	0,4pmol/ μL
DNA polimerase <i>Pfu</i> (Fermentas)	0,025U/μL

Depois de preparados os vectores e os fragmentos a clonar, procedeu-se a reacção de ligação. Este passo consistiu na preparação de uma mistura reaccional de vector digerido e inserto digerido numa proporção de 1:2, 2,5U de T4 DNA ligase (Biolabs) e tampão da enzima a 1x, num volume total de 20μL. A mistura reaccional foi incubada à temperatura ambiente durante 10min.

As construções obtidas foram inseridas na estirpe de clonagem *E. coli MRF' XLI-blue*, por choque térmico, usando a solução de transformação (50mM de MgSO<sub>4</sub>, 5% de DMSO, 5g/L de extracto de levedura, 10g/L de triptona, 10g/L de NaCl e 10% de PEG) (Chung, C. T. *et al*, 1988).

As colónias positivas para a presença dos plasmídeos recombinantes foram seleccionadas, numa primeira fase, por PCR. A selecção consistiu em preparar várias misturas com aliquotas de 10 colónias transformantes cada e efectuou-se uma reacção de amplificação usando o par de *primers* pIVEX-T7 promoter e pIVEX-T7 terminator, para seleccionar os plasmídeos pDP1, pDP2 e pDP3. Os *primers* pTrc HisA-1 e pTrc HisA-2 foram usados para seleccionar os plasmídeos pDP4, pDP5 e pDP6. Nestas reacções de PCR usou-se a enzima polimerase *GoTaq Flexi DNA* (Promega) e as condições foram: 1min a 95°C; 35 ciclos de 1min a 95°C,

1min a 56°C e 1:15min a 72°C; e 10min de extensão a 72°C. A composição da mistura reaccional está resumida na Tabela 2.3. Os clones positivos foram seleccionados pela presença ou ausência de um gene que codifica para a endolisina, através da análise do peso molecular dos produtos de amplificação após electroforese em gel de agarose a 0.7% com 10µg/mL de Brometo de Etídio, realizada a 80V durante 45min. Usou-se o marcador de pesos moleculares *1Kb Plus DNA* (Invitrogen). A selecção dos clones recombinantes com actividade lítica foi efectuada em meio LB suplementado com 0,7% de agar e 0,1% de Triton-X100, ao qual foram incorporados 2% de células hospedeiras dos fagos F168 (EN1518/05) e F170 (EN926/05), previamente autoclavadas durante 45min a 120°C. As colónias positivas foram seleccionadas para extracção do DNA plasmídico, usando o *kit* comercial *Pure Link Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen). As amostras de DNA foram quantificadas no aparelho Nanodrop (*ND-1000 Spectrophotometer*).

## **2.4 Expressão, purificação e quantificação das endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168**

### **2.4.1 Expressão das endolisinas fágicas Lis168, Lis170 e Lis170-168**

Para a expressão das lisinas, os plasmídeos recombinantes foram previamente introduzidos de acordo com o procedimento descrito anteriormente em *E. coli* BL21 (derivados do pTrcHisA) e em *E. coli* CG61 (derivados do pIVEX) (Tabela 2.2). Para a expressão de proteína a partir de plasmídeos recombinantes derivados do pTrcHisA usaram-se 200mL de células que foram multiplicadas a 37°C com uma agitação de 150rpm até à DO de 0,3-0,5, altura em que se induziu a expressão proteica por adição de 1mM de IPTG, prolongando o crescimento por mais 3h. Para a expressão das lisinas através dos derivados recombinantes do pIVEX, multiplicaram-se 200mL de células a 28°C a uma agitação de 150rpm até à densidade óptica (DO) de 0,3-0,5, altura em que a expressão foi induzida por choque térmico durante 45min a 42°C, prolongando-se o crescimento por mais 3h a 37°C. De seguida as células foram centrifugadas a 8000g durante 30min e ressuspensas em 10ml de tampão de equilíbrio (Tabela 2.5) suplementado com 1x de cocktail anti-protease (Roche). As células foram lisadas por sonicação no sonicador *Dutty Cicle Vibra cell* (Sonics Materials) em ciclos de 1min durante 10min e centrifugadas a 8000g, para a separação da fracção solúvel da insolúvel.



As amostras proteicas foram analisadas por *Sodium Dodecyl Sulphate- Poliacrilamide Gel Electroforesis* (SDS-PAGE) com o sistema *Mini Protein Tetra Cell* (Bio-Rad), preparando-se os géis de poliacrilamida a 11%, que foram sujeitos a uma voltagem de 180V durante 45min. Um dos géis foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* (0,25% de azul brilhante *Coomassie* R250, 50% de metanol, 10% de ácido cítrico) durante 1h à temperatura ambiente com agitação constante, seguido de uma descoloração com uma solução de 10% de ácido acético e 30% de metanol. O 2º gel foi utilizado para *Western-Blot*. Para a transferência utilizou-se o sistema de transferência *Mini Transblot Module* (Bio-Rad). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose *Hybond-C* (Amersham Biosciences), entre quatro folhas de papel de filtro embebidas em tampão de transferência (48mM de Tris, 39mM de glicina, 0,4% de SDS e 10% de metanol). Aplicou-se de seguida uma corrente eléctrica de 200mA durante 60min. A membrana foi de seguida bloqueada com PBS-T (137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,02% de Tween-20) suplementado com 5% de leite magro em pó durante a noite a 4°C. Após este tempo, lavou-se a membrana 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS-T e incubou-se a mesma com Anticorpo anti-His (Roche) diluído a 1:5000, durante 1h à temperatura ambiente e com agitação suave. Lavou-se novamente a membrana 3 vezes, 15min cada vez, com PBS-T. Por fim procedeu-se à revelação usando o *kit* comercial *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare).

As fracções solúveis obtidas após a expressão proteica foram testadas quanto à sua capacidade lítica em células de enterococcus autoclavadas incorporadas em agar.

#### **2.4.2 Purificação das endolisinas no sistema de cromatografia AKTA-prime**

Para a purificação, as amostras lisadas foram previamente filtradas utilizando um filtro de poro 0,2µm (Millipore). As proteínas foram purificadas segundo um gradiente de imidazole, no sistema de cromatografia *AKTA-prime* (GE Healthcare), utilizando uma coluna de níquel (Qiagen). Todas as soluções usadas (Tabela 2.5) foram filtradas num filtro de poro 0,45µm (Nalgene).

Tabela 2.5 – Composição e designação das soluções tampão usadas no processo de purificação das endolisinas fágicas.

Soluções tampão de purificação	Composição	Concentração de Imidazole
<b>Tampão de Equilíbrio</b>	20mM de HEPES, 500mM de NaCl, 1mM de DTT e 1% de glicerol. pH8.0	10mM
<b>Tampão de Lavagem</b>		30mM
<b>Tampão de Eluição</b>		250-500 mM
<b>Tampão da Lisina</b>	50mM Fosfato, 500mM NaCl, 1mM de DTT e 25% glicerol. pH8.0	0

No final da purificação foi efectuada uma troca de tampão, substituindo o tampão de eluição pelo tampão de lisina, usando uma coluna de *disalting* (Quiagen) de modo a remover o imidazole da amostra proteica. As amostras foram armazenadas a -20°C.

### 2.4.3 Quantificação das endolisinas pelo método de Bradford

As endolisinas fágicas obtidas foram quantificadas pelo método de Bradford usando o *kit* comercial *Protein Assay Standard II* (Bio-Rad) e a albumina bovina (BSA) como padrão. Usou-se o *MicroAssay*, seguindo as instruções do fabricante. Deste modo, construiu-se uma recta padrão baseada nos valores de absorvância, a 595 nm, obtidos para as concentrações, num intervalo de 1 a 20 µg/ml, de BSA, a partir da qual foi calculada a equação da recta utilizada para determinar a concentração das amostras analisadas.

## 2.5 Actividade lítica das endolisinas em estirpes clínicas

### 2.5.1 Actividade lítica em meio sólido em células inviáveis e viáveis

A actividade lítica das endolisinas foi inicialmente testada em células não vivas de *Enterococcus*, nomeadamente nas estirpes EN1518/05 e EN926/05, hospedeiras dos fago F168 e F170, respectivamente. Para o efeito as células foram multiplicadas até à DO de 0,8-1,0, centrifugadas a 8000g durante 30min e ressuspensas num volume de água bidestilada estéril, de modo a ficarem a uma concentração de 0,4g/mL. As células foram inviabilizadas a 120°C durante 45min num autoclave. Incorporaram-se 2% de células em tampão de incorporação

(25mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250mM de NaCl e 0,5mM de DTT, a pH8) suplementado com 0,7% de agar. Depois de solidificado o agar, aplicaram-se 5µg, 1 µg , 0,2 µg e 0,04 µg de cada uma das lisinas, em volumes de 10µL. A actividade lítica foi evidenciada pela presença de halos líticos no local da aplicação das lisinas após incubação das placas 16-18 horas a 37°C.

A actividade lítica das endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 foi testada nas estirpes clínicas referenciadas na Tabela 2.1, do mesmo modo descrito anteriormente, excepto o passo de inviabilidade das células pelo calor.

### **2.5.2 Actividade lítica em meio líquido**

Para testar a actividade em meio líquido foram utilizadas as estirpes hospedeiras de cada um dos fagos que deram origem às lisina em estudo. As células foram crescidas até à DO de 0,3, concentradas duas vezes por centrifugação a 8000g durante 20 minutos às quais se adicionaram 10µg de lisina. A actividade foi medida através da leitura da densidade óptica, a 600nm, ao longo do tempo. O ensaio foi realizado em meio de cultura BHI e em tampão de incorporação.



### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Análise da sequência das lisinas Lis168 e Lis170**

Os fagos F168 e F170 são constituídos por dsDNA com cerca de 58 e 40Kb, respectivamente, e infectam espécies do género *Enterococcus*. Uma análise da sequências nucleotídicas dos fagos F168 e F170, permitiu identificar os genes *lis168* e *lis170*, os quais são constituídos por 714 pares de base (pb) e 870pb, respectivamente.

Os genes *lis168* e *lis170* codificam para as endolisinas Lis168 e Lis170, que são constituídas por 237 e 289 aminoácidos, respectivamente, tripartidas num domínio catalítico, num domínio de ligação e numa sequência *linker* que une os dois domínios, o que está de acordo com o descrito para outras endolisinas (Diaz *et al.*, 1990 e Garcia *et al.*, 1990).

Recorrendo ao programa de bioinformática BLAST-P, verificou-se que a Lis168 apresenta homologias maioritariamente com proteínas codificadas em fagos que infectam *Staphylococcus*, tendo sido a Ply187 do fago 187, uma hidrolase da parede celular, a proteína com maior percentagem de identidade, 42%. A mesma análise foi realizada para a Lis170, a qual revelou que esta enzima apresenta 99% de identidade com uma potencial amidase codificada num fago de *Enterococcus*.

Com o objectivo de pesquisar a existência de domínios na sequência aminoacídica recorreu-se à base de dados online *Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e foi possível determinar que a endolisina Lis168 tem um domínio catalítico CHAP (*Cistein, Histidine dependent aminohydrolases/peptidases*), compreendido entre o aminoácido 12 e 137, domínio este presente em endolisinas com actividade de endopeptidase. A análise da sequência da lisina Lis170, revelou a presença de um domínio Amidase-2 localizado entre o aminoácido 17 e o 162 (Figura 3.1).

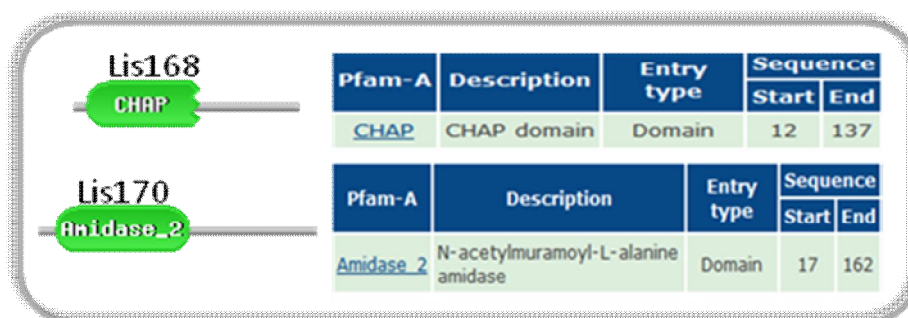


Figura 3.1 – Esquema representativo dos domínios catalíticos e sua sequência aminoacídica das lisinas Lis168 e Lis170.

A sequência aminoacídica correspondente ao *linker* foi determinada recorrendo ao programa *Domain Linker Prediction* (<http://www.tuat.ac.jp/>), que forneceu a informação das regiões mais flexíveis das lisinas. Esta informação em conjugação com a previsão da estrutura secundária das lisinas Lis168 e Lis170 prevista no site *Predict Protein* (<http://www.predictprotein.org/>), em que foram identificadas regiões com estrutura em *coil* possíveis de corresponderem à sequência do *linker*, permitiu identificar as sequências **VIRPPYEAESKPKPPAPKPKPNLQ** e **SNNVVKPEPSKPTPSKPSNNKNKEG**, como sendo o *linker* das lisinas Lis168 e Lis170, respectivamente.

A massa molecular e o ponto isoeléctrico (PI) das lisinas foram determinados através do servidor de proteómica *ExpASY* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) recorrendo ao programa *Protein Parameters*. A Lis168 apresenta uma massa molecular de 26kDa e um PI de 6,03 e a Lis170 possui uma massa molecular de 31kDa e um PI de 7,02.

### **3.2 Construção do gene quimera *lis170-168***

Com o objectivo de construir uma endolisina com um espectro de acção mais alargado e sabendo que, tal como foi referido, a actividade catalítica amidase-2 apresenta um espectro de acção mais alargado que as restantes classes de endolisinas, construiu-se uma sequência quimera *lis170-168*, que resultou da junção da sequência nucleotídica correspondente ao domínio amidase-2 da Lis170 com a sequência nucleotídica correspondente ao domínio de ligação da Lis168. A estratégia utilizada para construir a quimera Lis170-168 está representada na Figura 3.2.

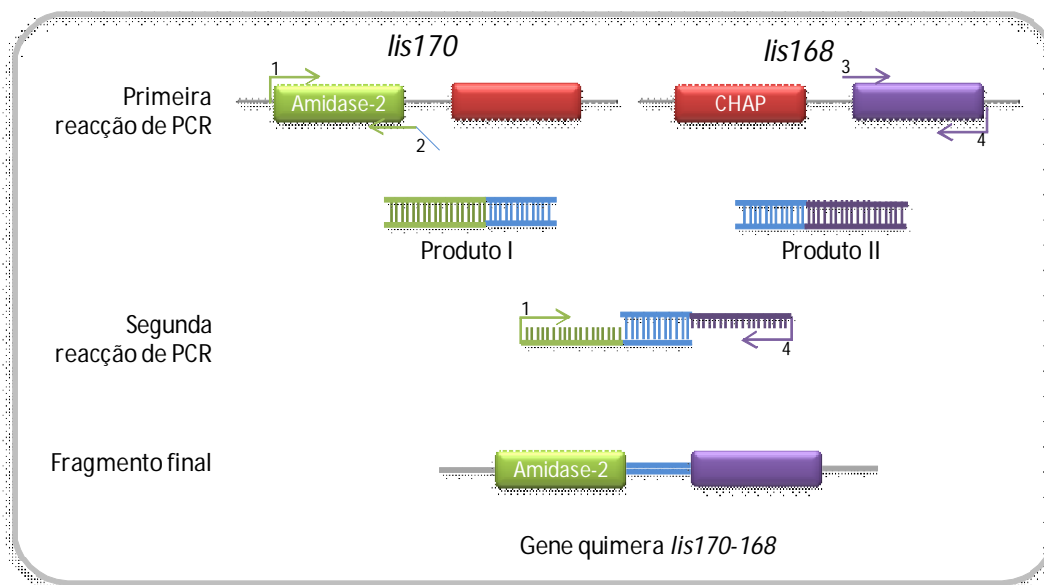


Figura 3.2 – Esquema representativo da construção da quimera *lis170-168*. Os produtos amplificados I e II foram obtidos na primeira PCR e serviram de molde à segunda reacção.

Numa primeira fase, as sequências correspondentes a cada um dos domínios foram amplificadas por PCR usando *primers* específicos para estas regiões, tal como representado na Figura 3.2. Ao *primer forward* que hibrida no gene *lis170* (*primer 1*, Figura 3.2) e ao *primer reverse* que hibrida no gene *lis168* (*primer 1*, Figura 3.2), foi adicionada uma sequência reconhecida por enzimas de restrição, de modo a permitir a posterior inserção dos fragmentos em vectores de clonagem. Ao *primer reverse* que hibrida nos primeiros 29 nucleótidos da sequência *linker* na extremidade 3' do gene *lis170*, foi adicionada uma sequência de 31 nucleótidos complementar à sequência *linker* do gene *lis168* (*primer 3*, Figura 3.2). Os fragmentos obtidos nesta reacção de PCR serviram de molde a uma segunda reacção de amplificação, de modo a sintetizar um fragmento contendo os dois domínios, ligados por uma sequência *linker*, e flanqueado por duas sequências de restrição.

Os fragmentos amplificados na primeira reacção de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose e os resultados obtidos estão representados na Figura 3.3.

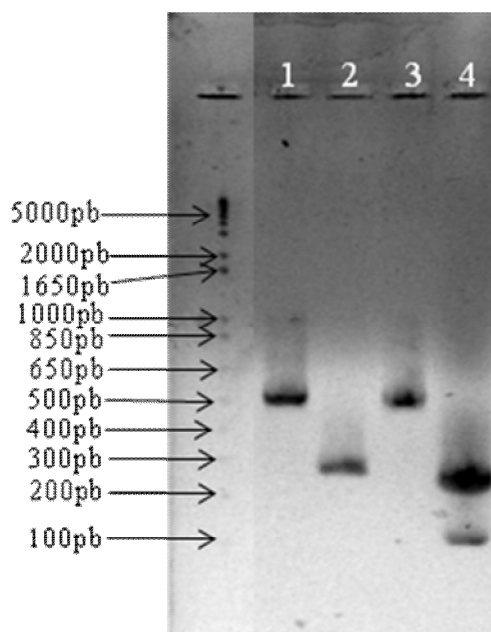


Figura 3.3 – Análise dos fragmentos amplificados na primeira reacção de PCR para a construção da sequência quimera *lis170-168*. As bandas 1 e 3 correspondem à amplificação da sequência nucleotídica do domínio catalítico da Lis170, apresentam 579pb; as bandas 2 e 4 correspondem à amplificação da sequência nucleotídica do domínio de ligação da Lis168, apresentam 279pb.

Como se pode observar, os fragmentos obtidos apresentam o peso esperado, ou seja, 579pb para o produto I e 279pb para o produto II (Figura 3.2). Posteriormente, estes fragmentos foram adicionados a uma mesma mistura reaccional, de modo a servirem como molde a uma segunda reacção de PCR, usando os *primers* Lis170-forward e Lis168-reverse (1 e 4 na Figura 3.2). A amplificação de um produto com 852pb foi posteriormente confirmada por electroforese em gel de agarose (Figura 3.4). Este fragmento apresenta na extremidade 5' o local de restrição BspI e na extremidade 3' o local XmaI incluídos nos *primers* F170-Bsp (Lis170-forward) e F168-Xma (Lis168-reverse), de modo a ser inserido no vector pIVEX, nos mesmos locais de restrição. Paralelamente construiu-se um fragmento de modo idêntico, em que a extremidade 5' contém o local de restrição BamHI e a extremidade 3' o local de restrição PstI, de modo a ser inserido no vector pTrcHisA nos mesmos locais de restrição.



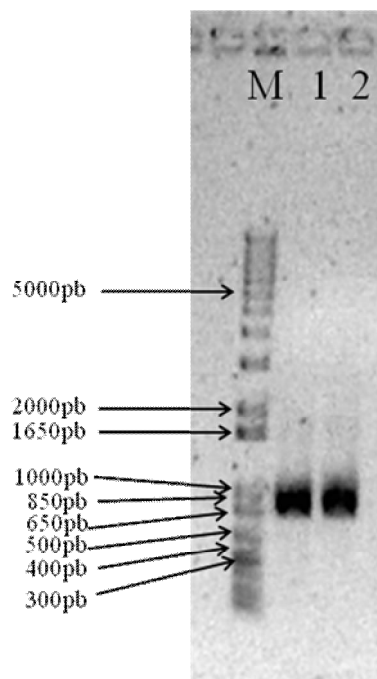


Figura 3.4 – Análise do fragmento quimera *lis170-168*. A banda M corresponde ao marcador de massa molecular usado. A banda 1 corresponde à sequência *lis170-168* que será clonada no vector pIVEX. A banda 2 corresponde ao mesmo fragmento que será clonado no vector pTrcA.

A análise da sequência aminoacídica da quimera Lis170-168, no programa *Protein Parameters* permitiu o cálculo da massa molecular e do PI, desta lisina, que foram, respectivamente 31kDa e 7,17.

### **3.3 Construção dos plasmídeos recombinantes**

Inicialmente as sequências nucleotídicas que codificam para as lisinas Lis168 e Lis170 foram amplificadas por PCR, usando os *primers* contendo locais de restrição de modo a permitir a inserção em vectores de expressão. Os resultados desta reacção de amplificação estão representados na Figura 3.5.

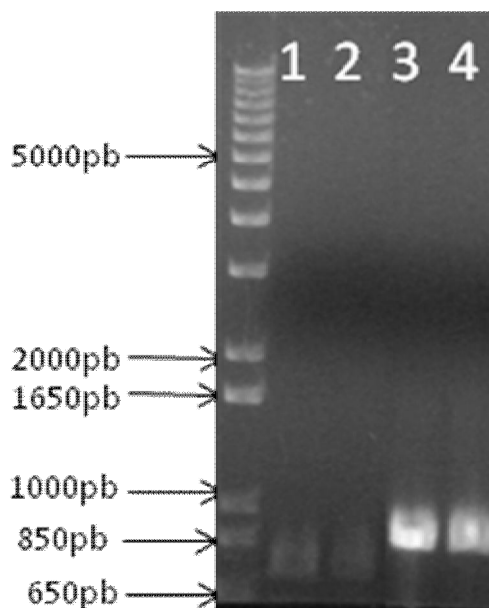


Figura 3.5 – Análise dos produtos amplificados dos genes *lis168* e *lis170*. As bandas 1 e 2 correspondem à amplificação do gene *lis168*, que possui 714pb. As bandas 3 e 4 correspondem à amplificação do gene *lis170*, que possui 870pb. Os fragmentos das bandas 1 e 3 foram clonados no vector pTrcA e os fragmentos das bandas 2 e 4 foram clonados no vector pIVEX.

As bandas 1 e 2, na Figura 3.5, correspondem ao fragmento de 714pb amplificado do gene *lis168* e as bandas 3 e 4 com 879pb correspondem ao gene *lis170*.

Depois de amplificados os genes que codificam as endolisinas, procedeu-se à reacção de restrição com as respectivas enzimas. Os fragmentos amplificados a clonar no vector pTrcA, assim como o próprio vector, foram digeridos com as enzimas BamHI e PstI. No caso das clonagens no vector pIVEX, este e o gene *lis168* foram digeridos com as enzimas NcoI e XmaI, no entanto, o fragmento quimera *lis170-168* e o gene *lis170* foram digeridos com as enzimas BspI e XmaI.

Os 3 genes obtidos por amplificação, *lis168*, *lis170* e *lis170-168*, foram clonados no vector de expressão pIVEX dando origem aos plasmídeos pDP1, pDP2 e pDP3, respectivamente e no vector pTrcHisA originando aos plasmídeos pDP4, pDP5 e pDP6, respectivamente (Figura 3.6).

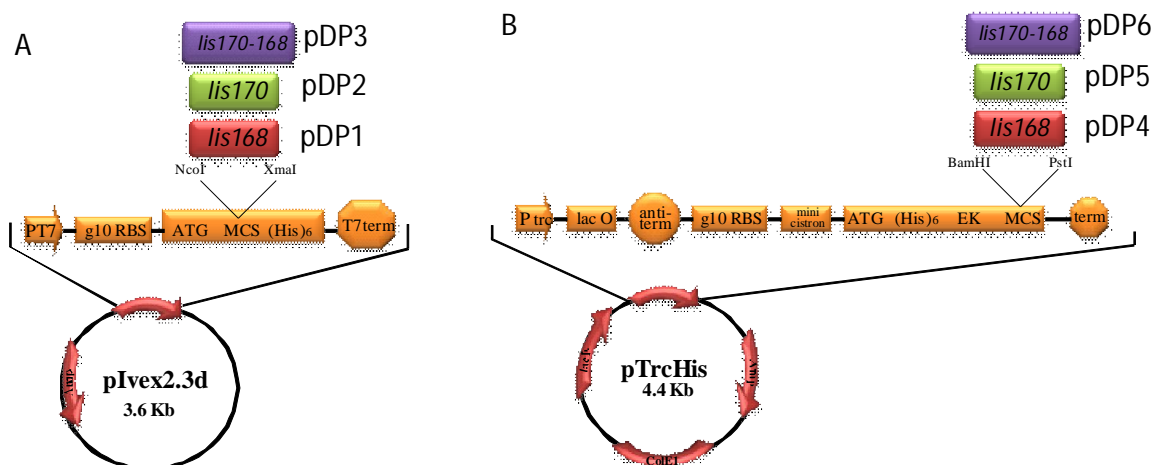


Figura 3.6 – Esquema representativo dos 6 plasmídeos recombinantes obtidos neste trabalho. (A) Plasmídeos derivados do pIVEX. (B) Plasmídeos derivados do pTrcHisA.

O plano adoptado para a produção das lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 consistiu em usar dois sistemas de expressão em *E. coli* distintos ao nível de expressão da proteínas, variando quer o promotor quer o número de cópias do plasmídeo, por forma a ultrapassar possíveis problemas de solubilidade e quantidade de proteína expressa. O vector pTrcHisA permite a expressão de proteínas sob a regulação do promotor *trc* (*trc-lac*). A jusante ao promotor existe uma sequência que codifica para um péptido de fusão constituído por uma cadeia de 6-Histidinas seguida por 26 aminoácidos adicionais, localizada na região N-terminal. A vantagem em usar este vector está relacionada com o facto de produzir um número baixo de cópias, que facilita a purificação de proteínas com tendência a formar agregados insolúveis (corpos de inclusão). O vector pIVEX2.3d proporciona uma elevada expressão de proteína sob a regulação do promotor forte T7. Adiciona um péptido de fusão na região C-terminal constituído por 5 aminoácidos extra e uma cadeia de 6-Histidinas.

A fim de se obter uma amostra de DNA plasmídico recombinante, transformou-se a estirpe de clonagem *E. coli* XL1-blue MRF' com as 6 construções. A selecção dos clones transformantes foi efectuada, numa primeira fase, a partir de misturas contendo 10 colónias transformantes cada e se efectuou uma reacção de PCR com os *primers* F168-Bam e pIVEX-T7 *promoter* (específicos para seleccionar o plasmídeo pDP1). Este procedimento permitiu identificar as misturas positivas para a presença do fragmento *lis168* (Figura 3.7.A). Numa

segunda fase, analisaram-se isoladamente as 10 colónias transformantes constituintes de uma das misturas positivas, pelo mesmo método (Figura 3.7.B).

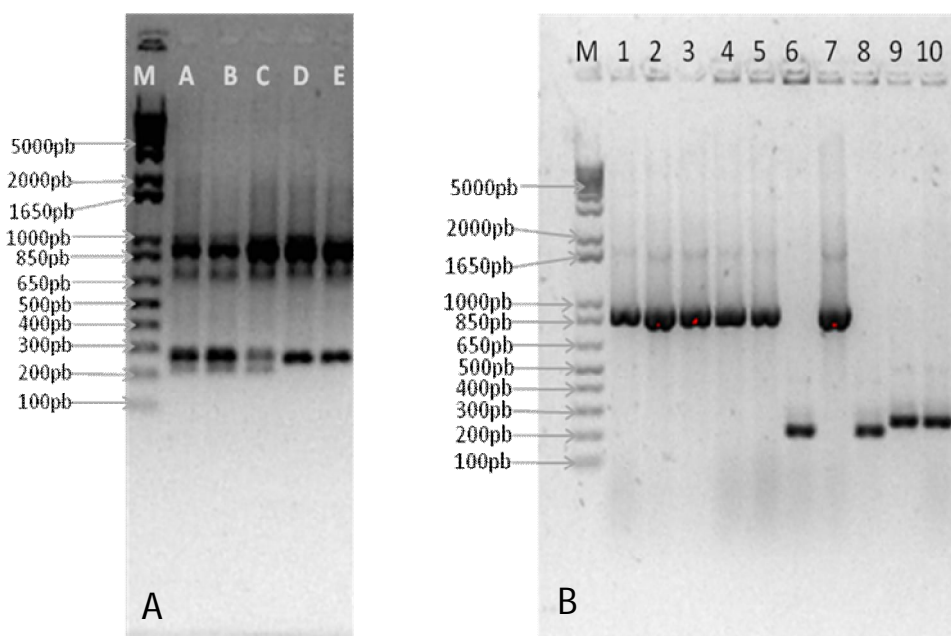


Figura 3.7 – Análise dos transformantes obtidos após a transformação com o plasmídeo recombinante pDP1. (A) Análise em gel de agarose de 5 misturas contendo 10 colónias cada (A a E). (B) Análise em gel de agarose das 10 colónias que constituem a mistura A (1 a 10). A banda M corresponde ao marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

A figura 3.7.A corresponde ao resultado da selecção de uma mistura de 10 colónias positiva para a presença do plasmídeo recombinante pDP1. Os transformantes que contém o fragmento de DNA inserido dão origem a um produto de PCR de 714pb enquanto que na sua ausência obtém-se um produto com 300pb. A Figura 3.7.B corresponde à análise individual das 10 colónias transformantes que constituem a mistura A. Verifica-se que os transformantes 1, 2, 3, 4, 5 e 7, são positivos para a presença do fragmento *lis168*. Pelo contrário, os transformantes 6, 8, 9 e 10, não contém o inserto. A selecção das restantes 5 construções foi efectuada de modo semelhante ao descrito.

Os transformantes portadores dos plasmídeos recombinantes, foram avaliados quanto à capacidade de lisar células de enterococos. Para o efeito, incorporaram-se paredes celulares de enterococos num meio de cultura sólido, sobre o qual se repicaram os transformantes portadores dos plasmídeos recombinantes pDP1, pDP2, pDP3, pDP4, pDP5 e pDP6. Após 18

horas de incubação, as colónias positivas foram evidenciadas pela presença de um halo de lise. Os resultados obtidos para as culturas contendo os plasmídeos pDP1, pDP2 e pDP3 estão representados na Figura 3.8.

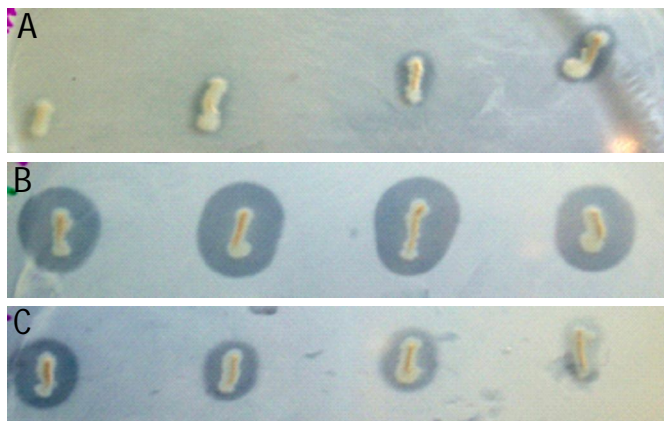


Figura 3.8 – Actividade lítica das colónias transformantes capazes de produzir as lisinas na conformação activa, onde é possível observar-se os halos de lise. (A) Estão representadas colónias positivas para o plasmídeo recombinante pDP1. (B) Estão representadas colónias positivas para o plasmídeo recombinante pDP2. (C) Estão representadas colónias positivas para o plasmídeo recombinante pDP3.

Tal como se pode verificar, a endolisina Lis170 é a que apresenta uma maior actividade (Figura 3.8.B). Enquanto que a Lis168 é a que evidencia menor actividade lítica. O facto de se observar um halo de lise, indica que as endolisinas estão a ser produzidas na conformação activa.

De seguida extraiu-se o DNA plasmídico das 6 construções recombinantes e a confirmação da correcta inserção dos fragmentos foi obtida por digestão enzimática com as enzimas que reconhecem as sequências de restrição flanqueadoras dos insertos, e posterior sequenciação (Macrogen, Coreia do Sul).

### **3.4 Expressão, purificação e quantificação das endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168**

#### **3.4.1 Expressão/Produção das endolisinas fágicas Lis168, Lis170 e Lis170-168**

Com o objectivo de produzir as endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168, introduziram-se os plasmídeos pDP1, pDP2 e pDP3 na estirpe de expressão de *E. coli* CG61. Esta estirpe contém o vector pGP1-2, o qual possui o gene que codifica a T7 RNA polimerase, cuja expressão é induzida por choque térmico. O aumento de temperatura cliva o repressor CI857 codificado no mesmo plasmídeo, permitindo a transcrição da referida enzima. Os plasmídeos recombinantes pDP4, pDP5 e pDP6 foram introduzidos na estirpe de *E. coli* BL21.

Foi possível obter a expressão das proteínas de interesse a partir de ambos os vectores. Assim foram seleccionados para os ensaios seguintes os plasmídeos recombinantes derivados do vector pIVEX, tendo em conta as vantagens associadas à expressão de proteínas neste vector, descritas anteriormente.

As fracções obtidas durante a expressão das lisinas foram analisadas em SDS-PAGE corado com *coomassie brilliant blue* e por imunodeteção da cadeia de 6-Histidinas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.9.

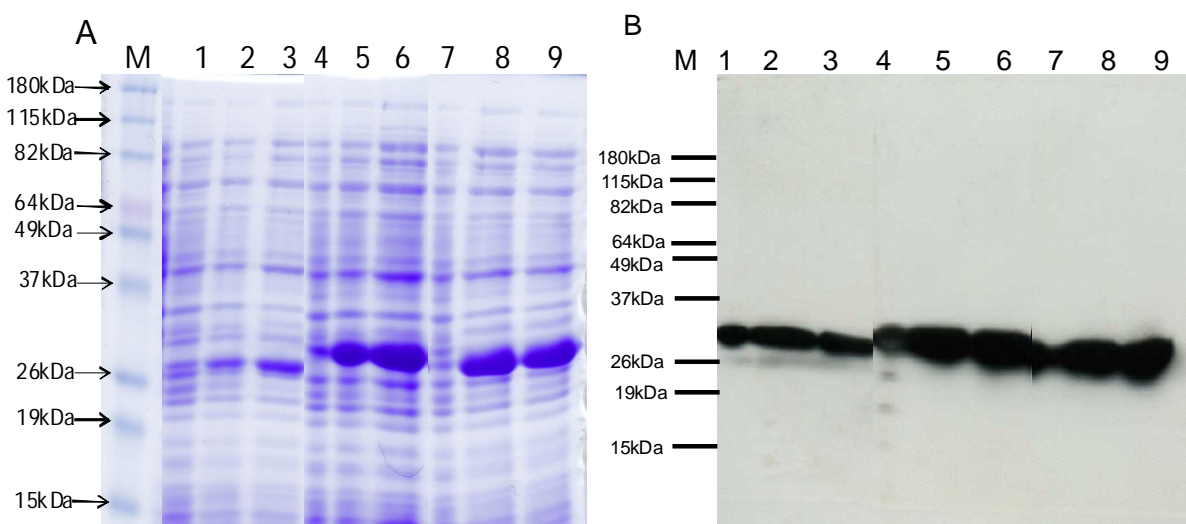


Figura 3.9 - Análise das fracções insolúveis e solúveis obtidas antes e depois de induzida a expressão das lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 por SDS-PAGE. (A) Coloração com *coomassie brilliant blue*. (B) Imunodeteção da cauda de 6-Histidinas. M corresponde ao marcador de massa molecular. As restantes pistas correspondem à amostra obtida antes da indução (1, 4 e 7), e após indução fracção insolúvel (2, 5 e 8) e solúvel (3, 6 e 9). As

pistas 1, 2 e 3 são referentes à expressão da Lis168, as pistas 4, 5 e 6 correspondem à Lis170 e as pistas 7, 8 e 9 dizem respeito à Lis170-168.

Observando os resultados obtidos da expressão proteica, é possível identificar, no gel corado com *coomassie brilliant blue* (Figura 3.9.A), a presença das bandas com o peso molecular de 28, 33 e 31kDa, que correspondem respectivamente às lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168. Verifica-se ainda que, para todas as enzimas, as fracções solúveis apresentam uma quantidade considerável de proteína solúvel. Este resultado é confirmado por *Western-blot* (Figura 3.8.B), em que se usou um anticorpo para detectar a cadeia de 6-Histidinas, onde se pode observar a presença das mesmas três bandas.

Com o objectivo de se verificar a existência de actividade lítica nos extractos proteicos solúveis, efectuou-se um ensaio preliminar em células autoclavadas de *Enterococcus sp* EN926/05 e *Enterococcus sp* EN1518/05, hospedeiras dos fagos F168 e F170, respectivamente. Sobre as células incorporadas em meio sólido aplicaram-se as fracções solúveis obtidas após a expressão das endolisinas em estudo. Após 3 horas de incubação a 37°C, houve o aparecimento de halos de lise no local da aplicação (Figura 3.10).

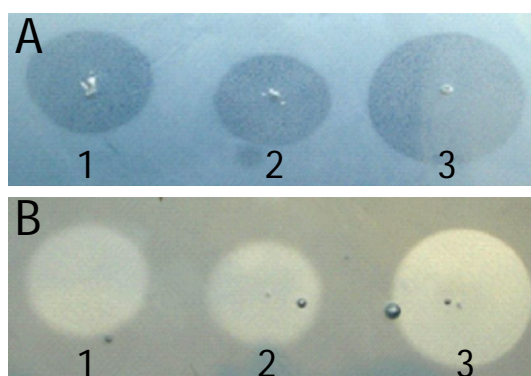


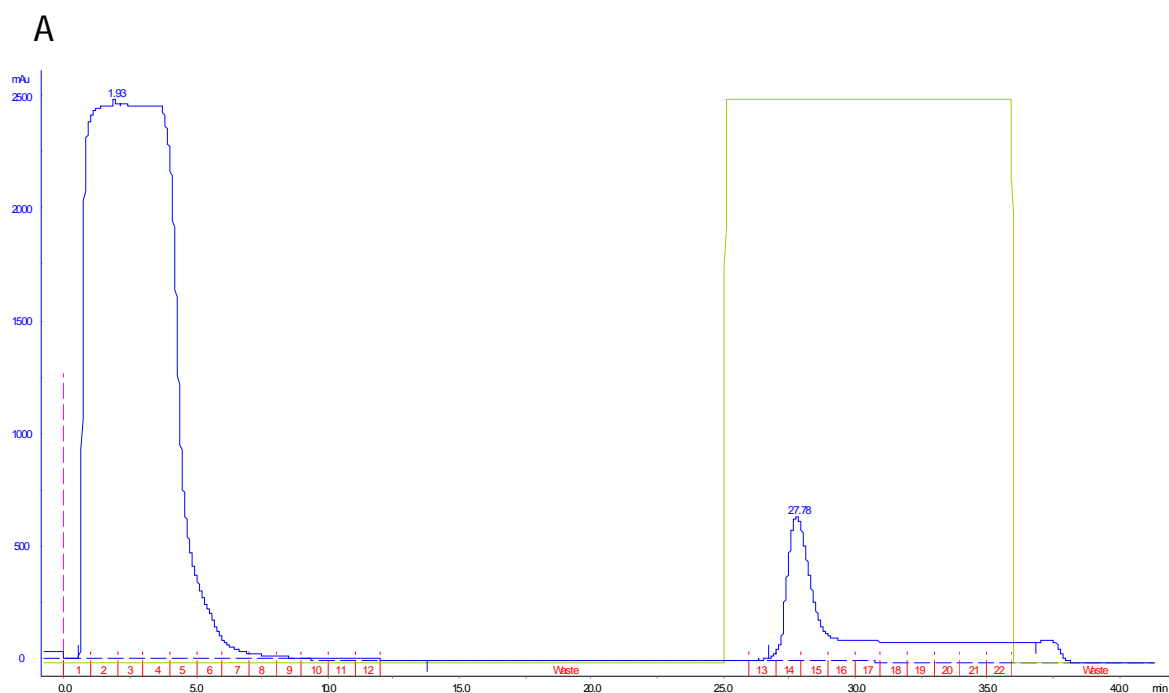
Figura 3.10 – Actividade das fracções solúveis das endolisinas fágicas em estirpes de *Enterococcus*. (A) Lis170-168 (halo 1), Lis168 (halo 2) e Lis170 (halo3) na estirpe EN926/05. (B) Lis170-168 (halo 1), Lis168 (halo 2) e Lis170 (halo3) na estirpe EN1518/05.

Analisando os resultados obtidos neste ensaio, verificou-se que as três lisinas têm a capacidade de lisar as células das estirpes hospedeiras dos fagos F168 e F170, evidenciando um halo de lise no local da aplicação dos extractos proteicos solúveis. A lisina Lis170 é

aquela que apresenta o maior halo lítico, sugerindo que seja a mais activa. Pelo contrário, a lisina Lis168 foi aquela que apresentou o menor halo de lise, indicando que esta é a menos activa. A Lis170-168 foi igualmente activa nas duas estirpes testadas. Estas observações são concordantes com os resultados obtidos na selecção dos transformantes, descrita anteriormente. Como controlo negativo utilizou-se a fracção solúvel de extractos que contém apenas o vector pIVEX, sem inserto, não se tendo observado halos de lise. Mais uma vez, os resultados são indicativos de que as lisinas estão a ser expressas na sua conformação activa e a presença das 6-Histidinas parece não afectar a actividade das enzimas.

### 3.4.2 Purificação e quantificação das endolisinas no sistema de cromatografia AKTA-prime

Visto que as três lisinas fágicas são solúveis, procedeu-se à purificação das mesmas numa coluna de afinidade Ni-NTA usando o sistema cromatográfico AKTA-prime (GE-Healthcare). Todo o processo de purificação das três lisinas foi acompanhado num cromatograma através da medição da absorvância a 280nm (Figura 3.11).





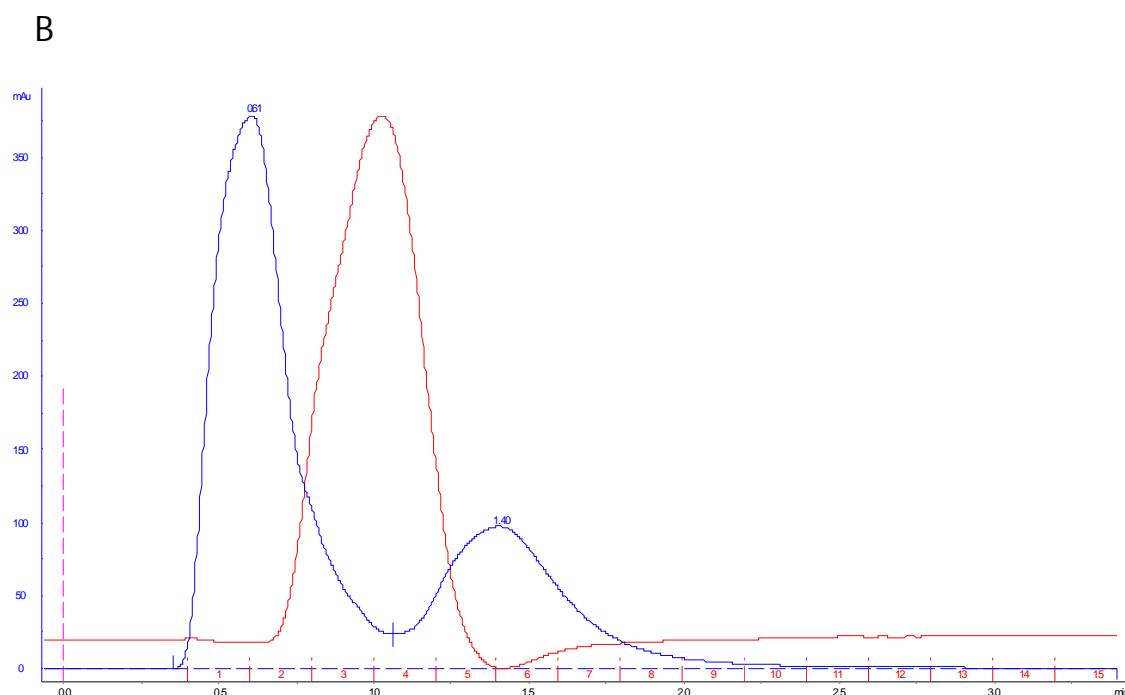


Figura 3.11 – Cromatogramas referentes à purificação da proteína Lis170-168, em que (A) diz respeito à amostra eluída da coluna de afinidade e (B) corresponde à amostra obtida após a troca de tampão. A verde está indicada a concentração de imidazole, a azul está indicada a absorvância, a vermelho a condutividade, os número a vermelho identificam as fracções obtidas e o tracejado rosa corresponde ao ponto de injeção da amostra na coluna.

Ambos os cromatogramas apresentam no eixo dos yy unidades de absorvância e no eixo dos xx o tempo (em minutos) a que cada fracção foi obtida. No cromatograma A é possível verificar-se que após a injeção da amostra no sistema de purificação, a absorvância aumentou significativamente, indicando a presença de proteína. Observa-se ainda que em simultâneo com o aumento da concentração de imidazole, é recolhida uma amostra com elevada absorvância, indicativo de que esta fracção corresponde à proteína de interesse. A análise desta fracção por SDS-PAGE comprova que a proteína eluída corresponde à proteína de interesse, pois após coloração com *coomassie brilliant blue* pode detectar-se a presença de uma banda com 31kDa correspondente à Lis170-168 na pista 3 (Figura 3.12.C).

O cromatograma B corresponde à troca de tampão da proteína, realizada com o objectivo de eliminar o imidazole da amostra. A curva a azul correspondente à fracção 1, indica a presença de proteína. A curva a vermelho corresponde à eluição do imidazole da amostra. Como se pode observar pelo cromatograma, o imidazole foi eluído imediatamente após a eluição da

Lis170-168 e não está presente na fracção 1. Estas fracções foram igualmente analisadas por SDS-PAGE corado com *coomassie brilliant blue* e corresponde à pista 4 do gel C da figura 3.10, onde é possível identificar-se uma banda com 31kDa correspondente à presença de Lis170-168 nesta amostra.

Os cromatogramas obtidos na purificação das proteínas Lis168 e Lis170, foram idênticos aos apresentados para a proteína Lis170-168.

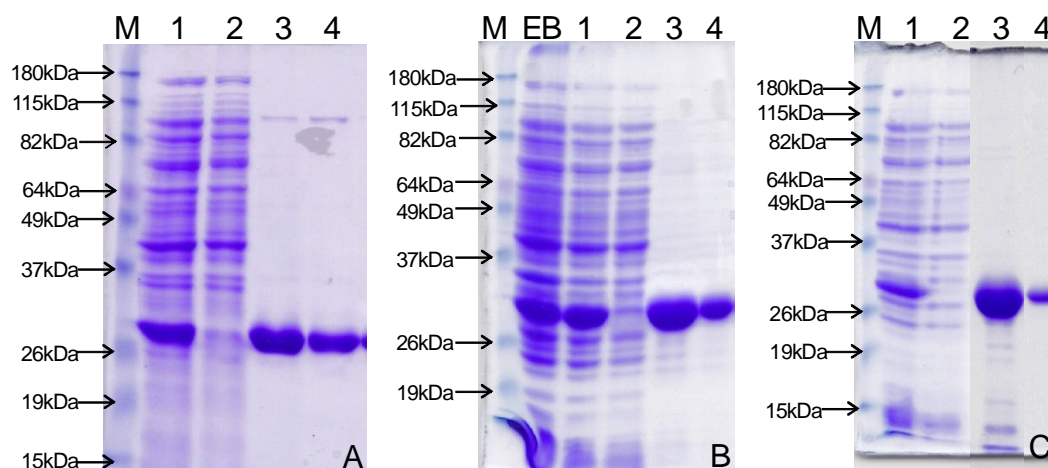


Figura 3.12 – Análise da purificação das endolisinas fágicas por SDS-PAGE usando coloração *coomassie brilliant blue*. A pista M corresponde ao marcador *BenchMark Pre-Stained Protein* (Invitrogen) que contém bandas de 168 a 6kDa, a pista EB corresponde ao extracto proteico bruto solúvel, a pista 1 corresponde ao extracto proteico solúvel filtrado, a pista 2 corresponde a fracção recolhida após a passagem da amostra lisada na coluna de afinidade, a pista 3 corresponde à lisina eluída da coluna Ni-NTA pelo sistema cromatográfico e a pista 4 corresponde à amostra proteica obtida após a troca de tampão. (A) Gel referente à purificação da Lis168. (B) Gel referente à purificação da Lis170. (C) Gel referente à purificação da Lis170-168.

Na pista 1 dos géis A, B e C da Figura 3.12, é possível identificar-se as respectivas bandas com 28, 33 e 31kDa, correspondentes às lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168, respectivamente. Esta amostra corresponde ao extracto proteico solúvel após filtração e foi a amostra injectada no sistema cromatográfico de purificação. A pista 2 corresponde à fracção recolhida no processo de purificação após a passagem da amostra lisada na coluna de afinidade. Observa-se que esta amostra é negativa para a presença de lisina indicando que a ligação através da cauda de 6 histidinas à coluna de afinidade ocorreu com bastante eficácia. Este facto indica ainda que grande parte da proteína de interesse ficou retida na coluna de níquel indicando que a ligação da cauda de 6-Histidinas foi eficiente. O grau de pureza destas

purificações é elevado, tal como se pode observar na pista 4, em que a presença de bandas inespecíficas é quase nula.

Dos resultados obtidos foi possível obter proteínas com elevado grau de pureza, permitindo a sua quantificação, para a qual se utilizou o método de Bradford. A determinação da concentração proteica efectuou-se através de uma equação obtida de uma recta padrão construída usando BSA como padrão (Figura 3.13).

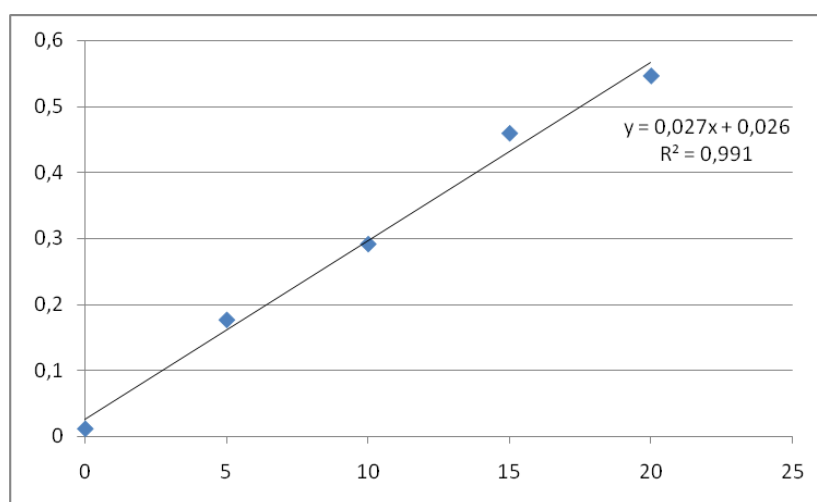


Figura 3.13 – Equação da recta padrão usada para a quantificação das lisinas lis168, lis170 e lis170-168.

Com os valores de absorvância medidos para cada uma das lisinas determinou-se uma concentração de 1,96mg/mL para a Lis168, 1,16mg/mL para a Lis170 e 0,47mg/mL para a Lis170-168.

### **3.5 Actividade lítica das endolisinas em estirpes clínicas**

As proteínas purificadas foram testadas sobre estirpes bacterianas clínicas. Inicialmente testaram-se as proteínas em células viáveis incorporadas num meio sólido e posteriormente avaliou-se a actividade lítica das enzimas em meio líquido apenas nas estirpes hospedeiras dos fagos F168 e F170.

### 3.5.1 Actividade lítica em meio sólido

Com o objectivo de avaliar o espectro de acção das endolisinas fágicas, testaram-se 110 estirpes clínicas (Tabela 2.1) das quais 57 são de *Enterococcus faecalis*, 25 são de *Enterococcus faecium*, 16 *Enterococcus sp*, 3 são de *Staphylococcus aureus*, 1 de *Staphylococcus epidermidis*, 1 de *Staphylococcus haemoliticus*, 1 de *Micrococcus luteus*, 1 de *Bacillus licheniformis*, 1 de *Bacillus subtilis*, 2 *Streptococcus* grupo A e 2 estirpes de *Escherichia coli*.

O ensaio foi realizado em células viáveis que foram incorporadas em tampão de incorporação suplementado com 0,7% de agar, sobre as quais se aplicaram 4 quantidades diferentes de cada uma das lisinas: 5, 1, 0,2 e 0,04  $\mu\text{g}$ . A interpretação dos resultados foi efectuada de uma forma qualitativa, avaliando o tamanho e transparência do halo lítico. Alguns dos resultados obtidos estão presentes na figura 3.14.

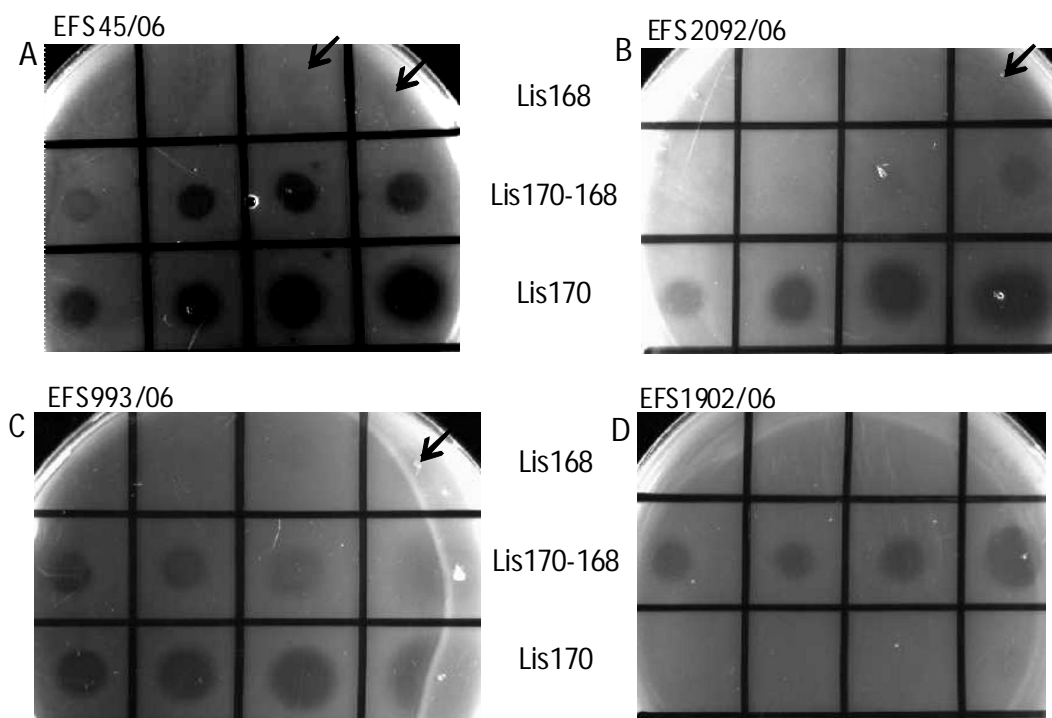


Figura 3.14 – Actividade lítica das lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 testadas em estirpes clínicas. Cada aplicação corresponde a uma quantidade diferente de enzima, sendo da esquerda para a direita: 0,04; 0,2; 1 e 5 $\mu\text{g}$ . (A) EFS45/06. (B) EFS2092/06. (C) EFS993/06. (D) EFS1902/06

Analisando os resultados obtidos, pode-se observar a especificidade das lisinas para algumas estirpes. No caso das estirpes EFS45/06 e EFS993/06 observa-se a existência de halos líticos

nas três lisinas, sendo a Lis170 a que apresentou maior actividade, seguida da Lis170-168 e por fim a Lis168, que apenas foi activa nas quantidades mais elevadas. Na estirpe EFS2092/06 verifica-se que também as três lisinas exibiram actividade, no entanto, observa-se uma diminuição acentuada da actividade da Lis170-168 quando comparada com o resultado obtido para as estirpes EFS45/06 e EFS993/06. É de salientar que, em algumas estirpes apenas a proteína quimera revelou actividade, como é o caso da estirpe EFS1902/06 (Figura 3.14.D).

Os resultados obtidos da actividade lítica nas estirpes do género *Enterococcus* estão resumidos na Figura 3.15.

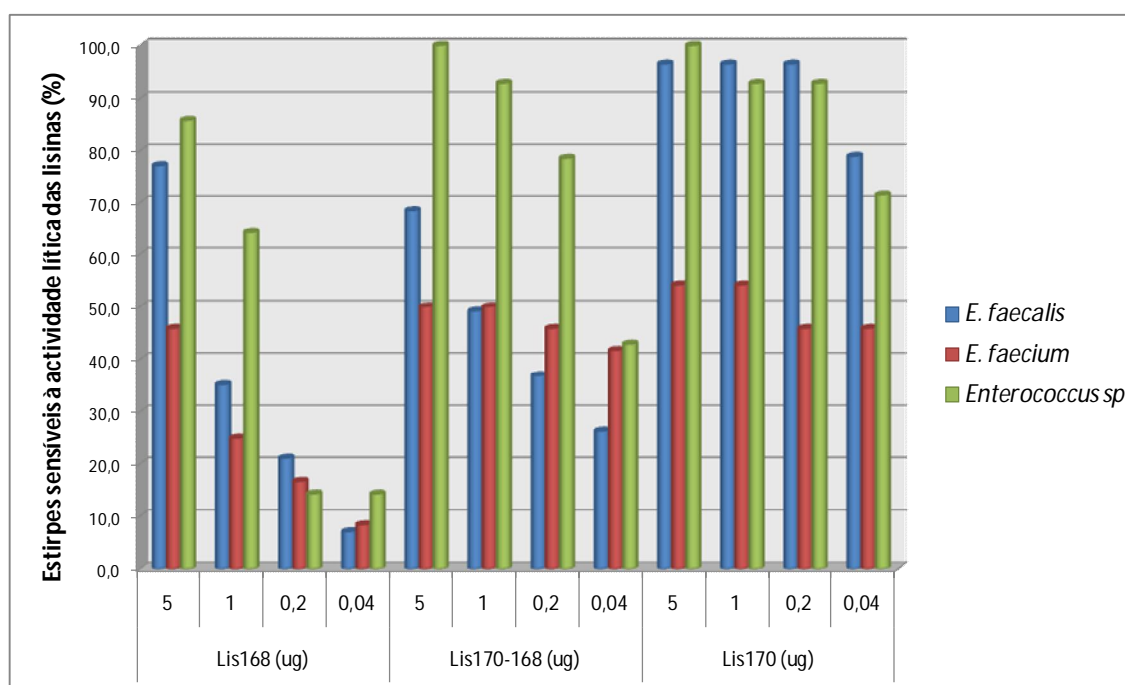


Figura 3.15 – Actividade lítica das lisinas Lis168, Lis170-168 e Lis170, testada com 4 quantidades diferentes, em 98 estirpes clínicas do género *Enterococcus*.

Analisando o gráfico da Figura 3.15, verifica-se que a tendência observada no ensaio realizado com os extractos solúveis preliminares mantém-se: a enzima Lis170 foi a que apresentou maior espectro de acção, ou seja foi activa contra um maior número de estirpes testadas, revelando na maioria dos casos um halo de lise com maior diâmetro que o exibido pelas lisinas Lis168 e Lis170-168 (como se pode verificar na Figura 3.14). Apesar desta lisina ser mais activa contra *E. faecalis*, 97%, revelou também alguma actividade em *E. faecium*,

46%, mesmo nas concentrações mais baixas, sendo activa em 54% das estirpes. A Lis170 apresentou actividade em todas as concentrações testadas, verificando-se apenas uma redução do tamanho do halo mantendo-se a transparência do mesmo. Em relação à Lis168, comprovou-se que é a lisina com menor espectro de acção, tendo mostrado uma actividade mais eficaz nas estirpes de *E. faecalis*, cerca de 77% e espécies não identificadas do género *Enterococcus*, cerca de 86%. Apenas 47% das *E. faecium* foram sensíveis à acção da Lis168. Relativamente à Lis170-168, verificou-se que foi activa em todas as espécies não identificadas do género *Enterococcus*, 100%, em 68% de *E. faecalis* e em 50% de *E. faecium*. Em comparação com o espectro de acção da Lis168, a quimera Lis170-168 apresentou actividade sobre um maior número de estirpes, observando-se uma melhoria na eficácia da actividade lítica da Lis168 em todas as concentrações, mais especificamente para as menos concentradas.

Das 12 espécies, fora do género *Enterococcus*, apenas a espécie *B. subtilis* foi sensível à actividade lítica das 3 lisinas testadas.

Em todos os ensaios foi utilizado como controlo negativo o tampão das lisinas, o qual como era esperado não revelou qualquer actividade.

A substituição do domínio de ligação da Lis170 pelo domínio de ligação da Lis168 traduz-se num alargamento do espectro de acção da lisina nativa, observando-se uma diminuição na actividade revelada pela diminuição do halo. É de salientar que a Lis170-168 apresentou actividade sobre estirpes que não foram sensíveis à acção das lisinas Lis168 e Lis170.

### 3.5.2 Actividade lítica em meio líquido

Com a finalidade de avaliar a actividade lítica das endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 em função do tempo, sobre uma cultura líquida das estirpes EN926/05 e EN1518/05, adicionaram-se 10µg de cada uma das proteínas, em ensaios independentes, a uma cultura em fase exponencial das estirpes referidas. As células foram preparadas quer em meio de cultura BHI, quer em tampão de incorporação para melhor avaliar o efeito lítico das lisinas. Em todos os ensaios foi testada a acção do tampão de lisina, que foi usado como controlo negativo. Os resultados obtidos estão representados na figura 3.16.

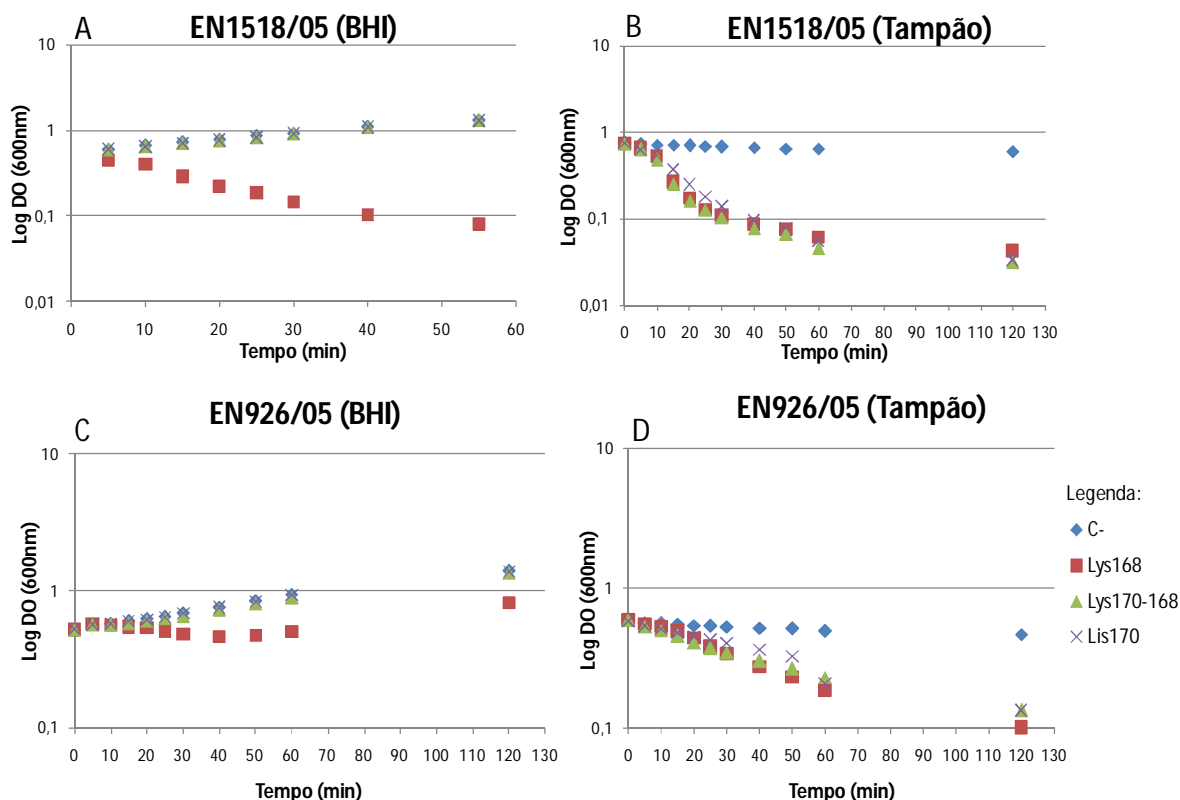


Figura 3.16 – Actividade lítica das lisinas de enterococos em função do tempo. Os gráficos A e B correspondem à actividade das lisinas na estirpe EN1518/05, preparada em meio BHI e tampão de incorporação, respectivamente. Os gráficos C e D correspondem à actividade das lisinas na estirpe EN926/05, preparada em BHI e tampão de incorporação, respectivamente. No gráfico D, C- corresponde ao controlo negativo.

Como se pode observar no gráfico B, o efeito lítico das lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 na estirpe EN1518/05 é evidente, tendo-se verificado uma diminuição da DO para metade do seu valor inicial ao fim de 15 min. É possível também observar-se, através do controlo negativo, que o tampão em que se encontram as lisinas não afecta a viabilidade celular. Estes resultados verificam-se também com a estirpe EN926/05 (Figura 3.16.D), com a diferença de que, neste caso, a DO diminuiu para metade ao fim de 40 min .

Em relação aos gráficos A e C, observa-se que tanto a Lis170 como a Lis170-168 não apresentam o mesmo padrão de actividade observada nos gráficos B e D. Esta diferença poderá estar relacionada com o facto das células se encontrarem em meio de cultura, o qual poderá conter substâncias que de alguma forma possam inibir a actividade lítica destas enzimas.

Ao contrário do que se revelou nos testes em meio sólido, a actividade da Lis168 em células em suspensão em BHI, parece ser potenciada, como se pode comprovar pelos resultados apresentados nos gráficos A e C. Este resultado é mais evidente para a estirpe EN1518/05.

Paralelamente aos testes da actividade lítica das lisinas, efectuou-se um ensaio de viabilidade celular no tampão de incorporação em algumas estirpes testadas. Os resultados revelaram que o tampão de incorporação não inviabiliza as células bacterianas e que estas se mantêm viáveis durante todo o ensaio do teste da actividade lítica das endolisinas, conforme confirmado através da contagem do número de colónias.



#### **4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

No presente trabalho pretendeu-se avaliar a actividade das endolisinas Lis168 e Lis170, codificadas no genoma dos fagos F168 e F170, respectivamente, em paralelo com a actividade de uma proteína quimera resultante da combinação entre o domínio catalítico da Lis170 e o domínio de ligação da Lis168.

A primeira fase do trabalho consistiu em produzir as proteínas Lis168, Lis170 e Lis170-168. Para atingir este objectivo, clonaram-se os respectivos genes em dois vectores de expressão de *E. coli*, pTrcHisA e pIVEX 2.3d. O facto de se ter obtido um elevado nível de expressão de proteína solúvel no vector pIVEX, levou à escolha dos plasmídeos recombinantes derivados deste vector (pDP1, pDP2 e pDP3) para os ensaios posteriores. Neste sistema produzem-se proteínas em fusão com uma cauda de 6-Histidinas em C-terminal, o que parece vantajoso no processo de purificação e em estudos de actividade lítica de endolisinas. Com efeito, foi possível purificar, com elevado grau de pureza, qualquer uma das proteínas utilizando o sistema de cromatografia *AKTA-prime*, permitindo a obtenção de concentrações proteicas suficientes para realizar os ensaios de actividade lítica para cada uma das lisinas.

É de salientar que a análise da sequência aminoacídica das lisinas Lis168 e Lis170 permitiu identificar um domínio CHAP na Lis168, o qual está presente em endolisinas com actividade de endopeptidase e um domínio com actividade de amidase-2 na Lis170. As lisinas com actividade de endopeptidase, têm a capacidade de clivar as ligações peptídicas que se estabelecem entre as cadeias aminoacídicas do peptidoglicano. Algumas endolisinas, possuem para além deste domínio CHAP, outro domínio catalítico associado a uma actividade enzimática diferente. Tal como é o caso da LysK, que possui um domínio CHAP e outro amidase na região C-terminal (Horgan *et al.*, 2008). A actividade amidase-2 quebra as ligações amida que se estabelecem entre o ácido murâmico e o aminoácido L-alalina no peptidoglicano. Está comprovado que a actividade de amidase é muitas vezes associada a um espectro de acção mais alargado, apresentando por vezes actividade lítica em espécies fora do género bacteriano do qual originou (Navarre *et al.*, 1999). É exemplo a endolisina PlyV12, codificada no fago  $\Phi$ 1 de *Enterococcus*, que está associada a uma actividade de amidase-2, que apresenta acção enzimática em *S. pyogenes*, *Streptococcus* do grupo B, *Streptococcus* do grupo C e apresentou alguma actividade numa estirpe de *S. aureus* (Yoong *et al.*, 2004).

A presença de uma estrutura modular nas endolisinas fágica, permite manipulá-las geneticamente de forma a construir novas enzimas com propriedades combinadas. É o caso da Lys16 do fago P68 que infecta *S. aureus*, cujo domínio CHAP está associado a uma actividade de endopeptidase e foi conjugado com o domínio de ligação da Lys17 codificada no mesmo fago, originando uma proteína quimera P16-17. A aplicação desta quimera conjugada com o antibiótico gentamicina, contribuí para a penetração do antibiótico em células de *S. aureus*. (Manoharadas *et al.*, 2008). Com base em estudos deste tipo, construiu-se o gene quimera *lis170-168*, conjugando a sequência correspondente ao domínio catalítico da Lis170 com a sequência do domínio de ligação da Lis168, com o objectivo de obter uma enzima com um espectro de acção mais alargado que o das lisinas nativas.

O segundo plano a seguir consistiu na produção das lisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168, cujas sequências nucleotídicas foram clonadas no vector pIVEX, numa estirpe de expressão de *E. coli*. Optou-se por usar a estirpe *E. coli CG61*. Para consolidar a observação de que as lisinas estavam a ser expressas na conformação activa, testaram-se primeiramente os extractos solúveis sobre extractos celulares de *Enterococcus* e verificou-se o aparecimento de halos de lise no local da aplicação dos extractos. Comprovou-se então que para além das lisinas apresentarem actividade lítica, a quantidade de proteína solúvel era suficiente para permitir a sua purificação.

Estes resultados são bastante promissores e constituem o ponto de partida para o estudo do potencial terapêutico destas endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168. Foi nesta linha condutora, que se efectuou a purificação das proteínas fágicas com o objectivo de estudar a actividade enzimática sobre estirpes de origem clínica. Durante o processo de purificação, surgiram, inicialmente, alguns problemas de insolubilidade e instabilidade das proteínas em solução, razão pela qual se optou por efectuar uma troca para o tampão de lisina, que se revelou eficaz em manter a proteína estável e em solução, impedindo a formação de agregados proteicos. Ensaio realizados com soluções tampão com diferentes composições, permitiram determinar que para a estabilidade das lisinas em solução é necessária a presença de um agente redutor (DTT), que impede a formação de pontes dissulfureto que promovem a precipitação e, a presença de um agente de crio-preservação (25% de glicerol) em quantidade suficiente para que permita o armazenamento das amostras proteicas a -20°C sem que se corra o risco de congelarem.

Esta estratégia de fundir uma cadeia de 6-Histidinas à proteína de interesse, mostrou ser muito eficiente na extração das lisinas das amostras proteicas e posterior eliminação de possíveis proteínas contaminantes.

Cumprido o primeiro objectivo, isto é, a obtenção das três lisinas purificadas, foi possível atingir com sucesso o principal desafio proposto neste trabalho, que consistiu no estudo da actividade lítica das endolisinas Lis168, Lis170 e Lis170-168 sobre bactérias Gram-positivas de origem clínica. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, pois as 3 lisinas apresentaram uma actividade antibacteriana em grande parte das estirpes de *Enterococcus* testadas. Comparando a actividade de qualquer uma das lisinas sobre as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, pode-se concluir que a espécie *E. faecalis* é mais sensível à acção lítica das endolisinas. De um modo geral, as três lisinas apresentaram maior actividade lítica sobre o grupo de espécies de *Enterococcus sp*. A lisina Lis168 foi a proteína que apresentou um espectro de acção mais estreito. A lisina Lis170, por sua vez, foi a que apresentou o espectro de acção mais alargada. Curiosamente, a Lis170-168, comparada com a Lis168, apresentou um espectro de acção mais alargado, tendo sido activa num maior número de estirpes. Apesar da combinação destes domínios funcionais ter alargado o espectro de acção da Lis168, revelou uma ligeira perda de actividade amidase-2, evidenciada por uma redução no diâmetro do halo, quando comparado com os halos resultantes da acção da Lis170. O facto de existirem estirpes que apenas foram sensíveis à acção da Lis170-168, sugere que o domínio de ligação da Lis168 é mais eficaz na ligação ao substrato presente na parede celular, no entanto, a especificidade concedida ao domínio CHAP, não permitia que ocorresse actividade, a qual foi conseguida com o domínio de amidase-2 que, tal como foi referido, está associado a um espectro de acção mais alargado. Nesta situação a Lis168 ligar-se-ia ao substrato, mas não é visível actividade lítica.

Pode-se inferir que, a combinação de domínios funcionais com vista a obter lisinas com propriedades activas diferentes é uma boa estratégia para alargar o espectro de acção de uma enzima destes tipo.

Relativamente aos resultados obtidos para a actividade lítica das lisinas nas 10 espécies Gram-positivas, mas não pertencentes ao género *Enterococcus*, apenas se obteve um resultado positivo. Foi o caso da estirpe de *B. subtilis*, na qual as concentrações mais elevadas das três lisinas exibiram um efeito lítico. Este resultado sugere que a parede celular da bactéria *B.*

*subtilis* apresente uma composição em hidratos de carbono semelhante à parede celular dos *Enterococcus sp*.

As lisinas foram ainda testadas em duas estirpes de *E. coli*, não se revelando nenhuma actividade sobre esta espécie. Este resultado vai de encontro ao esperado, visto tratar-se de uma espécie Gram-negativa na qual a presença de uma membrana externa, por si só, constitui uma barreira ao acesso das lisinas à camada de peptidoglicano quando adicionadas exogenamente. No entanto, estudos realizados por Orito (2004) e Morita (2003) sugerem que a presença de uma sequência hidrofóbica na região C-terminal poderá permitir a passagem da lisina pela membrana externa e, desta forma, actuar sobre o peptidoglicano.

Tem sido referido por outros autores que, o espectro de acção das endolisinas descritas é, normalmente, estreito (estirpes ou espécies) e limitado pelos ligandos associados ao peptidoglicano, frequentemente hidratos de carbono, que servem como alvos de ligação das lisinas e encontram-se distribuídos de acordo com o tipo de estirpe ou espécie.

## **5. CONCLUSÃO**

As experiências reunidas no presente trabalho permitiram a produção de três lisinas fágicas, Lis168, Lis170 e Lis170-168, partindo da pesquisa da sua sequência nucleotídica no genoma dos fagos F168 e F170 de *Enterococcus sp.*, passando pela sua purificação e finalizando com um teste de avaliação da sua acção antimicrobiana em 98 espécies clínicas de *Enterococcus sp.*, e outras bactérias Gram-positivas, isoladas de unidades hospitalares e da comunidade.

As endolisinas, mostraram uma actividade bastante satisfatória em espécies *Enterococcus sp.* A Lis168, Lis170 e Lis170-168 foram activas, respectivamente em 77%, 97% e 68% das estirpes de *E. faecalis* e 46%, 54% e 50% das estirpes de *E. faecium* testadas. As espécies não classificadas pertencentes ao género *Enterococcus sp.*, apresentaram uma elevada sensibilidade à acção líticas destas lisinas. A construção da lisina quimeras permitiu alargar o espectro de acção das lisina Lis168, apesar de se ter verificado uma ligeira redução na actividade lítica.

Os resultados obtidos para a quimera permitem concluir que a substituição do domínio CHAP, que apresenta um espectro de acção mais reduzido, por um domínio amidase-2, melhora significativamente a actividade lítica.

A combinação de domínios funcionais de diferentes endolisinas, com o intuito de produzir enzimas distintas com propriedades diferentes, parece constituir uma boa estratégia na obtenção de espectros de acção mais alargados.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que as endolisinas fágicas constituem um forte agente antibacteriano, sugerindo que estas proteínas poderão vir a ser muito promissoras no desenvolvimento de uma terapêutica eficaz no combate à emergência de estirpes de *Enterococcus* resistentes a antibióticos.



## **6. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Dados os resultados satisfatórios obtidos neste trabalho, surge a vontade de investigar e estudar mais aprofundadamente o potencial bacteriano destas lisinas de *Enterococcus*.

Para uma melhor interpretação dos resultados, seria interessante caracterizar as espécies *Enterococcus sp* testadas neste trabalho.

Seria interessante estudar ao pormenor quais são os aminoácidos do peptidoglicano especificamente clivados pelas Lis168.

Outra análise importante que poderia ser feita, consiste na determinação da estrutura tridimensional das lisinas. Este estudo traria questões importantes quanto à conformação activa e inactiva da lisina.

Visto que actualmente ainda existe pouca informação acerca de endolisinas activas contra *Enterococcus sp*, seria importante aprofundar o conhecimento sobre a sua estrutura proteica e, em particular, sobre a sua actividade lítica para o caso de uma eventual aplicação terapêutica futura. Sugerindo estratégias que modifiquem as enzimas de forma a potenciar a sua actividade enzimática.

Um dos estudos que era interessante fazer seria, fundir numa proteína apenas os dois domínios catalíticos das lisinas Lis168 e Lis170, dando origem a uma proteína bifuncional com apenas um domínio de ligação e avaliar quais as alterações observadas nos espectros de acção que as lisinas exibiram isoladamente.

Seguindo a mesma linha de raciocínio e mantendo o foco no domínio catalítico, outro estudo aliciante consistia em truncar os domínios catalíticos destas lisinas e estudar a sua actividade lítica isoladamente sobre espécies foram do género de *Enterococcus* e perceber qual a alteração no espectro de acção das lisinas nativas.

Um outro passo importante a ser dado seria passar aos testes *in vivo*, testando em ratinhos infectados com espécies potencialmente patogénicas de *Enterococcus* e perceber qual o efeito das lisinas quando usadas como terapia nestas condições.

Abordando a temática lisinas fágicas por uma outra perspectiva, também era interessante aprofundar e especificar para que molécula da parede celular tem afinidade e perceber que sequência aminoacídica especificamente se liga a esta molécula. Assim, poder-se-ia maximizar a afinidade de ligação do hidrato de carbono ao domínio de ligação, alterando os resíduos de aminoácidos do domínio de ligação.



## **7. BIBLIOGRAFIA**

Ackermann, H. W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archive of Virology*. 146: 843-857.

Bernhardt, T.G., Wang, I.N., Struck, D.K. e Young, R. 2002. Breaking free: ‘‘protein antibiotics’’ and phage lysis. *Res Microbiol* 153: 493–501.

Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B. e Górski, A. 2005. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental Biol Med*. 231: 366-377.

Bull, J. J., Levin, B. R., Drouin, T., Walker, N. e Bloch, C. A. 2002. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC Microbiol*. 2, 35.

Cetinkaya, Y., Falk, P. e Mayball, C. G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology*. 13: 686-707.

Chung, C. T., Niemela, S. L. e Miller, R. H. 1988. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 86: 2172-2175.

Croux, C., Ronda, C., Lopez, R. e Garcia, J. L. 1993. Interchange of functional domains switches enzymes specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *Molecular Microbiology*. 9: 1019-1025.

Dancer, S. J. 2004. How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect Dis*. 4: 611-619.

Deshpande, L. M., Fritsche, T. R., Moet, G. J., Biedenbach, D. J. E Jones, R. N. 2007. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiology*. 58: 163-170.

Diaz, E., Lopez, R. e Garcia, J. L. 1990. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 8125-8129.

Djurkovic, S., Loeffler, J. M. e Fischetti, V. A. 2005. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or

gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrobial Agents Chemother.* 49: 1225-1228.

Donovan, D. M., Dong, S., Garrett, W., Rousseau, G. M., Molineau, S. e Protchard, D. G. 2006. Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. *Applied and Environmental Microbiology.* 72(4): 2988-2996.

Duckworth, D. H. 1976. Who discovered Bacteriophage?. *Bacteriological reviews.* 4(40): 793-802.

Emori, T. G., and R. P. Gaynes. 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology.* 6: 428-442.

Fischetti, V. A. 2004. The use of phage lytic enzymes to control bacterial infections. *In Bacteriophages: Biology and Applications* (Elizabeth Kutter e Alexander Sulakvelidze eds). pp 321-334. CRC Press, USA.

Fischetti, V. A. 2005. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in microbiology.* 13(10): 491-496.

Fischetti, V. A. 2006. Using phage lytic enzymes to control pathogenic bacteria. *BMC Oral Health.* 6:16.

Fischetti, V. A. 2008. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Currente Opinion in Microbiology.* 11: 393-400.

Fischetti, V. A., Nelson, D. e Schuch, R. 2006. Reiventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nat. Biotechnol.* 24: 1508-1511.

Fugita, N. 2005. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) for VRE endemics Japan. *Rinsho Beseibutsh Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi.* 16: 1-16.

Garcia, E., Garcia, J. L., Arraras, A., Sanchez-Puelles, J. M. e Lopez, R. 1988. Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. 85: 914-918.

Garcia, P., Garcia, J. L., Garcia, E., Sanchez-Puelles, J. M. e Lopez, R. 1990. Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene.* 86: 81-88.

- Greer, G. G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal Food protein*. 68: 1102-1111.
- Hanlon, G. W. 2007. Bacteriophage: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30: 118-128.
- Hermoso, J. A., Monterroso, B., Albert, A., Galan, B., Ahrazem, O., Garcia, P., Martinez-Ripoli, M., Garcia, J. L. e Menendez, M. 2003. Estructural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure*. 11: 1239-1249.
- Horgan, M., O' Flynn, G., Garry, J., Cooney, J., Coffey, A., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. e McAuliffe, O. 2008. The phage lysin, LysK, can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Applied Environmental Microbiology*. 10: 1831-1838.
- Jacob, F. e Fuerst, C. R. 1958. The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria. *Journal Gen Microbiology*. 18: 58-526.
- Jado. I. 2003. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 967-973.
- Jett, B. D., Huycke, M. M. e Gilmore, M. S. 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology*. 7: 462-478.
- Johnson, A. P. 1994. The patogenicity of enterococci. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 33: 1083-1089.
- Kakikawa, M. 2002. Molecular analysis of the lysis protein Lys encoded by *Lactobacillus plantarum* phage (c)gle. *Gene*. 299: 227-234.
- Karnik, S. e Billeter, M. 1983. The lysis function of RNA bacteriophage Qbeta is mediated by the maturation (A2) protein. *EMBO J*. 2(9): 1521-1526.
- Kayser, F. H. 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal Food Microbiology*. 88: 255-262.
- Loeffler, J. M., Djurkovic, S. e Fischetti, V. A. 2003. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*. 71: 6199-6204.

- Loeffler, J. M., Nelson, D. e Fischetti, V. A. 2001. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*. 294: 2170-2172.
- Loessner, M. J. 2005. Bacteriophage endolysins – current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol*. 8: 480-487.
- Loessner, M. J., Gaeng, S., Wendlinger, G., Maier, S. K. e Scherer S. 1994. The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: a large TTG-start holding an associated amidase endolysin. *FEMS Microbiology Lett*. 162: 265-274.
- Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F. e Scherer, S. 2002. C-terminal domain of specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Molecular Microbiology*. 44: 335-349.
- Loessner, M. J., Maier, S. K., Daubek-Puza, H., Wendinger, G. e Scherer, S. 1997. Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *Journal Bacteriology*. 179: 2845-2851.
- Lopez, R., Garcia, E., Garcia, P. e Garcia, J. L. 1997. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins?. *Micro Drug Resist*. 3: 199-211.
- Lopez, R., Garcia, J.L., Garcia, E., Ronda, C. e Garcia, P. 1992. Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *FEMS Microbiol Lett*. 79: 439-447.
- Manoharadas, S., Witte, A. e Blasi, U. 2008. Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biotechnology*. 139: 118-123.
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, M., Imai, S. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* 11:211-219.
- Moak, M. e Molineux, I. J. 2004. Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Molecular Microbiology* 51(4): 1169-1183.
- Morita, M., Taniji, Y., Orito, Y., Misoguchi, K., Soejima, A. E Unno, H. 2003. Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin against Gram-negative bacteria. *FEBS*. 500: 56-59.

- Murray, B. E. 1990. The life and times of eterococcus. *Clinical Microbiology*. 3: 46-65.
- Navarre, W. W., Ton-That, H., Faull, K. F. e Scheewind, O. 1999. Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11: identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. *J Biol Chem*. 274: 15847-15856.
- Nelson, D., Loomis, L. e Fischetti, V. A. 2001. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 4107-4112.
- O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W., Ftzgerald, G. F. e Ross, R. P. 2005. The recombinante phage lysine LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Bacteriology*. 187: 7161-7164.
- Orito, Y., Morita, M., Hori, K., Unno, H e Tanji, T. 2004. *Bacillus amyloliquefaciens* pfage endolysin can enhance permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane and induce cell lysis. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65: 105-109.
- Parisien, A.; Allain, B.; Zhang, J.; Mandeville, R. e Lan, C. Q. 2007. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of applied Microbiology*. 104: 1-13.
- Payne, D. e Tomaz, A. 2004. The challenge of antibiotic resistant bacterial pathogen: the medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents. *Current Opinion in Microbiology*. 7: 435-438.
- Pennazio, S. 2006. The origin of phage virology. *Riv Biol*. 99(2): 224-226.
- Pritchard, D. G., Dong, S., Baker, J. R. e Engler, J. A. 2004. The bifunctional peptidoglycan lysine of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*. 150: 2079-2087.
- Russel, M., e Model, P. 2005. Filamentous bacteriophages. *In* The Bacteriophages. Calendar, R. (ed.). 2nd ed. Oxford University Press.
- São-José, C., J. G. Nascimento, R. Parreira, and M. A. Santos. 2007. Release of progeny phages from infected cells. *In* S. McGrath and D. van Sinderen (ed.), *Bacteriophage: genetics and molecular biology*. p. 307–334. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom

São-José, C., Parreira, R. and Santos, M.A. (2003). Triggering of host-cell lysis by double stranded DNA bacteriophages: fundamental concepts, recent developments and emerging applications. *Recent. Res. Devel. Bacteriol.* Vol.1: 103-130

São-José, C., Parreira, R., Vieira, G. and Santos, M.A. 2000. The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. *J. Bacteriol.* 182: 5823-5831.

São-José, C., Parreira, R., Vieira, G. E Santos, M. A. 2000. The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a cis-inhibitory element, presenting lytic activity on oenococcal cells. *Journal of Bacteriology*, 182: 5823-5831.

Shuch, R., Nelson, D. e Fischetti, V. A. 2002. A bacteriolytic enzyme that detects and kill *Bacillus anthracis*. *Nature.* 418: 884-889.

Summers, W. C. 1999. Félix d'Herelle and the origins of molecular biology. Yale University Press. 305-307

Summers, W. C. 2005. History of phage research and phage therapy. *In* Waldor, M. K., Friedman, D. I., Adhya, S. L. (ed.). *Phages: Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology.* ASM Press.

Thiel, K. 2001. Old dogma, new tricks-21<sup>st</sup> century phage therapy. *Nat Biotechnology.* 22: 31-36.

Thiel, K. 2004. Old dogma, new tricks – 21<sup>st</sup> century phage therapy. *Nature.* 22(1):31-36.

Uchiyama J., Rashel, Y., Takemura, I., Sugihara, Wakiguchi, H. e Matsuzaki, S. 2008 (b). In silico and in vivo evaluation of bacteriophage  $\Phi$ EF24C, a candidate for treatment of *Enterococcus faecalis* infections. *Applied and Environmental Microbiology.* 74(13): 4149-4163.

Uchiyama, J., Rashel, M., Maeda, Y., Takemura, I., Sugihara, S., Akechi, K., Muraoka, A., Wakiguchi, H. e Matsuzaki, S. 2008 (a). Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage  $\Phi$ EF24C as a therapeutic candidate. *FEMS Microbiol Lett.* 278: 200-208

- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology Review*. 56: 395-411.
- Vasala, A., Valkkila, M., Caldentey, J. E Alatosava, T. 1994. Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus* subsp *lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Applied Environment Microbiology*. 61: 4004-4011.
- Weiss, K., Larvediere, M., Lovgren, M., Delorme, J., Poirier, L. e Beiliveau, C. 1999. Group A *Streptococcus* carriage among close contacts of patients with invasive infections. *Am Journal Epidemiol* 149: 863-868.
- Xu, M., Arulandu, A., Struck, D. K., Swanson, S., Sacchettini, J. C. e Young, R. Y. 2005. Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science*. 307: 113-117.
- Xu, M., Struck, D. K., Deaton, J., Wang, I-N e Young, R. Y. 2004. A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proc Nat Acad Sci USA*. 101:6415-6420.
- Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D. e Fischetti, V. A. 2005. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal Bacteriology*. 186: 1808-4812.
- Young, R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiology Review*. 56: 430-481.
- Young, R. 2005. Phages Lysis. *In Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology* (Waldor, M. K., Friedman, D. I. e Adhya, S. L. Eds). 1ª ed., pp 92-127. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Young, R. Wang, I.-N. 2005. Phage lysis. *In The Bacteriophages* (Calendar, R. (ed.)). 2nd ed. Oxford University Press.
- Young, R., Wang I. N. e Roof, W. D. 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology*. 8: 120-128.
- Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S. e Loessner, M. J. 2002. The murein hydrolase of bacteriophage phi3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 5311-5317.