

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**UTILIZAÇÃO DE LISINAS DE BACTERIÓFAGOS NO CONTROLO
DE BACTÉRIAS PATOGÉNICAS GRAM-POSITIVAS**

Ana Sofia Conceição Fernandes

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**UTILIZAÇÃO DE LISINAS DE BACTERIÓFAGOS NO CONTROLO
DE BACTÉRIAS PATOGÉNICAS GRAM-POSITIVAS**

Ana Sofia Conceição Fernandes

Dissertação de estágio orientada pelo: Doutor Carlos São José

Orientador interno: Prof. Doutor Mário Santos

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho, em particular:

Ao Doutor Carlos São-José, meu orientador, pela excelente orientação, confiança, dedicação e disponibilidade que sempre manifestou, incentivando-me sempre, mesmo nos momentos mais complicados.

Ao Professor Doutor Miguel Garcia e à TechnoPhage, S. A., por me terem possibilitado a integração num projecto de investigação muito aliciante e todas as condições necessárias à realização do mesmo.

À Professora Doutora Madalena Pimental e à Doutora Sofia Côrte-Real pelo interesse e disponibilidade demonstradas, importantes para a realização desta tese.

À Daniela Proença, pela amizade sincera que demonstrou e pelos bons momentos de trabalho que tivemos ao longo deste ano.

Às minhas colegas de laboratório Cátia Cantante, Clara Leandro, Filipa Silva, Sara Lourenço e pela colaboração e partilha de conhecimentos e também, pelo excelente ambiente de trabalho e boa disposição.

Aos elementos da *K2BTeam*, Ana Mafalda Cavaleiro, André Grilo e Paulo Fernandes pelos momentos de boa disposição e paciência que sempre tiveram comigo, mesmo nos momentos mais difíceis.

A todos os meus amigos em geral pelo apoio e estimulação tornando possível a realização desta dissertação.

Por fim, aos meus pais, irmã e cunhado pelo constante incentivo, apoio e compreensão que demonstraram não só neste ano, como em todas as etapas da minha vida.

ABREVIATURAS

Ala	alanina
APS	persulfato de amónia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico (acrónimo do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DO	densidade óptica
EDTA	ácido tetra acético de etileno diamino
Gly	glicina
hrs	horas
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kb	quilobase
kDa	quilodalton
mg	miligrama
min	minuto/os
ml	mililitro
mM	milimolar
nm	nanómetro
ORF	grelha de leitura aberta (acrónimo do inglês <i>open reading frame</i>)
pbs	pares de bases
PBS	solução salina tamponada por fosfatos
PCR	reacção de polimerização em cadeia
PEG	polietileno glicol
RNA	ácido ribonucleico (acrónimo do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
R-Oxa	resistência à oxacilina
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio (acrónimo do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
S-Oxa	sensibilidade à oxacilina
TEMED	N,N,N',N' – Tetrametiletileno-diamina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Tween 20	monolaurato de polioxietileno - sorbitano
U	Unidades
ufc	unidade formadora de colónias
μg	micrograma
μl	microlitro

RESUMO

As endolisinas ou, simplesmente, lisinas são hidrolases da parede celular bacteriana, sintetizadas na fase final do ciclo lítico de fagos de DNA de cadeia dupla, cuja acção permite a libertação da progenia viral. Diversos estudos recentes demonstraram que as lisinas quando aplicadas exogenamente a bactérias Gram-positivas, como proteínas recombinantes purificadas, têm a capacidade de degradar o peptidoglicano da parede celular, causando a lise rápida da célula bacteriana.

Com este trabalho pretendeu-se inicialmente caracterizar, clonar e expressar lisinas activas contra *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes*. Para aumentar a solubilidade destas enzimas produziram-se proteínas truncadas, contendo apenas o domínio catalítico e, lisinas quiméricas em que se conjugaram diferentes domínios catalíticos e motivos de ligação à parede celular de origem heteróloga.

As lisinas que demonstraram melhor solubilidade e actividade lítica foram purificadas por cromatografia de afinidade. Estas foram uma lisina truncada (Lys161) contendo apenas o domínio de endopeptidase CHAP da lisina Lys87, específica para *S. aureus*, e duas lisinas quiméricas (Lys168-87 e Lys170-87) contendo, respectivamente, os domínios catalíticos endopeptidase CHAP e de Amidase-2 de lisinas de *Enterococcus sp.*, fundidos ao domínio C-terminal de Lys87 que apresenta os motivos de ligação ao peptidoglicano.

A avaliação da actividade lítica das lisinas em isolados bacterianos de meios hospitalares e da comunidade evidenciou um elevado potencial lítico das lisinas quiméricas em mais de 90% das estirpes de *S. aureus* testadas, incluindo uma elevada fracção destas com resistência à meticilina. Estas quimeras demonstraram também capacidade de lise em estirpes de *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus spp.* A lisina truncada Lys161, comparativamente, apresentou menor actividade lítica, com redução do espectro lítico.

Os resultados obtidos demonstram o potencial das lisinas quiméricas produzidas na eliminação de bactérias patogénicas, incluindo estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina.

ABSTRACT

Endolysins, or simply lysins, are bacterial cell wall hydrolysing enzymes that are produced at the end of the lytic cycle of double stranded DNA phages, to allow the release of viral progeny. Many recent studies have shown that when applied externally to Gram-positive bacteria, as purified recombinant proteins, lysins are capable of degrading the cell wall peptidoglycan, resulting in a rapid bacterial cell lyses.

This study initially aimed the characterization, cloning and expression of lysins targeting *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*. To increase their solubility the enzymes were produced in the form of truncated proteins, which exclusively carried the catalytic domain, and chimerical polypeptides where different catalytic and cell wall binding domains of heterologous origin were fused.

The lysins that exhibited higher solubility and lytic activity were purified by affinity chromatography. Specifically, these were a truncated derivative of Lys87 (Lys161), containing only a CHAP peptidase domain acting on *S. aureus*, and two chimerical lysins (Lys168-87 and Lys170-87) comprising, respectively, the functional CHAP peptidase and amidase-2 domains of *Enterococcus* sp. lysins fused to the cell wall targeting domain of the *S. aureus* lysin Lys87.

The evaluation of lysin bacteriolytic activity on bacterial clinical isolates from hospital and community samples showed a high lytic potential of chimerical lysins, which were able to lyse more than 90% of the tested *S. aureus* strains, including a high fraction of methicillin-resistant isolates. These chimeras also displayed lytic activity against strains of *Enterococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus* spp. Truncated lysin Lys161 showed less lytic activity and a narrow spectrum when compared to the chimerical endolysins.

Our results demonstrate the potential of chimerical lysins to eliminate pathogenic bacteria, including methicillin-resistant *S. aureus* strains.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Bacteriófagos	1
1.1.1. Ciclo de vida dos bacteriófagos	1
1.1.2. Lise bacteriana mediada pelos fagos	1
1.2. Lisinas fágicas	2
1.2.1. Modo de acção das lisinas	2
1.2.2. Estrutura das lisinas	3
1.2.3. Uso das lisinas na terapêutica antibacteriana	4
1.2.3.1 Aplicações na medicina e biotecnologia	4
1.2.3.2. Possíveis limitações na terapêutica com lisinas	5
1.2.3.3. Aplicação das lisinas em <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Propionibacterium acnes</i>	6
1.3. Objectivos	7
2. MATERIAIS e MÉTODOS	8
2.1. Estirpes bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento	8
2.2. Métodos e técnicas gerais de biologia molecular	10
2.2.1. Amplificação por PCR e clonagem	10
2.2.2. Transformação, sequenciação e análise de DNA	11
2.3. Construção dos mutantes de deleção da lisina Lys87	12
2.4. Construção das lisinas quiméricas e da lisina Lys15	13
2.5. Produção e purificação de lisinas recombinantes	14
2.5.1. Condições de expressão das lisinas recombinantes	14
2.5.2. Monitorização da solubilidade das lisinas recombinantes	15
2.5.3. Purificação por cromatografia de afinidade- FLPC	16
2.5.4. Quantificação das proteínas recombinantes purificadas	16
2.6. Análise das lisinas por electroforese em gel de SDS-PAGE e por <i>Western Blot</i>	17
2.7. Estudo da actividade lítica das lisinas recombinantes	17
2.7.1. Ensaio em meio sólido	17
2.7.1.1. Actividade lítica sobre células bacterianas autoclavadas	17
2.7.1.2. Actividade lítica sobre células bacterianas viáveis	18
2.7.2. Ensaio em meio líquido	18
2.8. Análise bioinformática	18
3. RESULTADOS	19
3.1. Identificação e análise das sequências das lisinas fágicas	19
3.2. Caracterização e expressão das lisinas recombinantes	19
3.2.1. Lisinas derivadas de Lys87	19

3.2.2. Lisinas derivadas de Lys15	22
3.3. Purificação das lisinas recombinantes por cromatografia de afinidade- FLPC	23
3.4. Estudo da actividade lítica das lisinas recombinantes em células viáveis	26
3.4.1. Ensaio em meio sólido.....	26
3.4.2. Ensaio em meio líquido	30
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	36

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Bacteriófagos

1.1.1. Ciclo de vida dos bacteriófagos

Os bacteriófagos (fagos), independentemente descobertos por Frederick Twort (1915)^[91] e Felix d'Herelle (1917)^[87], infectam especificamente bactérias e constituem o maior grupo de vírus, com um número estimado de 10^{31} elementos, sendo essencialmente ubíquos^[8, 98].

Os fagos, de acordo com o seu ciclo de vida, podem convencionalmente ser divididos em dois tipos, os fagos virulentos (líticos) que seguem exclusivamente a via lítica e os fagos temperados que podem seguir adicionalmente o ciclo lisogénico^[49].

Ambos os ciclos se iniciam do mesmo modo, com adsorção do fago à célula bacteriana através da interacção com receptores específicos na superfície celular e injeção do ácido nucleico para o citoplasma bacteriano^[38]. No ciclo lítico, os fagos como o KVP20 e os do tipo-T, após estes passos, utilizam de imediato a maquinaria celular para a replicação do genoma fágico e síntese das proteínas funcionais e estruturais do fago. Segue-se a montagem dos componentes estruturais, morfogénese dos viriões e lise do hospedeiro, com consequente libertação da progenia viral^[45]. Contrariamente, os fagos temperados (ex., Φ MR11 e λ) podem multiplicar-se usando adicionalmente o ciclo lisogénico, no qual o genoma fágico é integrado no cromossoma do hospedeiro, pouco tempo depois da sua entrada na célula bacteriana. Quando isto ocorre o fago passa a ser denominado de profago, replica-se juntamente com o cromossoma da célula hospedeira e é transmitido às células filhas, permanecendo num estado quiescente. As estirpes bacterianas transportando o profago são designadas de lisogénicas e, quando sujeitas a determinados estímulos, há activação do profago seguida da multiplicação fágica, tal como nos fagos virulentos, culminando na libertação da progenia viral que ocorre após a lise do hospedeiro^[38, 45].

1.1.2. Lise bacteriana mediada pelos fagos

A capacidade de induzirem lise bacteriana é um dos principais factores motivadores para a aplicação dos fagos como agentes antibacterianos, mas é essencialmente vital para a sua estratégia de sobrevivência e *fitness* ecológico^[79]. Ao contrário do que se verifica nos fagos filamentosos, como o M13, em que a saída da progenia fágica é feita por mecanismos relacionado com a secreção, sem lise da célula hospedeira, os fagos são normalmente de natureza bacteriolítica^[78].

Funcionalmente, a lise bacteriana no fim do ciclo vegetativo dos fagos ocorre de dois modos distintos. Os fagos com genoma de cadeia simples de DNA como o Φ X174 ou de RNA como o MS2, codificam um proteína única (E e L, respectivamente) que inibe a síntese da parede celular e induz a lise indirectamente, de um modo semelhante ao que ocorre com a acção da penicilina^[57]. Nos fagos com genoma de DNA de cadeia dupla (ex., λ e T4), a lise bacteriana deve-se à acção concertada de pelo menos duas proteínas fágicas, uma endolisina (lisina) e uma holina (Fig. 1.1)^[79]. A lisina é uma hidrolase do peptidoglicano, capaz de degradar a parede celular, que se acumula inicialmente no

citoplasma bacteriano; alguns fagos codificam lisinas com uma sequência sinal que permite a sua exportação para a parede celular através do sistema geral de secreção (sistema *sec*) do hospedeiro, contudo ambas estão num estado inactivo^[80] As holinas são pequenas proteínas hidrofóbicas, codificadas na forma de monómeros que a um tempo geneticamente programando e após um evento específico (concentração crítica do efector da holina e despolarização parcial da membrana) organizam-se rapidamente em oligómeros formando lesões (poros) na membrana celular^[79, 95]. Após este evento dá-se a passagem das lisinas do citoplasma para o compartimento da parede celular. No caso das lisinas pré-exportadas pensa-se que estas adquirem uma conformação activa após a despolarização da membrana citoplasmática mediada pela holina. Nos dois cenários o resultado final é a lise rápida da célula bacteriana^[9, 95]. Muitas vezes a bacteriolise é controlada por proteínas como a antiholina que regula a actividade da holina ou potenciada pelas proteínas tipo Rz/Rz1^[16, 79].

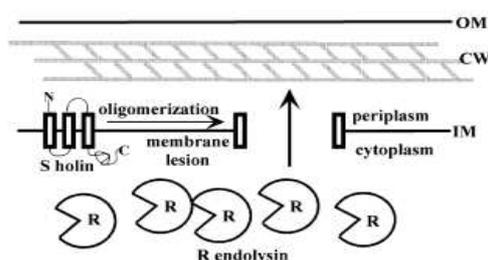


Fig. 1.1 Sistema representativo dos eventos que levam à lise celular bacteriana pelo sistema holina-endolisina do fago λ . A holina S acumula-se e oligomeriza na membrana citoplasmática enquanto que a lisina R se acumula no citoplasma. A um tempo geneticamente programado os oligómeros S rapidamente formam lesões na membrana através das quais passa a lisina R. Esta ataca a parede celular causando a lise bacteriana e saída do conteúdo citoplasmático, juntamente com a progenia fágica. OM (*outer membrane*), membrana externa; CW (*cell wall*), parede celular; IM (*inner membrane*), membrana interna ou citoplasmática. (adaptado de Bernhardt *et al.*^[9]).

1.2. Lisinas fágicas

1.2.1. Modo de acção das lisinas

As lisinas são produzidas na fase final do ciclo lítico e têm como principal função a degradação da parede celular bacteriana, o que permite a libertação da progenia fágica para o exterior, garantindo a realização de novos ciclos infecciosos^[52, 102].

As lisinas têm como substrato o peptidoglicano, constituinte principal da parede celular bacteriana. Esta protege a célula da injúria mecânica e ruptura osmótica, sendo essencial à sua viabilidade. O peptidoglicano é composto por polímeros repetidos de resíduos de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e cadeias laterais de tetrapéptidos ligados ao grupo lactil do NAM por uma ligação amida. Os tetrapéptidos estão ligados entre si por uma ligação interpéptica (nas Gram-negativas) ou ponte interpéptica (nas Gram-positivas). A parede celular das bactérias Gram-positivas é composta por várias camadas de peptidoglicano associado a ácidos teicóicos, com uma espessura entre 15-80nm, enquanto que as Gram-negativas possuem apenas uma camada de peptidoglicano (10nm), rodeado por uma membrana externa^[46].

Dependendo da sua especificidade enzimática as lisinas podem ser classificadas como N-acetilmuramidases (lizosimas), N-acetilmuramyl-L-alanina amidases (NAM-amidases), endo- β -N-acetilglucosaminidases (glucosaminidases), endopeptidases e transglicosilases líticas^[34, 52, 102] (Fig. 1.2). Destas, as amidases e muramidases parecem ser as mais frequentemente produzidas pelos fagos^[52].

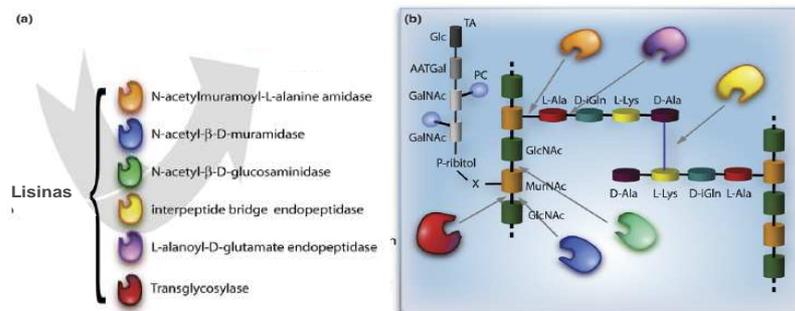


Figura 1.2 Lisinas fágicas. (a) Identificação nominal e esquemática das diferentes lisinas. (b) representação esquemática do peptidoglicano de *Streptococcus pneumoniae*, com indicação (através das setas) dos locais alvo das lisinas indicadas em a. GlcNAc, N-acetilglucosamina; MurNAc, ácido N-acetilmurâmico; TA, ácido teicóico; X indica o local de união entre as unidades de pentassacáridos e os resíduos de NAM. PC, fosforilcolina (adaptado de Hermoso *et al.*^[39]).

Tipicamente cada lisina possui apenas um tipo de actividade lítica, contudo estão também descritas lisinas bifuncionais, isto é, enzimas que possuem dois domínios catalíticos independentes, catalisando a clivagem de mais do que uma ligação no peptidoglicano. Nomeadamente as lisinas dos fagos B30 (muramidase e endopeptidase)^[75] e NCTC11261 (endopeptidase e lisozima)^[20] de *Streptococcus agalactiae*, do fago Φ 11 (endopeptidase e NAM-amidase)^[64] de *Staphylococcus aureus* e do fago Φ WM1 (endopeptidase e NAM-amidase)^[100] de *Staphylococcus warneri* M.

Outras lisinas são capazes de afectar a célula bacteriana utilizando mecanismos diferentes dos relacionados com a sua actividade enzimática, como a lisina do fago T4 e a Lys1521 (de *Bacillus amyloliquefaciens*) que possuem na sua região C-terminal sequências adicionais semelhantes às apresentadas por péptidos catiónicos^[30, 71].

1.2.2. Estrutura das lisinas

As lisinas possuem uma estrutura modular típica, com pelo menos dois módulos (domínios) funcionais separados por uma região de ligação (*linker*), o domínio catalítico na região N-terminal e o domínio de ligação à parede celular (DLPC) na região C-terminal^[37] (Fig. 1.3). A comparação de sequências entre enzimas da mesma classe enzimática demonstrou que o domínio catalítico é uma região conservada, enquanto que a região C-terminal é bastante mais variável, não apresentando por vezes sequências conservadas.



Figura 1.3 Imagem representativa de uma lisina típica de um fago. L representa a região *linker* entre os dois domínios funcionais: catalítico e de ligação à parede celular (adaptado de Fischetti *et al.*^[35]).

A variabilidade verificada no módulo DLPC poderá dever-se à selecção, efectuada ao longo da evolução, de modo a que as lisinas reconhecessem não só componentes únicos da parede celular mas também aqueles que são essenciais à viabilidade da célula hospedeira, garantindo a libertação efectiva da progenia viral. Deste modo é também minimizada a ocorrência de resistências por parte da célula infectada^[33, 34]. Por outro lado a existência de ligações no peptidoglicano que são comuns em várias espécies bacterianas, poderá ser a explicação para a similaridade entre as sequências de aminoácidos no domínio catalítico das principais classes de lisinas, como as amidases^[33, 52].

Curiosamente, embora o DLPC seja responsável pelo direccionamento da lisina para a parede celular alguns estudos parecem indicar que este nem sempre é indispensável para a actividade bacteriolítica. Na lisina Mur, do fago LL-H de *Lactobacillus delbrueckii*^[93], quando foi eliminada parte desta região a actividade bacteriolítica manteve-se e em lisinas como a PlyL do profago K Ba02 de *Bacillus anthracis*^[55] e Ply511 do fago A511 de *Listeria monocytogenes*^[36] esta foi superior à registada na lisina intacta. Outras lisinas, no entanto, precisam de ambos os domínios para manter a actividade lítica nos níveis óptimos^[53, 59].

A estrutura modular das lisinas parece ser bastante vantajosa para o fago permitindo-o alterar a sua especificidade e actividade enzimática de um modo independente, através da substituição de um domínio pelo domínio correspondente de outra enzima^[24, 86].

1.2.3. Uso das lisinas na terapêutica antibacteriana

Após anos de uso quase exclusivo de antibióticos no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias patogénicas, a emergência de estirpes bacterianas multirresistentes aliado ao abrandamento na descoberta de novas classes de antibióticos criou a necessidade de se desenvolverem novas estratégias, que garantam a eliminação de bactérias patogénicas, especialmente as resistentes aos antibióticos^[5, 73, 85, 97].

Quando em 2001, Nelson *et al.*, demonstraram pela primeira vez que na ausência de fagos o uso de lisinas recombinantes purificadas era eficiente na eliminação de bactérias patogénicas, estas passaram a se consideradas como uma possível alternativa ou complemento à terapia antibiótica^[65]. Em particular, as lisinas usam receptores e modos de actuação diferentes dos utilizados pelos antibióticos, conseguindo induzir a morte bacteriana independentemente do seu *status* de resistência aos antibióticos^[67, 101]. Geralmente, possuem um espectro lítico reduzido, restrito às espécies bacterianas infectadas pelo fago do qual derivaram^[84, 103], existindo no entanto, algumas excepções como a lisina PlyV12 do fago Φ 11, de *Enterococcus faecalis*, que é activa também em *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, do Grupo B, C e *Staphylococcus aureus*^[102].

1.2.3.1 Aplicações na medicina e biotecnologia

Apesar das lisinas terem sido evolutivamente desenhadas para actuar a partir do interior da célula infectada (*lysis from within*), estão hoje documentados inúmeros exemplos sua aplicação exógena

(*lysis from without*), especialmente em bactérias Gram-positivas, com consequente eliminação destas, *i.e.*, bacteriólise.

Destacam-se em seguida as principais aplicações das lisinas na terapêutica antibacteriana, no campo da medicina e biotecnologia.

Prevenção de infecções bacterianas. A primeira lisina a ser testada teve como principal objectivo evitar a colonização do epitélio respiratório superior por *Streptococcus pneumoniae*^[65]. Os resultados deste estudo e de outros realizados *in vivo* demonstraram que após a aplicação de lisinas nas mucosas membranares de ratinhos havia um decréscimo das ufc/ml e a manutenção da sobrevivência destes^[51, 65]. Nos humanos as membranas das mucosas são locais colonizados por diferentes espécies bacterianas, algumas potencialmente patogénicas, e que constituem muitas vezes o ponto de partida da infecção^[12, 32, 94] contribuindo para a transmissão de bactérias patogénicas na comunidade^[48, 66]. Estando a sua eliminação normalmente dependente do uso de diferentes combinações de antibióticos, o que favorece o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes e danos para o paciente, o uso de lisinas como agente profilático nestas situações seria sem dúvida uma mais valia.

Tratamento de infecções bacterianas. Adicionalmente ao uso profilático, os resultados obtidos com lisinas aplicadas sistemicamente em ratinhos (*in vivo*), previamente infectados com estirpes patogénicas, são igualmente satisfatórios^[50, 42, 84, 101]. Por exemplo, quando se aplicou intravenosamente uma única dose da lisina Cpl-1 em ratinhos, após 10hrs de infecção, com *S. pneumoniae*, verificou-se uma sobrevivência de 100% destes comparativamente com os 20% observados no grupo controlo^[42]. Está também demonstrado que a eficiência das lisinas pode ser futuramente potenciada utilizando-se conjuntamente antibióticos ou lisinas de diferentes classes funcionais e igual especificidade^[26, 42, 51]. Nestas combinações as lisinas parecem actuar sinergeticamente na parede celular.

Biocontrolo de bactérias em alimentos. Para este objectivo pode ser aplicado directamente nos alimentos as lisinas purificadas^[103] ou utilizar a especificidade característica das lisinas, como num estudo de Gaeng *et al.*, em que juntaram *Lactococcus lactis* recombinantes (a expressar a lisina Ply511) e *Listeria monocytogenes* em meio líquido, observando-se ao longo do tempo um decréscimo acentuado destas ultimas^[36].

Protecção de plantas contra bactérias fitopatogénicas. Neste caso a estratégia utilizada até à data tem sido a criação de plantas transgénicas que expressam lisinas, garantindo a eliminação das bactérias nos estádios iniciais da infecção^[29] ou a aplicação directa da lisina à superfície da planta^[41].

Detecção. Mais uma vez pode-se tirar partido da especificidade de cada lisina utilizando-as no desenvolvimento de métodos de detecção rápida de bactérias, como *B. anthracis*^[84].

1.2.3.2. Possíveis limitações na terapêutica com lisinas

A utilização de lisinas em humanos carece ainda da realização de variados estudo. Actualmente as principais preocupações relativas ao uso destas como terapêutica antibacteriana incluem o possível desenvolvimento de uma resposta imunológica ou resistência bacteriana.

As lisinas, ao contrário dos antibióticos são proteínas e como tal poderão induzir resposta imunitária celular e humoral. Caso isto ocorra após a sua administração nas mucosas ou sistemicamente, poderia levar à redução ou inibição completa da actividade antibacteriana quando aplicadas repetidamente em infecções crónicas^[14]. Todavia, a exposição intravenosa de ratinhos à lisina Cpl-1 não diminuiu significativamente a eficácia da terapia *in vivo* e o soro de um coelho previamente hiperimunizado apresentou uma actividade inibitória bastante fraca sobre esta lisina^[50]. Igualmente, anticorpos contra lisinas de fagos de *S. pneumoniae*, isolados de coelhos, não demonstraram capacidade neutralizante^[50]. Relativamente ao aparecimento de estirpes resistentes às lisinas, está indicado até ao momento que a probabilidade disto ocorrer é bastante baixa^[33, 34, 51]. Tal como indicado anteriormente as lisinas reconhecem normalmente moléculas do invólucro bacteriano que são essenciais à sobrevivência da célula, assim, mesmo a aplicação contínua de lisinas não deverá favorecer o aparecimento de estirpes resistentes^[84].

Outro factor a ter em conta é a resposta do indivíduo aos inúmeros compostos pró-inflamatórios, como o LPS e ácidos teicóicos ou lipoteicóicos que, quando libertados lise bacteriana poderão induzir no indivíduo um choque anafilático e em último caso a morte^[63]. Contudo até ao momento os dados disponíveis não comprovam o aparecimento destes sintomas após a ocorrência de bacteriólise^[42, 50]. As lisina parecem não apresentar igualmente sinais de toxicidade quando aplicadas em grandes quantidades para o tratamento de infecções cutâneas ou sistémicas^[51, 65].

1.2.3.3. Aplicação das lisinas em *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes*

O uso das lisinas fágicas é considerado essencialmente para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, como as espécies alvo deste estudo: *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes*. Nestas bactérias a parede celular está facilmente acessível à acção externa das lisinas, contrariamente ao que ocorre nas Gram-negativas, onde a membrana externa impede o seu acesso aquele compartimento celular.

As bactérias da espécie *S. aureus* são cocos, anaeróbios facultativos^[83], que colonizam a pele e mucosas humanas^[18]. Constituem a principal espécie patogénica do género *Staphylococcus*, associado a inúmeras manifestações clínicas como infecções cutâneas e dos tecidos moles (celulite e impetigo)^[91], infecções nos ossos e articulações^[68], endocardite^[60], síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico^[21]. *S. aureus* apresenta uma taxa conjunta de morbilidade e mortalidade de 64%, variável de acordo com o local de infecção e a susceptibilidade particular da estirpe, sendo um importante agente de infecções nosocomiais^[11].

O aparecimento de inúmeras descrições de estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, *methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)^[40] e ultimamente à vancomicina^[5], uma das últimas linhas de defesa disponíveis contra as infecções provocadas por esta bactéria, suscitou uma intensa pesquisa de agente antibacterianos alternativos aos antibióticos.

Relativamente a lisinas específicas contra *S. aureus* e com capacidade de lisar células viáveis encontram-se até ao momento descritas as lisinas LysK, LytA (do fago Φ 11), MV-L e LysH5^[28, 67, 69, 76]. A nível médico, a única enzima com actividade lítica no peptidoglicano e utilizada com sucesso contra *S. aureus* foi a lisostafina (endopeptidase produzida por *Staphylococcus simulans*)^[82]. Esta enzima tem sido usada no tratamento de endocardite, ao nível da válvula aórtica, provocada por estirpes *S. aureus* resistentes à vancomicina^[72].

As bactérias da espécie *P. acnes* são anaeróbias, de crescimento lento e constituem o principal constituinte da flora residente da pele de adolescentes e adultos, especialmente nas zonas ricas em sebo (cabeça, face e costas), com um elevado número de folículos pilossebáceos^[31, 58]. *P. acnes* está fortemente associado ao processo que leva à acne inflamatória^[31, 13], tendo sido descrito como patogénio oportunista envolvido em infecções nas articulações, osso, dentes e úlceras córneas^[2, 15, 47]. Encontra-se igualmente associado a infecções no sistema nervoso central *via* instrumentos médicos^[3].

Considerando as diferentes patologias potencialmente relacionadas com a presença de *P. acnes* na pele, a *acne vulgaris* é a mais preocupante afectando mais de cinquenta milhões de pessoas só nos Estados Unidos da América, o que origina graves problemas psicológicos entre a população adolescente^[61]. O tratamento com antibióticos não deve ser normalmente considerando uma vez que a sua aplicação tópica ao eliminar parte da microflora residente da pele pode contribuir para um aumento da sintomatologia e favorecer o aparecimento de estirpes resistentes^[23, 70]. Embora se encontrem descritos diversos fagos específicos para *P. acnes*^[54, 97], não se encontram ainda, dados relativos à aplicação de lisinas recombinantes purificadas com actividade lítica em *P. acnes*.

1.3. Objectivos

O principal objectivo deste trabalho foi a produção de lisinas recombinantes específicas para *S. aureus* e *P. acnes*, de modo a avaliar a sua actividade bacteriolítica quando aplicadas exogenamente a estirpes destas duas espécies, isoladas de meios hospitalares e da comunidade, incluindo estirpes resistentes a antibióticos.

Na produção de lisinas específicas para *S. aureus*, utilizou-se uma lisina já identificada, Lys87, isolada do fago F87 que infecta *S. aureus*, e tentou-se melhorar a sua solubilidade. Para isso, seguiram-se duas estratégias em que numa se procedeu à deleção da região C-terminal de Lys87 e noutra em que se produziram lisinas quiméricas compostas pelo domínio catalítico de lisinas de fagos de *Enterococcus* sp. e o domínio de ligação à parede celular (DLPC) de Lys87.

Para produzir lisinas com actividade lítica contra *P. acnes* primeiro identificaram-se nos genomas de bacteriófagos que infectam *P. acnes*, os genes que codificam para as respectivas lisinas, utilizando ferramentas bioinformáticas. Depois procedeu-se à clonagem do gene *lys15* para expressão heteróloga e purificação da lisina Lys15. Adicionalmente e antecipando potenciais problemas de solubilidade na produção desta lisina, fundiu-se a região contendo o DLPC de Lys15 com a região contendo o domínio catalítico de lisinas de *Enterococcus* sp., obtendo-se de igual modo lisinas quiméricas.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Estirpes bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento

As estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*), vectores e plasmídeos recombinantes usados neste trabalho estão descritos na tabela 2.1.

O crescimento das diferentes estirpes de *E. coli* ocorreu em meio *Luria-Bertani*^[77] (LB), a 37°C, em ambiente de aerobiose e com agitação, exceptuando a estirpe CG61^[80, 88] e derivadas que foram crescidas a 28°C. As estirpes transportando vectores e plasmídeos recombinantes foram seleccionadas em meio suplementado com ampicilina (amp) e/ou canamicina (can), nas concentrações finais de 100µg/ml e 30µg/ml, respectivamente.

Tabela 2.1 Estirpes de *E. coli*, plasmídeos e vectores recombinantes, usados neste estudo

	Genótipo/características relevantes	Uso no estudo	Fonte/referência
Estirpes de <i>E. coli</i>			
XLIBlue- MRF ^r	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F ^r proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Estirpe de clonagem	Stratagene, USA
BL21(DE3)	F ⁻ , dcm, ompT, hsdS (rB- mB-), gal λ(DE3)	Estirpe de expressão	Stratagene, USA
CG61	Derivada da BL21 transformada com o pGP1-2	Estirpe de expressão	80, 88
CC4	Derivada da BL21(DE3) transformada com ΔpET87	Produção de Lys87	C. Cantante (não publicado)
SF166	Derivada da BL21 (DE3) transformada com pSF166	Produção de Lys166	Este trabalho
SF1661	Derivada da BL21 (DE3) transformada com pSF161	Produção de Lys161	Este trabalho
SF148	Derivada da BL21 (DE3) transformada com pSF148	Produção de Lys148	Este trabalho
SF168-87	Derivada da CG61 transformada com pSF168-87	Produção de Lys168-87	Este trabalho
SF170-87	Derivada da CG61 transformada com pSF170-87	Produção de Lys170-87	Este trabalho
SF15	Derivada da CG61 transformada com pSF15	Produção de Lys15	Este trabalho
SF168-15	Derivada da CG61 transformada com pSF168-15	Produção de Lys168-15	Este trabalho
SF170-15	Derivada da CG61 transformada com pSF170-15	Produção de Lys170-15	Este trabalho
Vectores e plasmídeos recombinantes			
pIVEX 2.3d	3560pbs, PT7-MCS- <i>his6</i> -T7T, Amp ^r	Vector de expressão	Roche Applied Science
pGP1-2	7200pbs, PL-gene 1 T7; P _{lac} -Cl857, Can ^r	Produção da RNA polimerase do fago T7 após terminação	80
ΔpET87	pET29a(+): <i>lys87</i> ; <i>lys87</i> sob controlo do PT7, ΔS-tag, Can ^r	Base para construção de mutantes de deleção de <i>lys87</i>	C. Cantante (não publicado)
pSF166	pET29a(+): <i>lys166</i> , <i>lys166</i> sob controlo PT7	Expressão de <i>lys166</i>	Este trabalho
pSF161	pET29a(+): <i>lys161</i> , <i>lys161</i> sob controlo PT7	Expressão de <i>lys161</i>	Este trabalho
pSF148	pET29a(+): <i>lys148</i> , <i>lys148</i> sob controlo PT7	Expressão de <i>lys148</i>	Este trabalho
pSF168-87	pIVEX2.3d: <i>lys168-87</i> , <i>lys168-87</i> sob controlo PT7	Expressão de <i>lys168-87</i>	Este trabalho
pSF170-87	pIVEX2.3d: <i>lys170-87</i> , <i>lys170-87</i> sob controlo PT7	Expressão de <i>lys170-87</i>	Este trabalho
pSF15	pIVEX2.3d: <i>lys15</i> , <i>lys15</i> sob controlo PT7	Expressão de <i>lys15</i>	Este trabalho
pSF168-15	pIVEX2.3d: <i>lys168-15</i> , <i>lys168-15</i> sob controlo PT7	Expressão de <i>lys168-15</i>	Este trabalho
pSF170-15	pIVEX2.3d: <i>lys170-15</i> , <i>lys170-15</i> sob controlo PT7	Expressão de <i>lys170-15</i>	Este trabalho

Amp^r, gene de resistência à ampicilina; Can^r, gene de resistência à canamicina; P_{T7}, Promotor do fago T7; T_{7T} Terminador do fago T7; *His₆-Tag*, sequência codificante de uma extensão de 6 histidinas, adicionada à região 3' dos genes clonados.

As bactérias utilizadas no estudo da actividade lítica das lisinas recombinantes estão indicadas na tabela 2.2. Os meios de cultura usados para o seu crescimento pertencem à *Biokar Diagnostics* (Allone). O meio de cultura *Brain-Heart Infusion* (BHI) foi utilizado para o crescimento de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp e *Micrococcus luteus*. As estirpes de *S. pyogenes* foram crescidas em meio *Todd-Hewitt* suplementado com 2% de extracto de levedura (THY), *E. coli* e *Bacillus* spp. foram crescidos em meio LB. As culturas ocorreram à temperatura de 37°C, em ambiente de aerobiose e com agitação, exceptuando *Enterococcus* spp. que cresceu sem agitação.

As estirpes de *P. acnes* foram cultivadas em meio *Tryptone Yeast Glucose* (TYG) a 37°C, sem agitação e em condições de anaerobiose. Para o crescimento das estirpes bacterianas em meio sólido (caixa de Petri) suplementou-se cada meio com 1.5% de agar.

Tabela 2.2 Estirpes bacterianas usadas para determinar o espectro lítico das lisinas purificadas

ID da estirpe	Espécie	Tipo de amostra	Estirpe	Observações
626/07	<i>Propionibacterium acnes</i>	Exsudado cutâneo	PA hospitalar	-
919/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado purulento	STA hospitalar	-
964/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado do dreno	STA hospitalar	-
1011/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	MRSA
1013/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ponta de cateter	STA hospitalar	-
1018/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	MRSA
1133/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de cateter de diálise	STA hospitalar	-
1152/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado purulento	STA hospitalar	-
1154/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cateter	STA hospitalar	-
1275/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus de escara	STA hospitalar	MRSA
1319/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado lesão cutânea	STA hospitalar	-
1390/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de escara	STA hospitalar	-
1463/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado cutâneo	STA hospitalar	MRSA
1538/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	MSSA
1623/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado cutâneo	STA hospitalar	MSSA
1627/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado ombro	STA hospitalar	-
1641/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de escara	STA hospitalar	MRSA
1644/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	MRSA
1745/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado umbilical	STA ambulatório	MSSA
1862/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de escara	STA hospitalar	MRSA
1872/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ponta de cateter	STA hospitalar	-
1976/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de escara	STA ambulatório	MSSA
2121/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	MRSA
124/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	MRSA
351/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado cutâneo	STA hospitalar	-
399/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado umbilical	STA ambulatório	MSSA
400/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus	STA ambulatório	MSSA
623/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus do fleimão	STA hospitalar	MRSA
644/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado do pé	STA hospitalar	MRSA
746/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de úlcera	STA hospitalar	MRSA
748/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MRSA
815/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MRSA
920/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	MSSA
1035/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MRSA
1037/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	MRSA
1038/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
1039/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
1076/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	MRSA
1077/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MRSA
1102/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA ambulatório	MRSA
1149/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MRSA
1156/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado celulite	STA ambulatório	MSSA
1157/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	-	MRSA
1159/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
1201/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado fístula	STA hospitalar	MRSA
1203/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
1204/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	MRSA
1209/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	-	MSSA
84/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MRSA
161/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado purulento	STA hospitalar	MRSA
86/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	MRSA
163/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA ambulatório	MRSA
166/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado purulento	STA hospitalar	MRSA
196/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	-
214/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de ferida	STA hospitalar	MSSA
224/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
400/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MRSA
463/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
464/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
545/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado umbilical	STA hospitalar	-
547/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	-
565/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado faríngeo	STA hospitalar	-
566/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado faríngeo	STA hospitalar	-
567/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado faríngeo	STA hospitalar	-
662/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
171/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado da úlcera	STA ambulatório	MSSA

223/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	MSSA
546/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	-
578/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de escara	STA ambulatório	-
586/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	MSSA
594/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	-
663/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA ambulatório	MSSA
322/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	-	MRSA
325/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	-	MSSA
743/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	-
162/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus	STA hospitalar	MRSA
465/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus (zaragatoa)	STA hospitalar	MRSA
466/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus (zaragatoa)	STA hospitalar	MSSA
590/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus	STA hospitalar	MRSA
53/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
55/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
56/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
97/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado de escara	STA hospitalar	MRSA
129/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado	STA hospitalar	MSSA
130/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	Exsudado umbilical	STA hospitalar	MSSA
1020/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Líquido sinovial	STA hospitalar	-
941/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hemocultura	STA hospitalar	-
965/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hemocultura	STA hospitalar	MRSA
1094/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hemocultura	STA hospitalar	Oxa R
2013/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hemocultura	STA hospitalar	MRSA
793/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hemocultura	STA hospitalar	-
862/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hemocultura	STA hospitalar	MRSA
455/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA ambulatório	-
755/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA ambulatório	-
1389/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA hospitalar	-
1649/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA hospitalar	-
2030/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA ambulatório	MRSA
2144/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA ambulatório	-
541/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA hospitalar	-
1007/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA ambulatório	MRSA
1211/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina	STA ambulatório	MRSA
1736/05	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Exsudado do cateter	SCN hospitalar	-
107/08	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Exsudado face	SCN ambulatório	-
114/08	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Exsudado tronco	SCN ambulatório	-
546/06	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Urina	SCN hospitalar	-
158/08	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Exsudado do local do implantofix	SCN hospitalar	-
1930/05	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Ponta de cateter	SCN hospitalar	-
05/06	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Hemocultura	SCN hospitalar	-
06/06	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Urina	SCN ambulatório	-
1908/05	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Urina	SCN hospitalar	Multiresistente
1909/05	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Urina	SCN hospitalar	Multiresistente
110/08	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Urina	SCN hospitalar	-
1518/05	<i>Enterococcus sp.</i>	Pus	EN hospitalar	-
926/05	<i>Enterococcus sp.</i>	Hemocultura	EN hospitalar	-
46/06	<i>Enterococcus faecalis</i>	Pus peritoneal	EFS hospitalar	-
188/06	<i>Enterococcus faecium</i>	Hemocultura	EFM hospitalar	-
12/08	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Exsudado tronco	STR hospitalar	-
13/08	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Exsudado tronco	STR hospitalar	-
575/07	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC	ATCC	-
01/09	<i>Bacillus licheniformes</i>	ATCC	ATCC	-
02/09	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	ATCC	-
35/08	<i>Escherichia coli</i>	Urina	ECO hospitalar	-
44/08	<i>Escherichia coli</i>	Urina	ECO ambulatório	-

ID, Identificação; PA- *Propionibacterium acnes*; STA- *Staphylococcus aureus*; SCN- *Staphylococcus coagulase negativo*; EN-*Enterococcus sp*; EFS- *Enterococcus faecalis*; EFM- *Enterococcus faecium*; STR- *Streptococcus pyogenes*; ATCC- *American Type Culture Collection*; ECO- *Escherichia coli*; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensível à metilina; Oxa R-resistente à oxacilina.

2.2. Métodos e técnicas gerais de biologia molecular

2.2.1. Amplificação por PCR e Clonagem

As estratégias de clonagem usadas neste trabalho foram efectuadas de acordo com protocolos padronizados^[77]. As reacções de amplificação de DNA (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) ocorreram

num termociclador *Piko Thermal Cycle* (Finnzymes, Keilaranta), cujas condições foram determinados tendo em consideração a temperatura de emparelhamento dos oligonucleótidos (primers) (Tabela 2.3), tamanho do produto a amplificar e as instruções dos fabricantes para cada polimerase de DNA.

Tabela 2.3 Oligonucleótidos (primers) usados nas reacções de amplificação

Primers	Sequência (5' – 3')
87Xho-F	GTGAAAGAAGT <u>GTTCCTCGAG</u>
166Xho-R	CAGATTTCTCGAGTGCTTTTTGAGCAGGTGGTT
161Xho-R	CTTTTTGCTCGAGTGGTTAACTTTATTTGTGATC
148Xho-R	TCATTA <u>ACTCGAGACT</u> TTTATACTTAGGTCTAATAAAG
168Nco-F	GATTCATCCATGGTTAAATTAATGATGTACTTAGC
DJ168-87	GCTTTTTGAGCAGGTGGTTAACTTTTTGTCTAGATTTGGTTTATCTGGTTTTGGTGCAGGTGGTTTAGGCTT
170Nco-F	GTTTAATCCATGGCAGGAGAAGTATTTAGTAGCTTG
DJ170-87	GCTTTTTGAGCAGGTGGTTAACTTTTTGGCTCCGGCTTAACTGCATTGTTAGAGC
87DLPC	AAAGTTAAACCACCTGCTCAAAAAGC
87Xma-R	GGTGGTGCCCGGGAAACACTTCTTTCACAATCAATCT
15Nco-F	TGGTGGTCCATGGTGAGGTTTATTCCTGCAGC
15Xma-R	CAAACCACCCGGGCTTTTCCAAACCATTAACAGC
15DLPC	TCGGATCATGACGATCCTGG
DJ168-15	ACCACGGCCCAGGATCGTCATGATCCGATTGTCCTAGATTTGGTTTATCTGGTTTTGGTGCAGGTGGTTTAGGCTT
DJ170-15	ACCACGGCCCAGGATCGTCATGATCCGATTGCTCCGGCTTAACTGCATTGTTAGAGC
T7Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
T7Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

^aAs sequências sublinhadas indicam locais de reconhecimento de enzimas de restrição, CTCTGAG, *XhoI*; CCATGG, *NcoI*; CCCGGG, *XmaI*. Todos os primers foram adquiridos à Invitrogen (Carlsbad).

Os produtos amplificados foram purificados com o kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim) e clivados com enzimas específicas para o local de restrição adicionado pelos primers, seguido de inactivação enzimática (20min, a 80°C) e nova purificação de DNA. Os vectores plasmídicos foram extraídos com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) e os plasmídeos seleccionados com as construções pretendidas foram extraídos pelo método de lise alcalina^[10]. Após clivagem com as enzimas de restrição adequadas procedeu-se igualmente à inactivação enzimática e purificação por discos de diálise com 0.025µm de tamanho de poro (Millipore, Irlanda). Os produtos das digestões foram ligados por acção da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs, Frankfurt).

2.2.2. Transformação, sequenciação e análise de DNA

Os plasmídeos recombinantes pretendidos foram inicialmente isolados na estirpe de clonagem, *E. coli* XL1Blue-MRF', usando o protocolo de transformação descrito por Chung *et al.*,^[22]. Seleccionaram-se os clones positivos e extraiu-se o DNA plasmídico^[10]. A presença e posição do inserto, foi confirmada por PCR usando a polimerase de DNA *GoTaq Flexi DNA Polymerase* (Promega, Madison) e primers específicos para o vector de expressão, T7Promoter e o T7Terminator. Posteriormente, os plasmídeos com o inserto na posição e orientação correctos foram usados para transformar as estirpes de expressão indicadas.

A avaliação da integridade do DNA plasmídeo, restrições enzimáticas, extracções e purificações de DNA foi feita por electroforese em géis de agarose (concentração entre 0,7% e 1%) com brometo de etídio (0.5 µg/ml). Utilizou-se o tampão de electroforese Tris-Borato EDTA 0.5x (45mM Tris, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8.0) e o marcador de pesos moleculares *1kb Plus DNA Ladder*

(Invitrogen). Fotografou-se os géis com câmara digital acoplada ao software 1D versão 3.6 (Kodak) sob exposição de luz ultravioleta.

Os plasmídeos recombinantes usados para sequenciação foram extraídos com o *kit QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). As construções usadas na expressão de proteínas foram previamente confirmadas por sequenciação automática (Macrogen Inc., Seul).

Nos pontos 2.3 e 2.4 descrevo os passos diferenciais mais importantes que permitiram a construção dos vários plasmídeos recombinantes usados neste estudo.

2.3. Construção dos mutantes de deleção da lisina Lys87

Os mutantes de deleção da endolisina do fago F87 de *S. aureus*, Lys87, resultaram da truncagem do gene *lys87* transportado no plasmídeo Δ pET87 (gentilmente cedido por Cátia Cantante) (Fig. 2.1A). A construção dos derivados pSF166, pSF161 e pSF148 resultou de reacções de amplificação inversas do plasmídeo molde Δ pET87, usando uma polimerase de DNA de alta fidelidade (*High Fidelity PCR Enzyme Mix*, Fermentas) e o primer comum 87Xho-F combinado com os primers 166Xho-R, 161Xho-R, ou 148Xho-R, respectivamente (Fig. 2.1B). Os três produtos de PCR foram clivados com a enzima de restrição *XhoI* (Fermentas) e as moléculas recircularizadas por acção da T4 DNA ligase. Cada uma das construções codifica para oito aminoácidos adicionais na região C-terminal da proteína a expressar, a leucina (L) e o glutamato (E) devido à introdução do sítio de restrição para a enzima *XhoI* e seis histidinas (H) usadas na sua imunodeteção e purificação por cromatografia de afinidade.

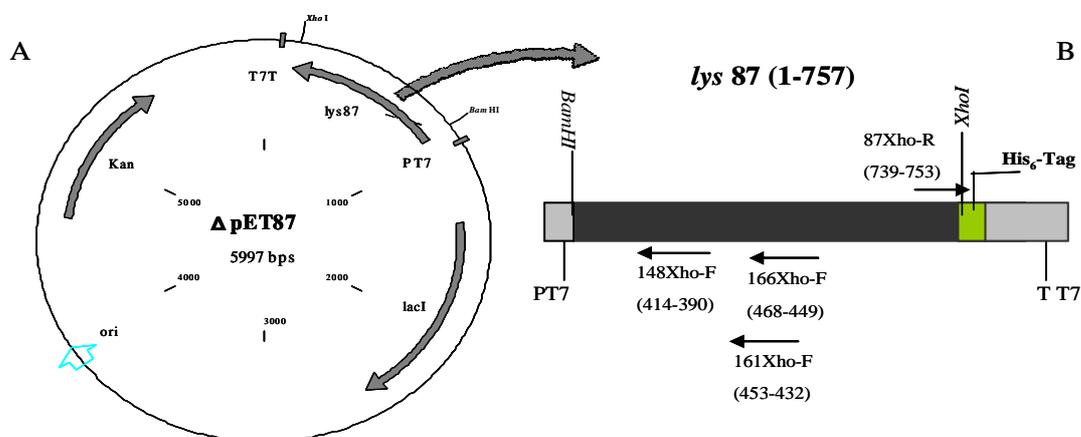


Fig. 2.1 Construção dos mutantes de deleção de Lys87. (A) Representação esquemática do plasmídeo recombinante Δ pET87 (B) Detalhes da região entre o promotor e terminador do fago T7, com o gene *lys87* clonado entre os locais de restrição BamHI e XhoI. Os primers utilizados nas reacções de amplificação estão indicados por setas. Os números entre parênteses indicam a posição dos nucleótidos reconhecidos pelos primers.

As construções derivadas do plasmídeo Δ pET87, *i.e.*, pSF166, pSF161 e pSF148 foram usadas para transformar a estirpe de expressão *E. coli* BL21 (DE3). De modo a monitorizar a produção de lisina repicaram-se vários clones de cada construção para placas com LB sólido suplementado com *S. aureus* autoclavados (0.2% massa/volume) (protocolo 2.7.1.1), can (40 μ g/ml), Triton-X 100 (0.1%) e IPTG (1mM) (adaptado de 100). Como controlo repicou-se a estirpe CC4 e *E. coli* BL21

(DE3)/pET29a(+). As placas foram colocadas a 37°C durante a noite e guardadas a 4°C. Os clones que apresentaram halos de lise em volta das colónias (evidência de produção de lisina activa) foram seleccionados para produção de enzima em meio líquido.

2.4. Construção das lisinas quiméricas e da lisina Lys15

Para a construção de lisinas quiméricas compostas pelo domínio catalítico de lisinas de fagos de *Enterococcus* sp. e o domínio de ligação à parede celular (DLPC) de Lys87 utilizou-se DNA purificado dos fagos F168 e F170 de *Enterococcus* sp. e do fago F87 de *S. aureus* (gentilmente cedidos por Clara Leandro e Filipa Silva, Technophage S.A.). Inicialmente realizaram-se três reacções independentes de PCR com amplificação de três fragmentos (Fig 2.2B). O primeiro foi amplificado a partir da região 5' do gene *lys168* (408pbs) utilizando os primers 168Nco-F e DJ168-87. O segundo com 546 pbs foi amplificado a partir da região 5' do gene *lys170* com os primers 170Nco-F e DJ170-87. Finalmente a partir da região 3' do gene *lys87* foi amplificado um terceiro fragmento de 327pbs, usando os primers 87DLPC e 87Xma-R. Em seguida realizaram-se duas novas reacções de PCR, tendo como objectivo a fusão dos fragmentos correspondentes às regiões 5' dos genes *lys168* e *lys170* com o fragmento 3' do gene *lys87*, anteriormente amplificados. Assim, para a amplificação de *lys168-87* usaram-se como DNA moldes os fragmentos de 408pbs e 327 pbs (de *lys168* e *lys87*, respectivamente) juntamente com o par de primers 168Nco-F e 87Xma-R. Para a amplificação de *lys170-87* combinaram-se os fragmentos de *lys170* (546pbs) e *lys87* e os primers 170Nco-F e 87Xma-R. A fusão foi possível devido à complementaridade entre as extremidades 3' e 5' das porções de DNA a fundir, usando o método de OE-PCR^[99] (*Overlap Extension PCR*) e uma polimerase de DNA de alta fidelidade (Fermentas). Seguidamente realizou-se uma digestão dupla com as enzimas de restrição *NcoI* (Invitrogen) e *XmaI* (New England Biolabs) em tampão NEbuffer 4 suplementado com BSA (*Bovine Serum Albumin*). Os fragmentos resultantes foram clonados entre os locais *NcoI* e *XmaI* do vector de expressão pIVEX 2.3d (Fig. 2.2A) obtendo-se os plasmídeos pSF168-87 e pSF170-87.

Utilizando o DNA purificado do fago F15 de *Propionibacterium acnes* (gentilmente cedido por Clara Leandro e Filipa Silva) procedeu-se à construção de plasmídeos recombinantes com os genes *lys15*, *lys168-15* ou *lys170-15*.

Para a construção do pSF15 amplificou-se um produto de 858pbs com os primers 15Nco-F e 15Xma-R, e clonou-se no vector pIVEX 2.3d, entre os locais *NcoI* e *XmaI*.

A metodologia seguida para a construção das lisinas quiméricas contendo o domínio catalítico de lisinas de fagos de *Enterococcus* sp. (Lys168 e Lys170) fundido ao DLPC de Lys15, foi semelhante à descrita anteriormente, com recurso à técnica de OE-PCR (Fig. 2.2B). Assim em paralelo procedeu-se à amplificação de um fragmento de 409pbs a partir da região 3' de *lys15* com os primers 15DLPC e 15Xma-R e à amplificação dos fragmentos 5' dos genes *lys168* e *lys170* (562pbs e 617pbs, respectivamente), com os respectivos pares de primers 168Nco-F /DJ168-15 e 170Nco-F/ DJ170-15. A fusão dos fragmentos 5' e 3' resultantes foi feita noutra reacção de PCR utilizando o par de primers 168Nco-F/15Xma-R para produzir *lys168-15* e o par 170Nco-F/15Xma-R para o *lys170-15*.

Seguidamente estes genes quiméricos foram clonados entre os locais NcoI e XmaI do vector de expressão pIVEX 2.3d, originando os plasmídeos recombinantes pSF168-15 e pSF170-15.

As construções derivadas do vector de expressão pIVEX2.3d, implicaram a adição de onze aminoácidos na região C-terminal da proteína a expressar, uma prolina (P), três glicinas (G) e uma serina (S), devido à introdução do sítio de restrição para a enzima *XmaI*, presença de uma região *linker* e um *tag* de seis histidinas (H) (Fig. 2.2A), este último usado na imunodeteção e purificação por cromatografia de afinidade.

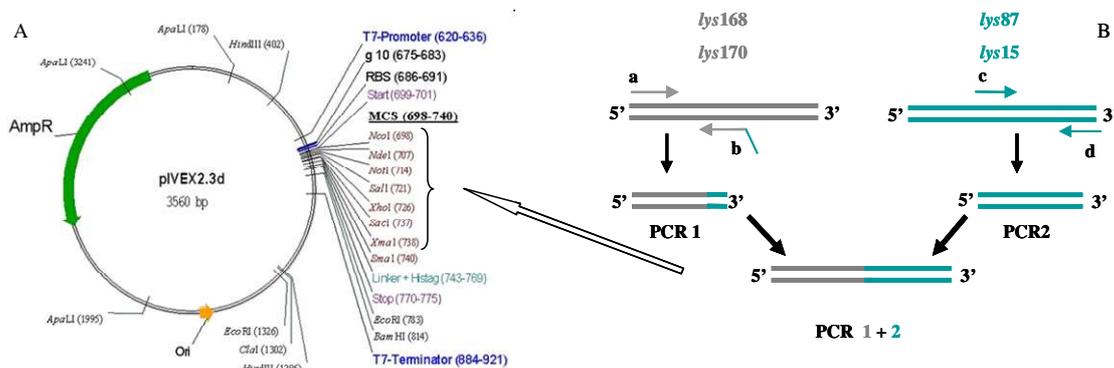


Fig. 2.2 Construção das lisinas quiméricas. (A) Mapa do vector pIVEX2.3d. (B) Representação esquemática do OE-PCR, de modo a obter o produto codificante de Lys168-87, Lys170-87, Lys168-15 e Lys170-15. Os primers estão indicados pelas letras **a** (168Nco-F, 170Nco-F e 15Nco-F), **b** (DJ168-87, DJ170-87, DJ168-15 e DJ170-15), **c** (15DLPC e 87DLPC) e **d** (87Xma-R e 15Xma-R). O produto de amplificação do PCR 1+2 foi digerido pelas enzimas *NcoI* e *XmaI* e transformado no vector pIVEX2.3d.

As construções derivadas do pIVEX2.3d (pSF168-87, pSF170-87, pSF15, pSF168-15 e pSF170-15) foram usadas para transformar a estirpe de expressão *E. coli* CG61, obtendo-se as respectivas estirpes SF168-87, SF170-87, SF15, SF168-15 e SF170-15. Posteriormente repicaram-se vários transformantes para placas de LB com 1% agarose, *S. aureus* autoclavados (no caso das estirpes SF168-87 e SF170-87) ou *P. acnes* autoclavados (no caso das estirpes SF15, SF168-15 e SF170-15), ambos à concentração final de 0.2% massa/volume, amp (100µg/ml) e/ou can (40µg/ml) e Triton-X 100 (0.1%). Como controlo repicou-se a estirpe *E. coli* CG61/pIVEX2.3d. As placas foram incubadas inicialmente a 28°C durante a noite e posteriormente a 37°C durante 16hrs, de modo a induzir a produção das lisinas, guardando-se depois a 4°C. No caso das estirpes SF15, SF168-15 e SF170-15, antes, após a indução da expressão proteica, as placas foram sujeitas a vapores de clorofórmio durante 2-5min, seguido de um período de incubação de 5hrs novamente a 37°C e posteriormente guardadas a 4°C, até ao aparecimento de halos de lise.

2.5. Produção e purificação de lisinas recombinantes

2.5.1. Condições de expressão das lisinas recombinantes

Para tentar otimizar a produção de lisina na forma solúvel, utilizaram-se duas abordagens para a expressão da lisinas recombinantes.

No primeiro método, as culturas de *E. coli* transformadas com as construções derivadas do $\Delta pET87$ e pIVEX2.3d foram crescidas até à fase exponencial, $DO_{600nm} = 0.4-0.6$ (*Spectrometer UV4*, Unicam), em meio selectivo. A expressão de lisinas nas estirpes SF166, SF161, SF148 foi induzida pela adição de 0,5mM de IPTG, enquanto que nas estirpes SF168-87, SF170-87, SF168-15, SF170-15 e SF15 foi por choque térmico (30min a 42°C, em banho húmido com agitação). Seguiu-se um período de incubação de 3hrs, a 37°C, com agitação.

Na segunda abordagem, as culturas derivadas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com as construções pSF166, pSF161 e pSF148 e *E. coli* CG61 transformadas com os plasmídeos recombinantes pSF168-87, pSF170-87 e pSF15 foram crescidas até à $DO_{600nm} = 0,8-1,0$, em meio selectivo. De seguida as culturas bacterianas foram colocadas a 20°C, durante 30min, com agitação. A indução da produção das enzimas ocorreu após adição de 0,350mM de IPTG, para as estirpes derivadas da BL21 (DE3) ou choque térmico, para as estirpes derivadas da CG61, seguido de incubação a 16°C, durante 14hrs, com agitação.

A produção de lisinas foi avaliada por SDS-PAGE e *Western Blot* (protocolo 2.6), retirando-se alíquotas de cada cultura bacteriana (entre 0,5-1 ml), antes e após indução, correspondentes aos tempos 0hrs (T_0) e 3hrs ou 14hrs (T_1), consoante a abordagem usada. Recolheram-se as células por centrifugação (5000xg, durante 5min a 4°C) e ressuspenderam-se em tampão SDS 2x (4% SDS, 100mM Tris-HCL pH 6.8, 10% glicerol, 1,4% β -mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol). Os extractos foram congelados a -20°C para posterior análise. Após a indução centrifugou-se o volume restante de cada cultura (10000xg, 20 min a 4°C) e guardou-se o sedimento celular (*pellet*) a -80°C.

2.5.2. Monitorização da solubilidade das lisinas recombinantes

Antes da purificação das lisinas recombinantes verificou-se a sua solubilidade nos extractos totais produzidos nas diferentes condições e avaliou-se a sua potencial actividade lítica. Os *pellets* obtidos em 2.5.1 e guardados a -80 °C foram ressuspensos em 1-2 ml de tampão de lise A (20mM Hepes, 300mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM glucose, 1 mM DTT). Este tampão foi ajustado para pH 6,5 no caso de Lys166, Lys161, Lys148, Lys168-87, Lys170-87, Lys15 e Lys170-15 ou pH 8 para Lys168-15. Estes valores de pH garantiram uma diferença de pelo menos uma unidade relativamente ao ponto isoelétrico previsto bioinformaticamente para cada uma das lisinas recombinantes. Imediatamente antes da sua utilização o tampão foi suplementado com benzonase a 25U/ml (Novagen) e uma mistura de antiproteases (*CompleteTM EDTA-free*, Roche Applied Science). A lise celular ocorreu num sonicador com sonda (*Vibra Cell MS2T*, Sonic Materials) usando-se ciclos de pulsos descontínuos de 1min (amplitude 50, pulso 3, 30-40W) alternados com 1minuto de pausa, com a amostra sempre no gelo, para evitar sobre aquecimento. A fracção solúvel foi obtida por centrifugação (30000xg, 30 min, a 4°C). A presença das lisinas na fracção solúvel foi confirmada por SDS-PAGE e *Western Blot*.

A possível actividade lítica presente nos extractos foi verificada pela adição de 5 μ l da fracção solúvel em meio sólido (1% agarose, 20mM Heppes pH 6.5 ou 8 e 20 μ l/ml de cloranfenicol), suplementado com *S. aureus* autoclavados (para Lys166, Lys161, Lys148, Lys168-87 e Lys170-87)

ou *P. acnes* autoclavados (para Lys15, Lys168-15 e Lys170-15), ambos à concentração final de 0.2% massa/volume. As placas foram a incubar a 37°C, durante a noite.

2.5.3. Purificação por cromatografia de afinidade- FLPC

Após análise da solubilidade e actividade lítica das lisinas produzidas neste trabalho, seleccionaram-se as melhores enzimas para purificação por cromatografia de afinidade, *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC).

A indução da expressão de Lys166, Lys161, Lys168-87 e Lys170-87 a partir das estirpes SF166, SF161, SF168-87 e SF170-87, respectivamente, foi realizada de acordo com o protocolo 2.5.1, durante 14hrs a 16 °C, num volume de 200 ml de cultura. As células foram recolhidas por centrifugação (20000xg, 30min a 4°C) e ressuspendidas em 5 ml de tampão de lise B (20mM Hepes pH 6.5, 500mM NaCl, 1% glicerol, 1mM DTT e 20mM Imidazol), suplementado com cocktail de antiproteases. A lise celular e obtenção da fracção solúvel ocorreu como descrito em 2.5.2. Os extractos solúveis contendo as lisinas fundidas a uma cauda de His₆ foram filtrados por uma membrana de poro de 0.22µm e passadas por uma coluna *HisTrapTM HP* (GE Healthcare), com matriz de sefarose e níquel (Ni²⁺), acoplada a um sistema de FPLC (*ÄKTAprimeTM plus*, GE Healthcare). A coluna foi primeiro lavada com cerca de 10 a 15 ml de tampão B e depois a mesma quantidade tampão B mais 6% de tampão C (20 mM Hepes, pH 6.5, 500 mM NaCl, 1% glicerol, 1 mM DTT e 500 mM imidazol), a um fluxo de 1 ml/min. A concentração final de imidazol nesta segunda lavagem foi de Ca 50mM. Após a adição de 100% de tampão C deu-se a eluição da lisina num único passo. Seguidamente, as fracções contendo a lisina purificada foram passadas através de uma coluna *HiTrapTM Desalting* (GE Healthcare) com matriz de sefadex G-25 superfina, também associada ao sistema de FPLC, ocorrendo a transferência das lisinas para o tampão D (50 mM Pho-Na, pH 6.5, 500 mM NaCl, 25% glicerol, 1 mM DTT) num processo semelhante ao da cromatografia por exclusão molecular. Analisaram-se todas estas etapas de purificação por SDS-PAGE, recolhendo-se uma amostra da fracção solúvel antes da purificação, das proteínas que não se ligaram à coluna de níquel (*flowthrough*), das fracções obtidas após purificação e das fracções puras de lisina em tampão D (após *desalting*).

Quando necessário as fracções contendo as lisinas foram concentradas numa cassete *Vivapore 10/20* com um tamanho de poro de 7500 MWCO (Sigma-Aldrich, Germany).

2.5.4. Quantificação das proteínas recombinantes purificadas

A concentração de proteína total purificada existente em solução foi determinada pelo método de *Bradford*^[8], seguindo as instruções indicadas no kit comercial *Bio-Rad Protein Assay Standard II* (Bio-Rad). Construiu-se a recta padrão usando amostras de albumina bovina a concentrações entre 1 a 20 µg/ml.

2.6. Análise das lisinas por electroforese em gel de SDS-PAGE e por *Western Blot*

Os géis de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) indicados neste trabalho foram constituídos por um gel de resolução a 15% produzidos a partir de soluções concentradas *Protogel* (National Diagnostics) e suplementados com 5% de sacarose para aumentar a sua plasticidade após polimerização. As amostras proteicas a analisar foram suplementadas com tampão SDS 5x e fervidas a 100°C, durante 10min. O marcador de peso molecular utilizado foi o *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas). A electroforese ocorreu no sistema *Mini-Protean Tetra Cell* (Bio-Rad). Após a electroforese, os géis foram imersos numa solução corante de azul de *Coomassie* (0,25% azul brilhante *Coomassie* R250, 50% metanol, 10% ácido acético) durante 1h, à temperatura ambiente. Os géis foram seguidamente imersos numa solução de descoloração (10% ácido acético e 30% metanol) até obtenção do contraste pretendido.

Para a realização da imunodeteção por *Western Blot*, transferiram-se as proteínas do gel de SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose *Hybond C* (GE Healthcare, Munique), durante 1h, a 200 mA, usando o sistema de transferência *Mini Transblot Module* (Bio-Rad). Após a transferência colocou-se a membrana a 4°C, durante a noite, numa solução de bloqueio PBS 1x/ Tween20 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,3 e 0.2% Tween20) suplementado com 5% leite em pó (Nestlé). Lavou-se a membrana com a solução PBS 1x/Tween20 e incubou-se durante 1h, à temperatura ambiente, em PBS1x/Tween20 com 1% de leite em pó e o anticorpo anti-His₆ diluído de 1:5000 (Roche). Os complexos lisina/anti-His₆ foram revelados com o kit comercial *ECL™ Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare) e com a impressão de chapas fotográficas *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare), cuja revelação foi efectuada em câmara escura num aparelho automático AGFA *Curix 60*.

2.7. Estudo da actividade lítica das lisinas recombinantes

2.7.1. Ensaio em meio sólido

2.7.1.1. Actividade lítica sobre células bacterianas autoclavadas

As estirpes de *S. aureus* 1020/05 e de *P. acnes* 626/07 (Tabela 2.2) crescidas durante a noite, nas condições descritas em 2.1, foram diluídas 1:100 em meio fresco e crescidas até DO_{600nm}= 0.7–0.8. As células foram recolhidas por centrifugação (10000x g, 15 min, 4°C; Beckman J2-21M). Os *pellets* celulares foram lavados uma vez com PBS 1x frio e depois com água miliQ estéril, seguido de uma nova centrifugação. Determinou-se o peso fresco do *pellet* celular e ressuspendeu-se em água miliQ estéril de modo a obter 3% massa/volume antes de se autoclavar (15min, a 121°C). Estas células autoclavadas foram utilizadas nos protocolos descritos em 2.3, 2.4 e 2.5.2.

2.7.1.2. Actividade lítica sobre células bacterianas viáveis

As diferentes espécies bacterianas listadas na tabela 2.2, à excepção da estirpe de *P. acnes*, foram crescidas em 5ml dos meios apropriados. Após incubação durante a noite diluíram-se as culturas de 1:100 em meio fresco (50ml), seguindo-se o seu crescimento até à $DO_{600nm} = 0.8-1.0$. Recolheram-se as células por centrifugação (5000xg, 35min a 4°C) e concentraram-se 100x em meio fresco. Retiraram-se 100µl desta suspensão bacteriana para 10ml de tampão de incorporação (25 mM tampão fosfato de sódio pH 6.5, 250 mM NaCl, 0.7% agar) e espalhou-se em caixa de Petri.

As proteínas purificadas foram diluídas em tampão D (ver 2.5.3) e aplicaram-se nas placas com as várias estirpes a testar 5 µl de cinco diluições: 2 µg/µl (10µg), 1µg/ µl (5µg), 0,2µg/ µl (1µg) e 0.04 µg/ µl (0,2µg) no caso de Lys168-87 e Lys170-87 e de duas diluições: 1µg/µl (5µg) 0.5µg/ µl (2,5µg), no caso de Lys161. Como controlo aplicaram-se 10 µl de tampão D e 5 µl de lisostafina a 2 µg/µl (10µg).

2.7.2. Ensaio em meio líquido

No ensaio em meio líquido seleccionou-se a estirpe 566/07 de *S. aureus* e monitorizou-se o seu crescimento em meio fresco até à $DO_{600nm} = 0,3-0,4$. Recolheram-se as células por centrifugação (5000xg, durante 35 min, a 4°C) e concentrou-se 2x em tampão de incorporação líquido ou BHI de modo a obter uma $DO_{600nm} = 0,6-0,8$. Distribuiu-se 1ml destas suspensões celulares por cuvetes e aplicou-se em separado 5µl de cada lisina purificada a uma concentração de 10µg/ml (Lys168-87 e Lys170-87) ou 5µg/ml (Lys161). Como controlo aplicou-se 5µl de tampão D. Realizaram-se leituras periódicas da absorvência a 600nm, antes e após a aplicação das lisinas.

Para testar a **viabilidade celular** fizeram-se diluições seriadas em BHI das misturas acima descritas obtidas antes e após os 65min da aplicação das lisinas ou tampão D. Plaquearam-se 100µl destas diluições para caixas de BHI e incubou-se durante a noite a 37°C. Determinaram-se as ufc/ml.

2.8. Análise bioinformática

As sequências de DNA e proteínas foram analisadas com os softwares Sci Ed Central (versão 1.3.0) e Gene Runner (versão 3.05).

Inicialmente identificou-se no DNA fágico as grelhas de leitura (ORFs, *Open Reading Frames*) que codificassem potenciais lisinas fágicas, comparando as homologias destas com as sequências de lisinas presentes nas bases de dados bioinformáticas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Determinou-se a família de cada lisina com o programa Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Os alinhamentos das sequências nucleotídicas e de aminoácidos foram realizados com o programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). O programa bioinformático DLP-SVM (<http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi>) permitiu a localização das possíveis regiões *linker* em cada lisina, possibilitando a construção das lisinas quiméricas e mutantes de deleção da Lys87. A estrutura secundária de cada proteína foi determinada com o programa PSIPRED *Protein Structure Prediction Server* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

3. RESULTADOS

3.1. Identificação e análise das sequências das lisinas fágicas

Neste trabalho utilizou-se o DNA genómico do fago F87 da estirpe *S. aureus* 1020/05 (C. Cantante, em publicação), dos fagos F168 e F170 das estirpes de *Enterococcus* sp. 1518/05 e 926/05, respectivamente, e do fago F15 da estirpe *P. acnes* 626/07 (C. Leandro e F. Silva, não publicado) (Tabela 2.2). Após sequenciação destes genomas e análise com as ferramentas BLAST, identificaram-se as *orfs* codificantes das potenciais lisinas fágicas, por homologia com sequências aminoacídicas de lisinas fágicas já descritas. Os produtos destas *orfs* denominaram-se de Lys87 (C. Cantante, em publicação), Lys168, Lys170 (D. Proença, não publicado) e Lys15, respectivamente.

A análise das sequências de aminoácidos destas potenciais lisinas revelou tratarem-se de enzimas modulares, com a estrutura típica das lisinas fágicas, ou seja, um domínio conservado na região N-terminal, responsável pela actividade lítica e um domínio não conservado na região C-terminal, presumivelmente envolvido no reconhecimento da parede celular bacteriana, separados por uma região flexível (*linker*). As lisinas Lys168 (237 aas) e Lys87 (251 aas) pertencem ambas à família CHAP (*Cysteine Histidine-dependent Amidohydrolases/Peptidases*) com actividade prevista de peptidase. Análises *in silico* revelaram a presença do domínio CHAP entre as posições 12 e 137 para a Lys168 e 12 e 133 para a Lys87. As lisinas Lys15 (286 aas) e Lys170 (289 aas) pertencem à família das Amidases do tipo 2, com actividade prevista de N-acetilmuramyl-L-alanina amidase presente em N-terminal, entre os aminoácidos 7 e 181 para a Lys15 e 17 e 162 para a Lys170.

3.2. Caracterização e expressão das lisinas recombinantes

3.2.1. Lisinas derivadas de Lys87

Resultados prévios demonstraram que Lys87 quando superproduzida em *E. coli*, em condições específicas, encontrava-se maioritariamente na fracção insolúvel na forma de corpos de inclusão inactivos. Verificou-se igualmente que a recuperação de lisina a partir destes corpos de inclusão seguido da sua renaturação era um processo pouco eficiente^[17]. Tendo como objectivo otimizar a produção de lisinas solúveis, na conformação activa, elevado grau de pureza e activas contra *S. aureus*, utilizou-se o gene *lys87* como molde em duas estratégias de clonagem distintas (protocolos 2.3 e 2.4).

Estando a produção de proteínas unimodulares descrita como uma boa estratégia para o uso terapêutico de lisinas, minimizando não só problemas de solubilidade como uma potencial resposta imunogénica^[41], neste trabalho a partir do plasmídeo Δ pET87, construíram-se os plasmídeos recombinantes pSF166, pSF161 e pSF148, codificantes para lisinas unimodulares. Os produtos destes plasmídeos possuem o domínio catalítico CHAP de Lys87 intacto e diferem entre si apenas na extensão da região *linker* (Fig. 3.1A). A selecção dos aminoácidos a eliminar na região *linker* de Lys87 foi feita com base em análises bioinformáticas e nos resultados descritos por Horgan *et al.*,

para a LysK^[41], tendo-se eliminando completamente a região correspondente ao DLPC. Foram igualmente tidos em consideração os resultados obtidos noutros estudos, em que lisinas sem este domínio na região C-terminal mantinham a sua actividade lítica^[20, 36].

Num trabalho desenvolvido no laboratório, verificou-se que lisinas de fagos de *Enterococcus* sp. (Lys168 e Lys170) tinham elevada solubilidade quando superproduzidas em *E. coli*. Tendo em consideração a estrutura modular típica das lisinas, a outra estratégia passou pela produção de lisinas quiméricas. Nestas, à região C-terminal de Lys87 foi adicionado o domínio catalítico CHAP de Lys168 ou Amidase-2 de Lys170, presentes na região N-terminal, obtendo-se as lisinas Lys168-87 e Lys170-87. Em ambas as construções foi mantida parte da região *linker* das proteínas parentais (fig. 3.1B).

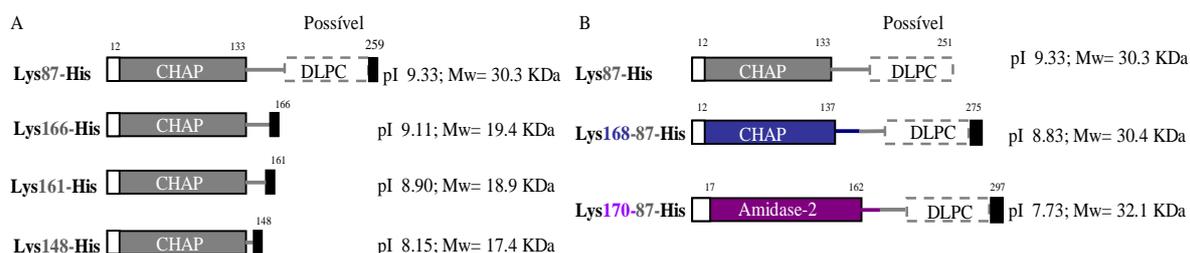


Figura 3.1 Representações esquemáticas das lisinas recombinantes derivadas de Lys87. (A) Lys87 e respectivos mutantes de deleção da região C-terminal: Lys166, Lys161 e Lys148. O domínio catalítico CHAP encontra-se representado a cheio (cinzento). (B) Lisinas quiméricas compostas pela região N-terminal de Lys168 (azul) ou Lys170 (roxo) fundida à região C-terminal de Lys87 (tracejado cinzento). Traços a azul, roxo e cinzento, representam partes das regiões *linker* das lisinas parentais. A localização, em aminoácidos, de cada domínio está indicada no topo destes (segundo ferramenta pfam). O rectângulo preto representa o *Tag* adicionado pelo vector plasmídeo, 8 aminoácidos em (A) e 11 aminoácidos em (B). O pI (ponto isoelétrico) teórico e o Mw (peso molecular) de cada lisina recombinante foi determinado pelo programa Sci Ed Central.

Os clones das estirpes seleccionadas para a produção das lisinas Lys166, Lys161, Lys148, Lys168-87 e Lys170-87 apresentaram todas halos de lise em placas com *S. aureus* autoclavados (protocolos 2.3 e 2.4) (Fig. 3.2A), sendo estes bastante semelhantes entre si e ao apresentado pela estirpe CC4, que expressa Lys87 na forma nativa (Fig. 3.2B). Como seria de esperar os controlos negativos, *E. coli* CG61/pET29a(+) e BL21 (DE3)/pIVEX2.3d não apresentaram halos de lise. Temporalmente as estirpes SF168-87 e SF170-87 foram as primeiras a evidenciar halos de lise, que apareceram ao fim de 24hrs, enquanto que nas estirpes transformadas com as construções derivadas do vector Δ pET87 estes só surgiram após permanência das placas durante 48hrs, a 4°C.

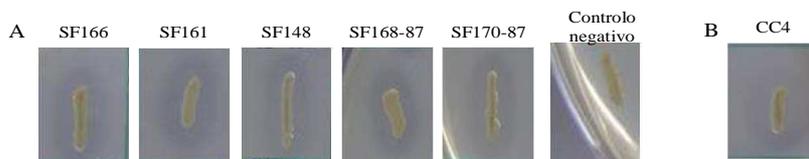


Figura 3.2 Actividade lítica em placa com *S. aureus* autoclavados, pelas estirpes de *E. coli* transformadas com as construções derivadas de Lys87 (A) e Lys87 na forma nativa (B).

Adicionalmente à estratégia de clonagem utilizaram-se duas abordagens para minimizar a formação de corpos de inclusão em *E. coli* e otimizar a recolha das lisinas derivadas de Lys87 na fracção solúvel (protocolo 2.5.1). O resultado de cada procedimento foi monitorizado por SDS-PAGE e

Western Blot, analisando-se a quantidade de lisina presente no extracto proteico total e na fracção solúvel, recolhidos ao tempo 1 (T_1) após indução da expressão proteica, que decorreu num período de 3hrs, a 37°C ou de 14hrs, à temperatura de 16°C.

Nos extractos proteicos totais recolhidos em ambas as abordagens verificou-se uma quantidade semelhante de Lys166, Lys161 e Lys148, indicando uma produção equivalente destas (Fig. 3.3). No entanto, na fracção solúvel (F_s) a maior quantidade de lisina solúvel foi recolhida quando a expressão proteica ocorreu a 16°C mas, mesmo nestas condições, há um decréscimo de cerca de 5x na quantidade de lisina relativamente ao que é observado no extracto proteico total (Fig. 3.3, C e D). As lisinas Lys166 e Lys161 foram as que apresentaram melhor expressão proteica e maior quantidade na fracção solúvel comparativamente a Lys148 (Fig. 3.3D). Mais importante, observou-se uma melhoria na solubilidade, dos mutantes de deleção de Lys87 em relação à lisina parental, que não foi recolhida em quantidades significativas na forma solúvel após indução a 37°C ou a 16°C (Fig. 3.3, C e D).

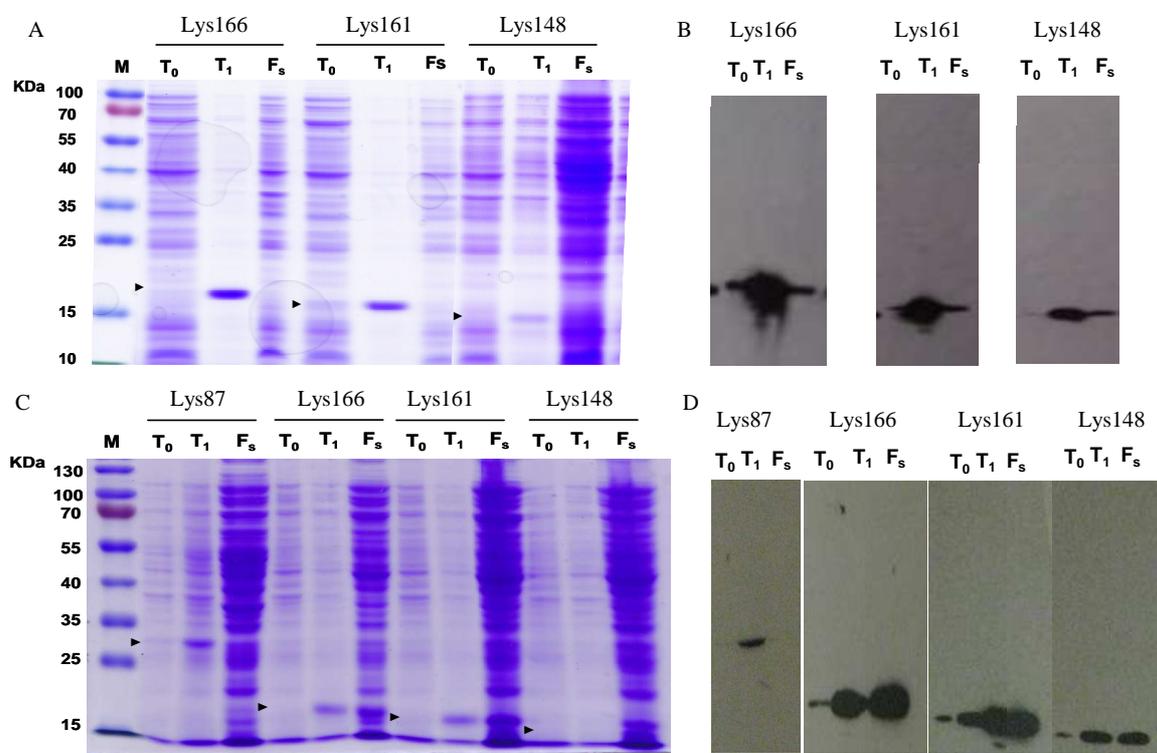


Figura 3.3 Análise da produção de Lys166, Lys161 e Lys148, por SDS-PAGE, após coloração com *Coomassie blue* (A e C) e por *Western Blot* usando o anticorpo anti-His₆ (B e D). Painel superior, expressão proteica a 37°C, durante 3hrs. Painel inferior, expressão proteica a 16°C, durante 14hrs. M, marcador de peso molecular; T_0 , extracto proteico total recolhido antes da indução; T_1 , extracto proteico total recolhido após indução (diluído de 1/5); F_s , fracção solúvel. ▶ assinala a localização de cada lisina.

As lisinas quiméricas Lys168-87 e Lys170-87 foram igualmente detectadas em maior quantidade na fracção solúvel recolhida após indução das estirpes SF168-87 e SF170-87 durante 14hrs a 16°C (Fig. 3.4). Há semelhança do que se verificou para os mutantes de deleção de Lys87, quando a expressão ocorreu a 37°C obteve-se pouca quantidade de lisina na forma solúvel (dados não apresentados).

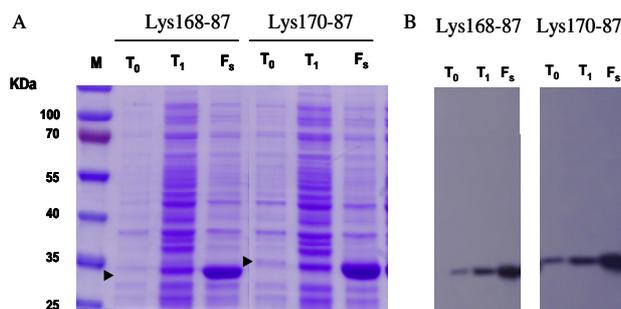


Figura 3.4 Análise da produção de Lys168-87 e Lys170-87, por SDS-PAGE após coloração com *Coomassie blue* (A) e por *Western Blot* usando o anticorpo anti-His₆ (B). M, marcador de peso molecular; T₀, extracto proteico total recolhido antes da indução; T₁, extracto proteico total recolhido após indução; F_s, fracção solúvel. ► assinala a localização de cada lisina.

Quando se aplicaram amostras das fracções solúveis em placas com *S. aureus* autoclavados (protocolo 2.5.2), apenas as que resultaram da síntese proteica a 16°C é que produziram halos de lise óbvios. Relativamente aos mutantes de deleção de Lys87, as lisinas Lys166 e Lys161 foram as que apresentaram melhor actividade lítica, enquanto que nas lisinas quiméricas foi a Lys170-87 (Fig. 3.5). Os extractos solúveis com as lisinas quiméricas foram os que produziram maiores halos de lise.

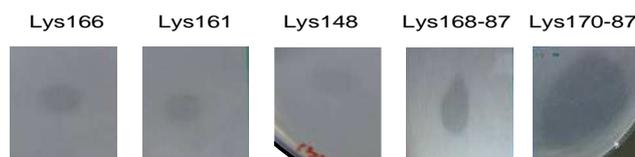


Figura 3.5 Actividade lítica dos extractos solúveis, das diferentes lisinas recombinantes, em *S. aureus* autoclavados. Os extractos solúveis aplicados foram produzidos pelas estirpes (esquerda para a direita) SF166, SF161, SF148, SF168-87 e SF170-87, após indução a 16°C, durante 14hrs.

3.2.2. Lisinas derivadas de Lys15

Posteriormente expressaram-se três lisinas recombinantes com possível actividade lítica contra *P. acnes*. Inicialmente produziu-se a lisina Lys15 na forma nativa e antecipando potenciais problemas de solubilidade fundiu-se a região contendo o DLPC de Lys15 com a região contendo o domínio catalítico de Lys168 ou Lys170 (D. Proença, não publicado), obtendo-se as respectivas lisinas quiméricas, Lys168-15 e Lys170-15 (Fig. 3.6A). Há semelhança do que foi realizado para as estirpes produtoras das lisinas derivadas de Lys87, as estirpes SF15, SF168-15 e SF170-15 foram repicadas para caixas com *P. acnes* autoclavados, tendo-se verificado apenas um ligeiro halo de lise à volta da estirpe SF15, após três semanas a 4°C (dados não apresentados).

Para determinar se a ausência ou fraca capacidade de lise se devia a uma deficiente produção das lisinas, a expressão proteica foi primeiro avaliada a 37°C durante 3hrs. Curiosamente apesar de Lys168-15 e Lys170-15 não evidenciarem actividade lítica contra as células alvo, quando se analisou o extracto proteico total, por SDS-PAGE, verificou-se que a sua produção em *E. coli* foi superior à de Lys15, sendo Lys170-15 inclusivamente detectada na fracção solúvel (Fig. 3.6B e C). Isto parece indicar que a ausência de lise não pode ser explicada pela ausência de proteína. A aplicação das fracções solúveis em placas com *P. acnes* autoclavados não produziu halos de lise (dados não apresentados)

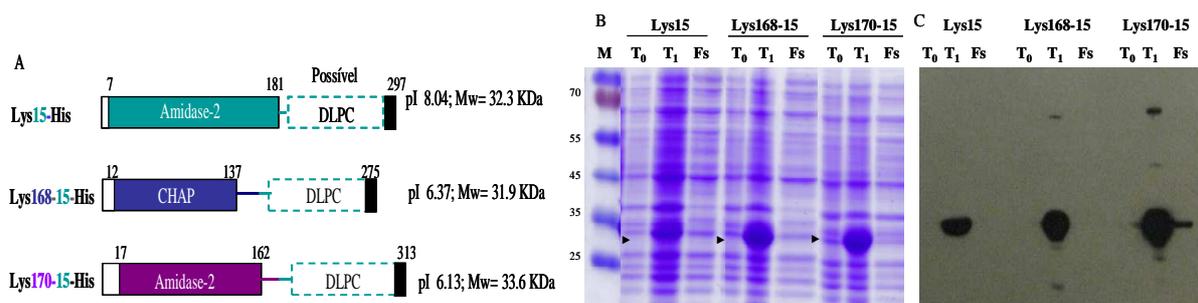


Figura 3.6 (A) Representações esquemáticas de Lys15 nativa e das lisinas quiméricas, Lys168-15 e Lys170-15, com a região N-terminal de Lys168 (azul) ou Lys170 (roxo) conjugada com a região C-terminal de Lys15 (tracejado). Os traços a azul, roxo e verde, são partes região *linker* das lisinas parentais, que foram mantidos nas novas construções. As coordenadas, em aminoácidos, de cada domínio, estão indicadas no topo destes (base de dados pfam). O rectângulo preto representa o *Tag* de 11 aminoácidos adicionado pelo vector plasmídico. O pI (ponto isoelétrico) teórico e o Mw (peso molecular) foi determinado pelo programa Sci Ed Central. (B) Análise da produção de Lys15, Lys168-15 e Lys170-15, por SDS-PAGE após coloração com *Coomassie blue* e por *Western Blot* (C), usando o anticorpo anti-His₆. O extracto proteico total (T₁) e fracção solúvel (F_s) foram obtidos após indução por choque térmico, seguido de expressão proteica durante 3 hrs a 37°C. T₀, extracto proteico total obtido antes da indução. M, marcador de peso molecular. ► assinala a localização de cada lisina.

Como a lisina Lys15 foi a única que demonstrou alguma actividade lítica, tentou-se otimizar a sua recolha na fracção solúvel produzindo-se esta durante 14hrs, a 16°C. Observou-se uma pequena quantidade desta lisina na forma solúvel, contudo quando se aplicou esta fracção em placas com *P. acnes* autoclavados, não houve novamente produção de halos de lise (dados não apresentados).

3.3. Purificação das lisinas recombinantes por cromatografia de afinidade- FLPC

Após a análise dos resultados acima descritos optou-se por purificar apenas as lisinas Lys166, Lys161, Lys168-87 e Lys170-87 pois foram as que apresentaram conjuntamente, boa actividade lítica e elevada solubilidade. Realizou-se uma purificação por cromatografia de afinidade, FPLC, no sistema AKTAp_{prime plus}, em que estas lisinas recombinantes acopladas ao peptido His₆ na região C-terminal foram imobilizadas numa matriz de sefarose com níquel. Este processo de ligação depende essencialmente da variação da concentração de imidazol que, adicionado a baixas concentrações (20mM a 50mM) minimiza a ocorrência de ligações inespecíficas à coluna de proteínas bacterianas, maximizando a ligação específica da lisina recombinante. Inversamente, quando se aumenta a concentração de imidazol, até um máximo de 500mM, este vai competir pela ligação aos iões de níquel da coluna, promovendo a eluição das lisinas. Seguidamente foi necessário eliminar o imidazol utilizando-se um processo semelhante ao da cromatografia por exclusão molecular, denominado de *desalting* (protocolo 2.5.3). Este processo permitiu paralelamente transferir as enzimas para um tampão fisiológico à base de fosfato. Destes procedimentos obtiveram-se os respectivos cromatogramas, com indicação da absorvência a 280nm em função do volume dos tampões que passaram pela coluna de afinidade e *desalting*.

Inicialmente purificou-se a lisina Lys166, usando-se extractos solúveis derivados de 200 e 800ml de cultura bacteriana SF166, mas a quantidade de lisina e grau de pureza obtidos foram bastante reduzidos (dados não apresentados). Como nos testes preliminares Lys161 demonstrou

características de solubilidade e actividade lítica semelhantes a Lys166, tentou-se a purificação desta. Assim, utilizaram-se dois extractos solúveis obtidos a partir de 400ml de cultura bacteriana SF161 que foram injectados sequencialmente na coluna de afinidade. No cromatograma desta purificação (Fig. 3.7A) os dois primeiros picos (azul) correspondem às proteínas bacterianas não imobilizadas na coluna, que se designou de *flowthrough*. Após a lavagem da coluna com o tampão de lise (tampão B) aumentou-se a concentração de imidazol (curva verde) para os 50mM, tendo-se verificado apenas um ligeiro aumento da absorvência, indicativo da saída de algumas proteínas ligadas inespecificamente à coluna. Após a adição de 100% de tampão C (500mM de imidazol) verifica-se um pico da absorvência, indicativo da eluição completa de Lys161, dividida pelas fracções 6 e 7. Seguidamente, passaram-se as fracções 6 e 7 pela coluna de *desalting*, registando-se três picos de absorvência (Fig. 3.7B). A figura 3.7C correspondente à avaliação por SDS-PAGE de Lys161 nas diferentes fracções obtidas no processo purificação, obtendo-se uma banda ténue na zona dos 18-19KDa, o tamanho esperada para esta lisina (18,9KDa). Verificou-se igualmente a presença de outras proteínas no eluído resultante da purificação e *desalting*, indicativo de um baixo grau de pureza das amostras. As fracções 1 e 2 recolhidas no tampão D após *desalting* foram concentradas 5x, ficando a proteína total a uma concentração de 1.32µg/µl.

Apesar de se verificar um aumento da absorvência após a eluição das fracções 9 e 10 da coluna de afinidade (Fig. 3.7A) e das fracções 5 e 6 da coluna de *desalting* (Fig. 3.7B) verificou-se que estas não continham a lisina de interesse, Lys161 (dado não apresentado).

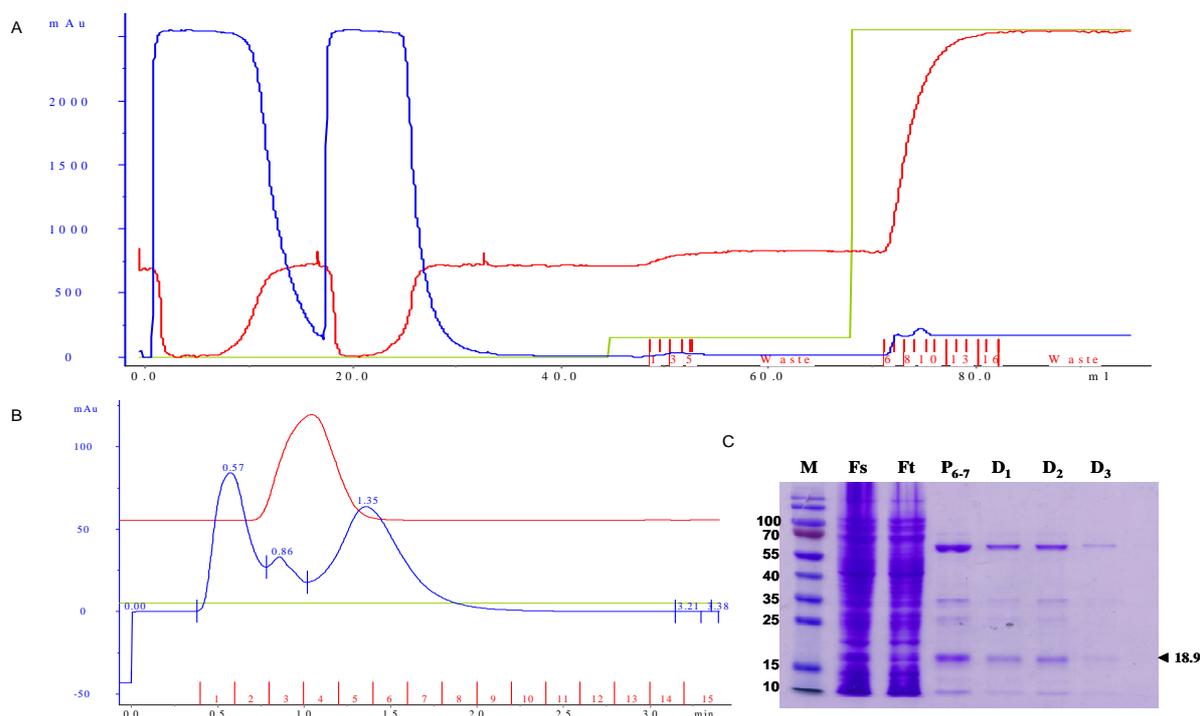


Figura 3.7 Purificação de Lys161. (A) Cromatograma da purificação em cromatografia de afinidade (níquel). (B) Cromatograma da etapa de *desalting*. As curvas a azul representam as alterações da absorvência a 280nm, a verde alterações na concentração de imidazol e a vermelho a condutividade. Os números no cimo do eixo das abcissas indicam as fracções de 1ml recolhidas após aumentos da absorvência (C) Análise por SDS-PAGE das fracções recolhidas em ambos os procedimentos. M, marcador de peso molecular; F_s, fracção solúvel; F_t, *Flowthrough*; P₆₋₇, *pool* das fracções 6 e 7 obtidas após a purificação pela coluna de afinidade; D₁₋₃, fracções 1, 2 e 3 recolhidas após *desalting*.

As lisinas quiméricas Lys168-87 e Lys170-87 foram purificadas a partir de extractos solúveis, derivados de 200ml das respectivas culturas bacterianas, SF168-87 e SF170-87.

O cromatograma representativo da purificação de Lys168-87 (Fig. 3.8A) apresenta um primeiro pico (curva azul) indicativo do *flowthrough* que saiu após passagem do extracto solúvel bacteriano. Após a adição do tampão B e de 6% de tampão C (Concentração final de imidazol: 50mM) há apenas um ligeiro aumento da absorvência e à semelhança do que ocorreu com a Lys161, quando se aumentou a concentração do imidazol para 500mM ocorreu a eluição da lisina recombinante. Contudo neste caso obteve-se um pico de absorvência bem definido com um valor próximo ao obtido para o *flowthrough*, indicando um rendimento superior na purificação de Lys168-87. Combinaram-se as três fracções representadas com os números 12, 13 e 14 e procedeu-se à troca de tampão da lisina e eliminação do imidazol, após passagem na coluna de *desalting* (Fig. 3.8B). Ao contrário do que se verifica na figura 3.7B, apenas se observa um único pico. A análise por SDS-PAGE (Fig. 3.8C) revelou uma elevada quantidade de proteína na região dos 30-31KDa, que é compatível com o peso molecular estimado de Lys168-87 (30,4KDa) e um elevado grau de pureza das amostras. Das fracções 1, 2 e 3 recolhidas no tampão D após *desalting*, quantificou-se apenas a proteína total presente nas fracções 1 e 2, tendo-se obtido respectivamente, uma concentração de 7,93 μ g/ μ l e 1,01 μ g/ μ l.

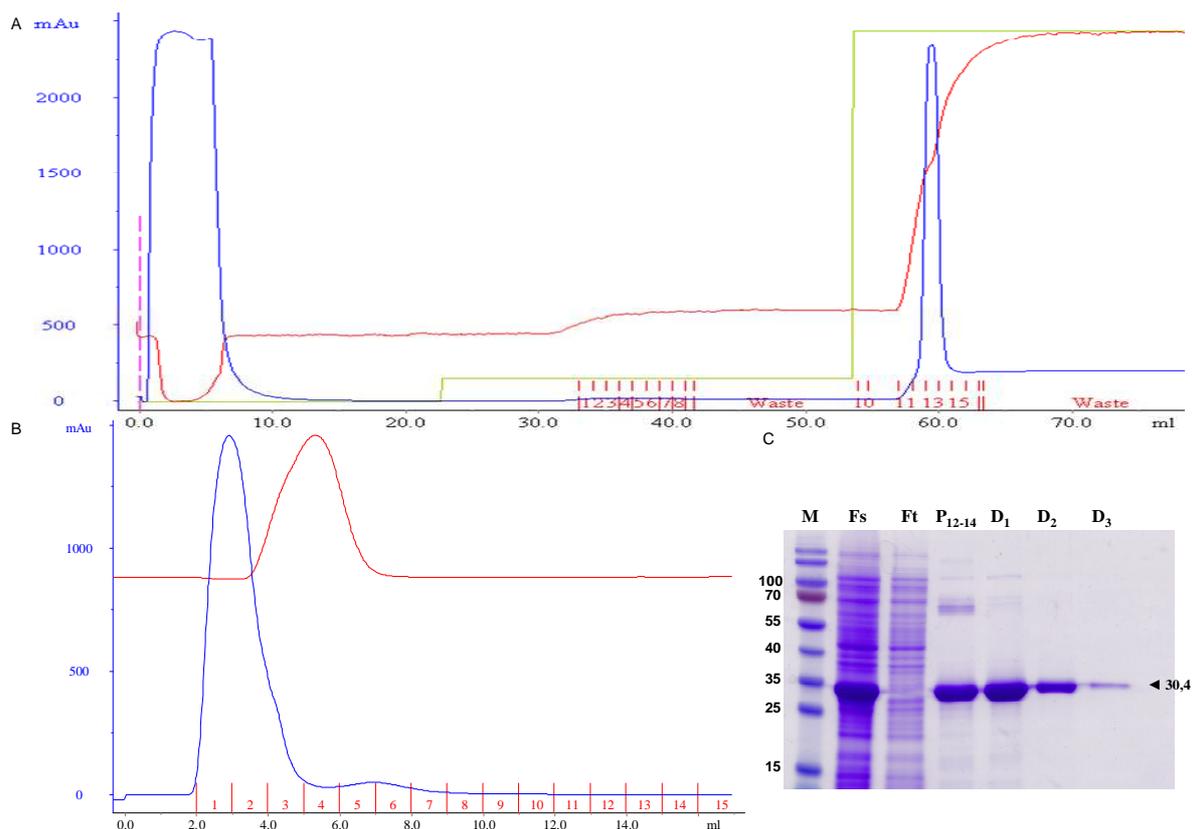


Figura 3.8 Purificação de Lys168-87. (A) Cromatograma da purificação em cromatografia de afinidade (níquel). (B) Cromatograma da etapa de *desalting*. As curvas a azul representam as alterações da absorvência a 280nm, a verde alterações na concentração de imidazol e a vermelho a condutividade. Os números no cimo do eixo das abcissas indicam as fracções de 1ml recolhidas após aumentos da absorvência (C) Análise por SDS-PAGE das fracções recolhidas em ambos os procedimentos. M, marcador de peso molecular; F_s, fracção solúvel; F_t, *Flowthrough*; P₁₂₋₁₄, *pool* das fracções 12, 13 e 14 obtidas após purificação na coluna de afinidade e que foi depois passado na coluna de *desalting*; D₁₋₃, fracções 1, 2 e 3 recolhidas após *desalting*.

Os cromatogramas de purificação de Lys170-87 foram bastantes semelhantes aos obtidos para Lys168-87 tendo-se obtido na forma solúvel uma grande quantidade de proteína e com elevado grau de pureza (Fig. 3.9). As fracções 14, 15 e 16, recolhidas após o aumento da absorvência e que compõem o pico de afinidade (Fig. 3.9A) foram combinadas e passadas pela coluna de *desalting*, obtendo-se as fracções D₁ a D₃ (Fig. 3.9B). Quantificou-se a proteína presente nas fracções 1, 2 e 3 no tampão D, obtendo-se respectivamente uma concentração de 4,12µg/µl, 5,11µg/µl e 1,13µg/µl.

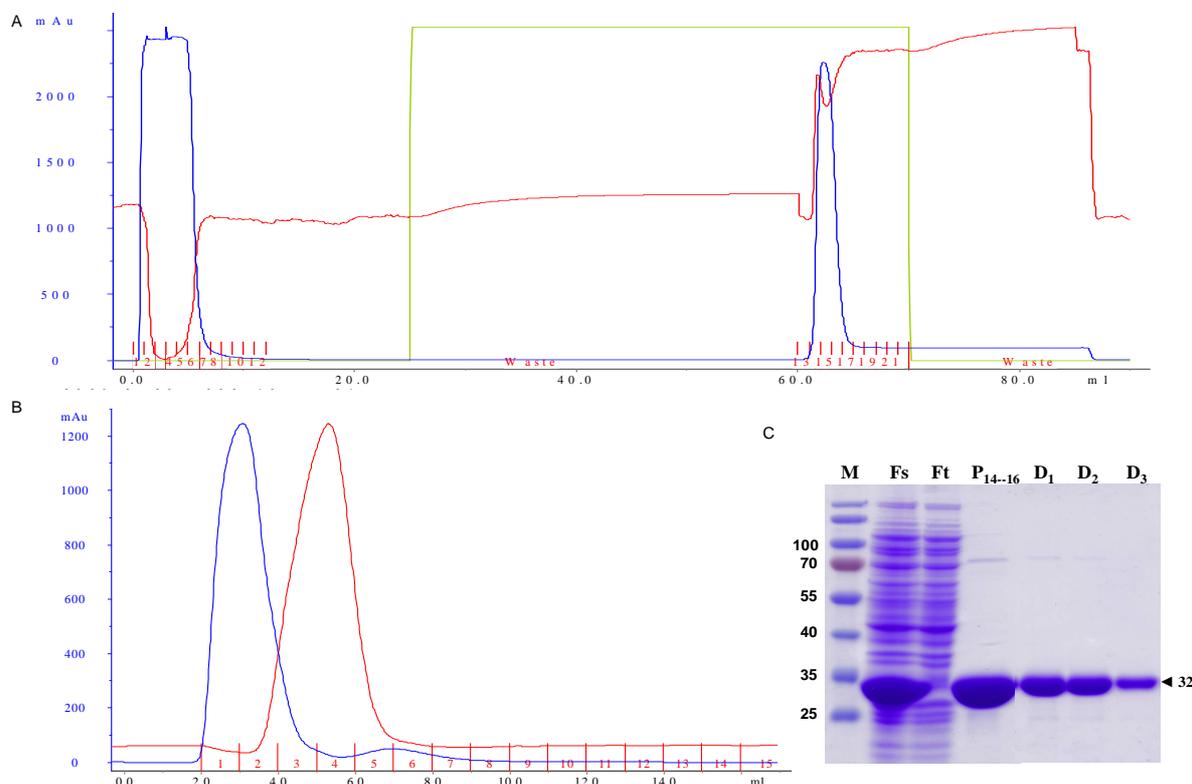


Figura 3.9 Purificação de Lys170-87. (A) Cromatograma da purificação em cromatografia de afinidade (níquel). (B) Cromatograma da etapa de *desalting*. As curvas a azul representam as alterações da absorvência a 280nm, a verde alterações na concentração de imidazol e a vermelho a condutividade. Os números no cimo do eixo das abcissas indicam as fracções de 1ml recolhidas após aumentos da absorvência (C) Análise por SDS-PAGE das fracções recolhidas em ambos os procedimentos. M, marcador de peso molecular; F_s, fracção solúvel; F_t, *Flowthrough*; P₁₄₋₁₆, *pool* das fracções 14, 15 e 16 obtidas após purificação na coluna de afinidade e que foi depois passado na coluna de *desalting*; D₁₋₃, fracções 1, 2 e 3 recolhidas após *desalting*.

3.4. Estudo da actividade lítica das lisinas recombinantes em células viáveis

3.4.1. Ensaio em meio sólido

A actividade lítica das lisinas purificadas, Lys168-87 e Lys170-87, foi determinada em 122 estirpes bacterianas distribuídas por 10 espécies de bactérias Gram positivas e uma espécie Gram negativa. Diferentes quantidades de lisina, 10µg, 5µg, 1µg e 0.2µg foram aplicadas sobre camadas homogéneas de bactérias viáveis, as quais foram obtidas por incorporação de suspensões celulares densas num tampão semi-sólido (protocolo 2.7.1.2). Como se obteve pouca quantidade de Lys161 purificada (Fig. 3.7) aplicou-se 2,5µg e 1µg de enzima em apenas 48 destas estirpes.

Trabalhos prévios demonstraram que Lys87 tinha a capacidade de lisar um espectro alargado de bactérias Gram positivas, que à excepção de *S. pyogenes*, incluía todas as espécies testadas neste trabalho. Contrariamente, as lisinas parentais Lys168 e Lys170 dos fagos de *Enterococcus sp.* só apresentaram actividade lítica contra bactérias do género *Enterococcus*. (D. Proença, não publicado). Neste ensaio observou-se que as lisinas quiméricas Lys168-87 e Lys170-87, apesar de possuírem apenas o DLPC de Lys87, conseguiram lisar mais de 90% das estirpes de *S. aureus* testadas (Tabela 3.2) e diferentes estirpes das espécies de bactérias Gram-positivas testadas, incluindo *S. pyogenes* (Tabela 3.1), independentemente da sua origem clínica (exsudado cutâneo, sangue ou urina), ano de isolamento (2005-2009) ou resistência a antibióticos (Tabela 2.2). Lys161 comparativamente a Lys87 registou um decréscimo do espectro lítico, não apresentando actividade lítica contra *S. saprophyticus* e *M. luteus* (Tabela 3.2). Tal como seria de esperar nenhuma das lisinas purificadas produziu halos de lise em *E. coli*.

Nas 40 estirpes de *S. aureus* com resistência à metilina (MRSA) (F. Silva, não publicado) que foram testadas, apenas uma apresentou resistência à acção lítica de Lys168-87 e duas para Lys170-87, sendo uma destas resistente a ambas as lisinas. Curiosamente, de 10 estirpes que foram resistentes à infecção pelo fago F87 (F. Silva, não publicado) apenas a 455/05 é que não foi lisada por nenhuma das lisinas quiméricas.

Tabela 3.1 Actividade lítica relativa das lisinas Lys168-87 e Lys170-87, em 122 estirpes bacterianas

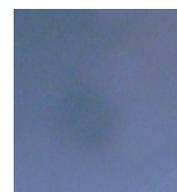
ID da Estirpe	Espécie bacteriana	Actividade lítica ^{a)}							
		Lys168-87				Lys170-87			
	Quantidade de lisina(µg)	10	5	1	0.2	10	5	1	0.2
919/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	++	+	+	+/-
964/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+	+	+++	++	+	+/-
1011/05*	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+	+/-	++	+	+	+/-
1013/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	+	+	+/-	+/-
1018/05*	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	+	+++	++	++	+
1133/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	-	-	+	+/-	-	-
1152/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	-	-	++	+	-	-
1154/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	-	-	+	+/-	-	-
1275/05*	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+	+	-	++	+	-	-
1319/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+/-	-	-	+/-	-	-	-
1390/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	++	+	+/-	-
1463/05*	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	++	+	+/-	-	++	+	+/-	-
1538/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+	+/-	-	++	+	-	-
1623/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	-	-	+	-	-	-
1627/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	-	-	+	-	-	-
1641/05*	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	++	+	-	-	+	-	-	-
1644/05*	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-
1745/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	-	-	-	+	-	-	-
1862/05*	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+/-	-	++	+/-	-	-
1872/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+/-	-	-	-	-	-
1976/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	-	-	+/-	-	-	-
2121/05	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	-	-	-	-	+/-	-	-	-
124/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+	-	+	+	+/-	-
351/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	-	+	+/-	-	-
399/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+/-	+/-	+	+/-	-	-
400/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
623/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	-	-	-	+/-	-	-	-
644/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	+	+/-	+	+	+/-	+/-
746/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	++	+/-	+	+/-	-	-
748/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	+	+/-	-	+	+	-	-
815/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	+	+/-	++	+	+	+
920/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	+	+	+/-	-
1035/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	+	++	++	+	+



1037/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+	+	+++	++	+	+/-
1038/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
1039/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	++	+	++	+	+/-	-
1076/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	++	++	++	+	+/-
1077/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	++	+	+	+	+/-	-
1102/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+	+/-	++	+	+/-	-
1149/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	+	++	+	+/-	-
1156/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	+	+/-	-	-
1157/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	+++	+/-	++	++	++	+/-
1159/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	+	+	+	+/-	+/-
1201/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	++	+/-	+	+	+/-	-
1203/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+/-	+	+/-	-	-
1204/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	++	++	+/-	-	-	-	-	-
1209/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	-	+	+/-	-	-
84/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	+	++	++	+	+/-
161/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	+	+	+	+/-	-
86/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
163/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+	+	+	+	-	-
166/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	+	+/-	-	+	+	-	-
196/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	+	+	+	+
214/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
224/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
400/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	+	+	+	+/-	-
463/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	+	+	+/-	-
464/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	-	+	+	+/-	-
545/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	++	+	+	+
547/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+/-	++	++	+	-
565/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+/-	-	+	+/-	-	-
566/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+++	+	+++	++	+	+/-
567/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	+	+	+	+/-
662/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	+/-	+	+/-	+/-	-
171/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
223/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	+/-	+/-	-	-	-
546/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	+	+	+	+/-
578/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	-	+	+	+	-
586/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	+++	++	++	+
594/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
663/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	-	++	++	+	-
322/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-
325/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+/-	++	++	+	+/-
743/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	+	+	+	+/-
162/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	+	+	+	+	+
465/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+	-	++	++	+	-
466/07	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	++	+	+	-
590/07	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	+/-	++	++	+	+/-
53/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+/-	++	++	+	+
55/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+/-	+	+	+/-	+/-
56/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
97/08	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	++	-	++	+	+	+/-
129/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
130/08	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+/-	-	+	+	+	+/-
1020/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+	+++	++	+	+
941/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	+/-	-	+/-	-	-	-
965/05	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	++	+	-	+/-	-	-	-
1094/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	++	++	++	+	-
2013/05*	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+	+/-	-	+	-	-	-
793/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	+/-	+/-	-	-	-
862/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	-	-	-	-	-	-	-	-
455/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
755/05*	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+	++	+	+/-	-
1389/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	-	++	-	-	-
1649/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	++	+	+/-	-
2030/05	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	++	+	-	-	+/-	-	-	-
2144/05	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
541/06	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	++	+/-	+/-	-	-	-
1007/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	++	+	+/-	-	+	+/-	-	-
1211/06	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+++	+++	+++	++	+	+	+	+/-
1736/05*	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	+	-	-	+	+/-	-	-
107/08*	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+++	++	+	+/-	-	-	-	-
114/08*	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	++	+	-	+/-	-	-	-
546/06*	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+++	++	+	+/-	++	++	+/-	-
158/08*	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+++	+++	++	+	+	+	-	-



(+)



(+/-)

1930/05*	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	++	++	+	+	++	+	+	+
05/06*	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+++	++	++	+	+	+	+	+/-
06/06*	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+++	++	+	+	++	++	+	+
1908/0* ⁵	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
1909/05*	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	++	++	+	+	+	++	+	-
110/08*	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	++	++	+	+	++	++	+	+
1518/05* ^{b)}	<i>Enterococcus sp.</i>	+/-	+/-	-	-	++	+	+/-	-
926/05* ^{c)}	<i>Enterococcus sp.</i>	++	++	+	+/-	+++	+++	++	+
46/06*	<i>Enterococcus faecalis</i>	++	++	+	+/-	+++	+++	++	+
188/06*	<i>Enterococcus faecium</i>	+/-	-	-	-	++	+	+/-	-
12/08*	<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+/-	-	++	++	+	-
13/08*	<i>Streptococcus pyogenes</i>	++	+	-	-	+	+/-	-	-
575/07*	<i>Micrococcus luteus</i>	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-
01/09*	<i>Bacillus licheniformes</i>	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	++
02/09*	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	++	++	+	+	+	++	+
35/08*	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
44/08*	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

^{a)} A sensibilidade de cada estirpe à acção lítica das enzimas quiméricas foi avaliada com base nas características dos halos de lise, numa escala relativa variável entre opaco/pequeno (+/-) até translúcido/grande (+++); a resistência à acção lítica é indicado com (-). As imagens da direita são representativas destas características dos halos de lise. ^{b)} Estirpe hospedeira do fago 168. ^{c)} Estirpe hospedeira do fago 170. Os números sublinhados representam as estirpes resistentes à infecção pelo fago F87. * indica as estirpes testadas com a lisina Lys161. (MRSA) *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

A lisina Lys168-87 é a que apresenta capacidade lítica superior, já que com 0.2µg foi possível observar halos de lise em 59% das 101 estirpes de *S. aureus* testadas, enquanto que Lys170-87 na mesma quantidade lisou 30% das mesmas estirpes (Tabela 3.2). O diâmetro do halo de lise para as mesmas quantidades de lisina foi também, geralmente, superior no caso de Lys168-87.

Nas outras espécies bacterianas testadas, a actividade lítica foi semelhante nas duas lisinas, produzindo halos de lise de dimensão aproximada. No entanto, na estirpe de *Enterococcus sp.* 926/05, hospedeiro do fago F170, Lys170-87 apresentou uma acção lítica superior, produzindo halos de lise maiores que a lisina Lys168-87. Curiosamente, quando se testou as lisinas Lys168 e Lys170 em diferentes estirpes de *Enterococcus sp.*, num estudo análogo ao aqui descrito, a Lys170 foi a que apresentou maior actividade enzimática (D. Proença, não publicado).

Quando se aplicou 2,5µg da lisina Lys161 observou-se lise em apenas 54% das 26 estirpes de *S. aureus* testadas, *Enterococcus spp.* e *Bacillus subtilis* (Tabela 3.2). Como a classificação desta lise não foi além de (+) omitiu-se a sua descrição na tabela 3.1.

Tabela 3.2 Comparação da actividade lítica das lisinas Lys168-87, Lys170-87 e Lys161

Espécies bacterianas (número de estirpes testadas)	Actividade lítica (%) ^{a)}									
	Lys168-87 (µg)				Lys170-87 (µg)				Lys161 (µg)	
	10	5	1	0,2	10	5	1	0,2	2,5	1
<i>S. aureus</i> (101) e (26)	96	94	85	59	94	78	44	30	54	12
<i>S. epidermidis</i> (5)	100	100	80	60	80	60	20	0	1	1
<i>S. haemolyticus</i> (3)	100	100	100	100	100	100	100	100	1	0
<i>S. saprophyticus</i> (3)	67	67	67	67	67	67	67	33	0	0
<i>Enterococcus spp.</i> (4)	100	75	50	50	100	100	100	50	4	3
<i>M. luteus</i> (1)	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
<i>Str pyogenes</i> (2)	100	100	50	0	100	100	50	0	0	0
<i>Bacillus spp.</i> (2)	100	100	100	50	100	100	100	100	1	1
<i>E. coli</i> (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Esta tabela indica a percentagem de estirpes de cada espécie bacteriana sensível à acção lítica de diferentes quantidade de Lys168-87, Lys170-87 e Lys161.

3.4.2. Ensaio em meio líquido

A actividade enzimática de Lys168-87, Lys170-87 e Lys161 foi testada em meio líquido numa cultura de *S. aureus* 566/07 em fase exponencial e ressuspensa em tampão de incorporação (Fig. 3.10A) ou em BHI (Fig. 3.10B), com $2,1 \times 10^8$ e $8,5 \times 10^7$ e ufc/ml, respectivamente. Monitorizou-se a acção enzimática durante 65min através de medições periódicas da DO_{600nm} .

Na figura 3.10A é possível verificar-se um decréscimo bastante acentuado na DO_{600nm} das culturas bacterianas ao longo do tempo, após a aplicação das lisinas quiméricas. Contudo, no ensaio realizado em BHI esta diminuição não é observada, registando-se apenas uma perturbação no crescimento das culturas, a qual é mais óbvia no caso de Lys168-87 (Fig. 3.10B). Relativamente a Lys161 não se observou actividade lítica, tendo-se obtido curvas semelhantes à do controlo negativo (Fig. 3.10), parecendo indicar ausência de lise.

Quando se calcularam as ufc/ml, no ensaio em tampão confirmou-se a elevada actividade lítica das lisinas quiméricas em *S. aureus*, tendo a viabilidade celular diminuído em mais de 95% (Fig. 3.10A). Curiosamente, a cultura celular sob o efeito de Lys161, que parecia não evidenciar acção lítica, teve uma taxa de sobrevivência de apenas 11,5%, indicando uma possível morte celular em resultado da acção desta lisina. Paralelamente monitorizou-se a perda de viabilidade celular após os 65min da aplicação das lisinas em BHI (Fig. 3.10B) e, apesar de não ser evidente como no ensaio em tampão, observou-se igualmente um decréscimo na viabilidade celular. No controlo negativo, apesar de se verificar um decréscimo da DO_{600nm} no ensaio em tampão, não se observou diminuição das ufc/ml, tendo a cultura uma taxa de sobrevivência de 100%.

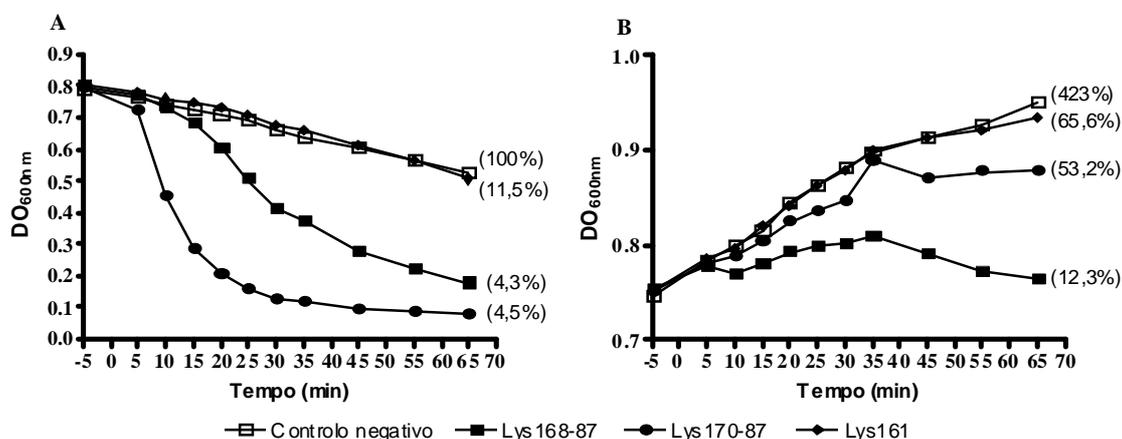


Figura 3.10 Actividade lítica das lisinas Lys168-87, Lys170-87 e Lys161 contra uma cultura de *S. aureus* 566/07. As células foram crescidas até à fase exponencial, sendo depois concentradas até uma $DO_{600nm} = 0,6 - 0,8$, em tampão de incorporação (A) ou BHI (B) líquidos. Ao tempo zero aplicou-se em separado tampão (controlo negativo) ou as lisinas purificadas a uma concentração de $10\mu\text{g/ml}$ (Lys168-87 e Lys170-87) ou $5\mu\text{g/ml}$ (Lys161). Entre parênteses encontra-se a taxa de sobrevivência da população celular após 65min da aplicação de tampão D ou lisinas.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo pretendeu-se produzir lisinas recombinantes activas contra *S. aureus* e *P. acnes*, avaliando-se a actividade bacteriolítica destas enzimas quando aplicadas exogenamente a estirpes daquelas espécies, isoladas de meios hospitalares e da comunidade, incluindo estirpes resistentes a antibióticos. A primeira parte deste trabalho consistiu essencialmente na optimização de protocolos experimentais que garantissem a expressão heteróloga em *E. coli* de lisinas solúveis, em grandes quantidades e na conformação activa. Neste trabalho a criação de lisinas quiméricas aliada a condições de expressão a baixas temperaturas revelou-se a melhor opção.

Grande parte das lisinas descritas em fagos de *S. aureus* e com actividade lítica em células viáveis, como LysK, LytA (do fago $\Phi 11$), MV-L e LysH5, partilham a mesma organização multimodular com dois domínios catalíticos: CHAP em N-terminal e amidase-2 na região central e um domínio de ligação à parede celular SH3b em C-terminal^[28, 64, 67, 69, 76]. De acordo com a análise *in silico* da sequência aminoacídica de Lys87, esta só tem um domínio catalítico CHAP, com resíduos conservados presentes em domínios conhecidos como sendo de endopeptidases^[89]. Estes resíduos estão igualmente presentes no domínio CHAP de LytA e LysK, responsáveis pela hidrólise da ligação D-Ala-Gly no peptidoglicano^[7, 64]. Nestas o domínio central com actividade de amidase, responsável pela hidrólise das ligações NAM-L-Ala, revelou não ser essencial para a lise bacteriana^[7, 28]. Quando se testaram lisinas apenas com o domínio CHAP de Lys87, *i.e.*, Lys166, Lys161 e Lys148, todas apresentaram actividade lítica contra células autoclavadas. Lys161, na forma purificada, registou igualmente actividade lítica em células de *S. aureus* viáveis, num total de 54% das estirpes testadas.

Na literatura, a necessidade do DLPC, para a actividade enzimática das lisinas fágicas, é algo controversa, existindo resultados contraditórios para a mesma lisina. Por exemplo num estudo de Horgan *et al.*, uma lisina derivada de LysK, contendo apenas o domínio CHAP, demonstrou ser mais activa contra células viáveis de *S. aureus* que a lisina nativa^[41]. Contrariamente Becker *et al.* afirmam que a actividade do domínio CHAP é maximizada pela presença do domínio SH3b. No entanto, os autores referem que esta diferença pode não ser intrínseca à lisina mas sim um efeito variável, determinado pelas condições experimentais utilizadas^[7]. Existem igualmente outros estudos que apresentam ambas as realidades, como com a lisina LytA^[28, 81], Ply118 e Ply500^[53] que precisam do SH3b na região C-terminal para terem um máximo de actividade lítica ou as lisinas B30^[27], PlyGBS^[20] e PlyL^[55] que apresentam elevada actividade apenas com o domínio CHAP, sem o SH3b em C-terminal. Relativamente à lisina Lys87, pode-se afirmar que o seu domínio catalítico sozinho, na forma da proteína Lys161, é solúvel e apresenta actividade lítica. Contudo, como não foi possível obter Lys87 na forma solúvel e realizar um ensaio em paralelo com Lys161, não foi possível determinar se a ausência do DLPC potenciou ou minimizou a actividade enzimática.

A estrutura modular das lisinas em estudo, prevista *in silico*, foi igualmente aproveitada para a produção de novas lisinas quiméricas, em que se conjugaram domínios com especificidades de ligação e actividade enzimática diferentes. Neste caso, substituiu-se o domínio catalítico de Lys87 (de *S. aureus*) e Lys15 (de *P. acnes*), pelo domínio CHAP de Lys168 ou de amidase-2 de Lys170, (de *Enterococcus* spp.).

Apesar de existirem alguns estudos sobre a produção de proteínas quiméricas activas em *S. aureus*^[6, 27, 56], esta é a primeira vez que se descrevem quimeras resultantes da fusão de domínios funcionais provenientes de lisinas de fagos de *S. aureus* e *Enterococcus* sp., que têm não só actividade lítica contra as células alvo como mantêm o espectro lítico das proteínas parentais.

Contrariamente, as lisinas quiméricas específicas para *P. acnes*, Lys168-15 e Lys170-15, apesar de possuírem a mesma sequência aminoacídica no domínio catalítico, não apresentaram actividade enzimática contra *P. acnes* ou *Enterococcus* sp. autoclavados (dados não apresentados). Adicionalmente verificou-se que a lisina Lys15 (produto do fago F15 de *P. acnes*) só apresentou halos de lise em *P. acnes*, a partir de estirpes de *E. coli* produtoras desta lisina. Estes resultados combinados parecem indicar uma fraca interacção entre o DLPC de Lys15 e os ligandos à superfície da parede celular de *Enterococcus* sp. e, por outro lado, a incapacidade dos domínios catalíticos CHAP peptidase e Amidase-2, das respectivas lisinas Lys168 e Lys170, em clivarem o peptidoglicano de *P. acnes*. Contudo só será possível perceber quais os mecanismos moleculares envolvidos na especificidade lítica de Lys15, após: i) determinar a estrutura de cada domínio, por cristalografia e ii) examinar quais os aminoácidos envolvidos na ligação ao substrato e o grau de afinidade destes, como num estudo de Loeffler *et al.*, em que produziram diferentes polipéptidos a partir da região C-terminal das lisinas Ply118 e Ply500 (de *L. monocytogenes*) e fundiram estes à GFP (*green fluorescent protein*)^[53]. A ausência de lise nas quimeras poderá ser devido à substituição do aminoácido glicina (Gly) pelo ácido glutâmico (Glu) no tetrapéptido do peptidoglicano de *P. acnes*^[108], impedindo assim a acção da lisina Lys168-15. Outra explicação possível é que, como os domínios são determinados bioinformaticamente, podem-se ter eliminado regiões importantes para o reconhecimento e clivagem do substrato. Há igualmente a possibilidade, de que a pequena fracção de proteínas que se obteve na forma solúvel, não apresentarem o *fold* correcto e, conseqüentemente, serem inactivas. Após estes resultados não se procedeu à purificação das lisinas específicas para *P. acnes*.

A formação de corpos de inclusão insolúveis e inactivos é um problema bastante comum na expressão de proteínas em *E. coli*, tal como já havia sido observado para a lisina Lys87^[17]. Muitas das estratégias utilizadas na resolução desta situação (desnaturação e renaturação dos corpos de inclusão, co-expressão de chaperons moleculares), revelam-se frequentemente pouco eficientes, dispendiosas e/ou demoradas. Neste trabalho, também as lisinas produzidas Lys166, Lys161, Lys148, Lys168-87, Lys170-87, Lys15, Lys168-15 e Lys170-15, quando expressas nas condições *standard* (37°C, durante 3hrs) apresentaram elevada insolubilidade, sendo este problema resolvido pelo decréscimo da temperatura e prolongamento da expressão proteica. Os resultados obtidos indicam que a expressão de proteínas nas condições sub-óptimas é uma alternativa eficaz e, pela sua simplicidade deve ser sempre tida em consideração numa primeira abordagem. No entanto, mesmo nestas condições não se obteve Lys87 em quantidades significativas e na forma solúvel, salientando-se a importância de conjugar diferentes técnicas (genéticas e bioquímicas), de modo a maximizar a quantidade de proteína solúvel, após a expressão em *E. coli*.

Os resultados preliminares obtidos para as lisinas Lys168-87, Lys170-87 e Lys161, revelaram-se bastante promissores, constituindo o ponto de partida para o estudo do potencial terapêutico destas. Estas lisinas foram purificadas por cromatografia de afinidade- FPLC, através de uma coluna com afinidade para o péptido de 6 histidinas presente na região C-terminal de cada lisina. Esta estratégia revelou ser bastante eficaz, garantindo a obtenção de grandes quantidades de lisinas quiméricas, com elevado grau de pureza. Devido ao baixo peso molecular e reduzida carga, a cauda de histidinas não tem normalmente efeitos na actividade da proteína^[1], aumentando nalguns casos a solubilidade da mesma^[19, 62]. A purificação de Lys161 apresentou no entanto, um rendimento e grau de pureza bastante baixos. Neste caso, através de mecanismos de mutagénese dirigida poder-se-ia eventualmente determinar experimentalmente quais os aminoácidos envolvidos na destabilização da proteína, para produzir uma lisina mais solúvel.

Antes de se determinar o espectro lítico de cada lisina, fizeram-se alguns testes com tampões (dados não apresentados). Verificou-se que o tampão à base de fosfatos foi o que garantiu o máximo de actividade lítica nas células alvo sem causar danos nestas *per si*. O glicerol foi utilizado como agente de crio-preservação, a uma concentração de 25%, permitindo o armazenamento das amostras proteicas a -20°C durante longos períodos de tempo, sem haver formação de agregados proteicos ou interferência com a actividade enzimática.

Para alcançar o objectivo inicialmente proposto as lisinas purificadas foram testadas contra um elevado número de estirpes de *S. aureus* (101 com as lisinas Lys168-87 e Lys170-87 e 26 com Lys161), bem como outras espécies de bactérias Gram-positivas de interesse clínico.

Neste estudo, as lisinas quiméricas apresentaram um efeito lítico bastante substancial, observando-se actividade lítica em mais de 90% das estirpes de *S. aureus* testadas, independentemente da sua origem clínica (exsudado cutâneo, sangue ou urina), ano de isolamento (2005-2009). Adicionalmente, verificou-se actividade enzimática em mais de 95% das estirpes com resistência à meticilina.

Normalmente, o espectro lítico das lisinas descritas é limitado à espécie ou estirpe, devido aos ligandos associados ao peptidoglicano que servem como alvos de ligação das lisinas, frequentemente hidratos de carbono, que estão frequentemente distribuídos de acordo com o tipo de estirpe ou espécie^[35]. Neste estudo, no entanto, as lisinas quiméricas foram capazes de lisar outras estirpes de *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*), *Enterococcus* spp., *S. pyogenes*, *M. luteus* e *Bacillus* spp. Este espectro lítico sugere o reconhecimento de um epítipo comum, na superfície da parede celular destas diferentes espécies bacteriana. A comparação da intensidade lítica das 3 lisinas purificadas revelou que Lys168-87 foi a mais activa contra um maior número de estirpes, produzindo os halos de lise de maiores dimensões, seguido pela Lys170-87. É interessante verificar que num estudo análogo a lisina intacta Lys170 apresenta uma actividade lítica superior à de Lys168 contra *Enterococcus* sp. (D. Proença, não publicado). Estes resultados indicam que a combinação de domínios funcionais com vista a obter lisinas com propriedades activas diferentes, parece ser a melhor estratégia para alargar o espectro de acção de enzimas destes tipo e aumentar a solubilidade das mesmas, não garantindo no entanto a manutenção da especificidade da actividade enzimática. Possivelmente neste processo são eliminados alguns aminoácidos na região

C-terminal de Lys170, que estão envolvidos na ligação de alta afinidade das proteínas à superfície bacteriana.

A lisina Lys161 foi a que apresentou um espectro de acção mais estreito e halos de lise de dimensão inferior. Contudo como se estudou uma quantidade inferior (2,5µg) comparativamente à das lisinas quiméricas (10µg), este efeito pode ser uma consequência da baixa quantidade de lisina aplicada e não uma dependência do DLPC de Lys87 para um máximo de actividade lítica. Outra explicação poderá ser a existência de diferentes aminoácidos nas pontes peptídicas do peptidoglicano, entre as diferentes estirpes de *S. aureus*^[25].

As lisinas purificadas também foram testadas em estirpes de *E. coli*, não apresentando actividade lítica, o que seria de esperar devido à existência de uma membrana celular externa, a rodear a parede celular, protegendo estas bactérias da acção das lisinas quando adicionadas, externamente^[92].

No ensaio líquido, como se utilizou apenas uma estirpe, os resultados obtidos podem não ser extensíveis à generalidade das estirpes testadas em meio sólido. No entanto, não deixa de ser importante a observação de um decréscimo em mais de 95% na taxa de sobrevivência celular após a aplicação das lisinas quiméricas. No ensaio em BHI estes efeitos na viabilidade celular não foram tão acentuados, mas este meio pode conter na sua composição compostos que inibem a actividade lítica ou garantir um ambiente menos stressante para as bactérias. As lisinas estão naturalmente desenhadas para actuarem a partir do citoplasma, após a dissipação do potencial de membrana pela acção da holina^[80]. Como em BHI as células se encontram num meio nutritivo, contrariamente ao que acontece em tampão poderá acontecer que as células e, particularmente, a parede celular de *S. aureus* estejam em melhores condições para resistirem à acção das lisinas. As observações em meio líquido mostraram igualmente que Lys161 não tem uma actividade lítica significativa, no entanto, o decréscimo observado na viabilidade celular, leva a crer que esta tem o potencial de induzir danos na parede celular, tornando-a possivelmente mais permeável. Deste modo seria interessante testar o seu efeito sinérgico com um antibiótico, como realizado por Manoharadas *et al.*, em que aplicaram a lisina P16-17 específica para *S. aureus* juntamente com um aminoglicosídeo, observando um decréscimo na viabilidade celular devido à acção conjunta dos dois agentes^[56]. Outra estratégia possível para maximizar a actividade lítica seria aplicar as lisinas quiméricas em simultâneo.

Tendo em consideração a importância de *S. aureus* a nível hospitalar, pela sua capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres, seria importante testar a eficácia destas lisinas em biofilmes^[81].

Como as lisinas purificadas demonstraram elevado potencial antibacteriano, seria importante realizar testes *in vivo*, testando -se por exemplo o efeito terapêutico das lisinas em ratinhos infectados com as espécies patogénicas alvo.

5. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho experimental garantiu a produção de três lisinas fágicas, Lys168-87, Lys170-87 e Lys161, activas contra *S. aureus*, solúveis, com um bom grau de pureza e na conformação activa. O sucesso deste trabalho dependeu da utilização de um conjunto de diferentes técnicas bioinformáticas, de biologia molecular (com deleção e combinação de domínios funcionais), da optimização da expressão e purificação das lisinas e, finalizando, de um teste de avaliação da actividade antibacteriana em 120 estirpes de bactérias Gram-positivas, isoladas de meios hospitalares e da comunidade, incluindo estirpes resistentes a antibióticos.

Purificaram-se pela primeira vez lisinas compostas por domínios funcionais de lisinas de fagos de *S. aureus* e *Enterococcus* sp., activas contra um largo espectro de espécies bacterianas. Especificamente, a lisina Lys168-87 e Lys170-87 apresentaram, respectivamente, actividade lítica em 96% e 94% das estirpes de *S. aureus* testadas e em estirpes de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus* spp., *S. pyogenes*, *M. luteus* e *Bacillus* spp.

A combinação de domínios funcionais diferentes, com o intuito de produzir lisinas quiméricas, parece constituir uma boa estratégia na obtenção de espectros de lise mais alargados. Contudo revelou-se ineficaz em lisinas específicas para *P. acnes*.

A deleção da região C-terminal de uma lisina altamente insolúvel (Lys87), demonstrou ser eficaz na melhoria da solubilidade da proteína, mas não houve manutenção do espectro lítico, apresentado pela lisina parental. A lisina Lys161 foi activa em 54% das estirpes de *S. aureus* testadas e em *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus* spp., e *Bacillus* spp., demonstrando igualmente capacidade para inibir o crescimento celular.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a eficiência das lisinas na eliminação de bactérias patogénicas *in vitro*, comprovando a sua acção potencial como agentes antibacterianos e sugerindo um futuro promissor para o desenvolvimento de uma terapia eficaz no combate à emergência de estirpes de *S. aureus* resistentes a antibióticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcantara, E.H., Kim, D.H., Do, A., Lee, S. (2007). Bi-functional activities of chimeric lysozymes constructed by domain swapping between bacteriophage T7 and K11 lysozymes. *J Biochem. Mol. Biol.* 31;40(4):539-46.
2. Aldove, A.M., Stein, J.D., Deramo, V.A., Sah, G.K., Fischer, D.H & Maguire, J.I. (1999). Treatment strategies for postoperative *Propionibacterium acnes* endophthalmitis. *Ophthalmology* 106, 2395-2401
3. Anh, C., Ko, C.Y., Wager, E., A., Wang, R.S. & Schey, W.W. (1996). Microbial evaluation: 139 implants removed from symptomatic patients. *Plast Reconstr Surg* 98, 1225-1229.
4. Appelbaum, P. C. (2006). The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:16-23.
5. Barrett CT, Barrett JF. (2003). Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:621–626.
6. Becker, S., Foster-Fray, J., Stodola, A., Anacker, D., Donovan, D. (2009). Differentially conserved staphylococcal SH3b_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain. *Gene* 443:32-41.
7. Becker, S.C., Dong, S., Baker, J.R., Foster-Frey, J., Pritchard, D. G., Donovan, D.M. (2009). LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. *FEMS Microbiol Lett* 294:52–60
8. Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G., & Haldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340: 467–468.
9. Bernhardt T, Wang I, Struck D, Young R. (2002). Breaking free: “Protein antibiotics” and phage lysis. *Research in Microbiology* 153: 493-501.
10. Birnboim, H.C., & Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
11. Blot, S. I., Vandewoude, K. H., Hoste, E. A., Colardyn, F. A. 2002. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch. Intern. Med.* 162:2229- 2235.
12. Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4:144–154.
13. Bojar, R.A., Holland, K.T. (2004). Acne and *Propionibacterium acnes*. *Clinics in dermat.* 375-379.
14. Borysowski, J., Beataweber-da, B., Andrzej, G. (2006). Bacteriophage Endolysins as a Novel Class of Antibacterial Agents. *Society for Experimental Biology and Medicine* 231:366–377.
15. Brook, I. & Fraizer, E. H. (1991). Infection caused by *Propionibacterium* species. *Rev Infect Dis.* 13, 819-822.
16. Campbell, A., Campillo-Campbell, A.D. (1963). Mutant of bacteriophage lambda producing a thermolabile endolysin, *J. Bacteriol.* 85 1202–1207.
17. Cantante, Cátia Sofia De Carvalho. (2008). Isolamento e caracterização de uma lisina de um bacteriófago que infecta *Staphylococcus aureus*. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

18. Casey, A. L., Lambert, P. A., Elliot, T. S. J. (2007). Staphylococci. Inter. J. Antimicrob. Agents. 29:23-32.
19. Chen, H., Xu, Z., Xu, N., Cen, P. 2005. Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. J. Biotechnol. 115:307-315.
20. Cheng, Q., and V.A. Fischetti. (2007). Mutagenesis of a bacteriophage lytic enzyme PlyGBS significantly increases its antibacterial activity against group B streptococci. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:1284–1291.
21. Chi, C., Wang, S.M., Lin, H.C., Liu, C.C. (2006). A clinical and microbiological comparison of *Staphylococcus aureus* toxic shock and scalded skin syndromes in children. Clin Infect Dis. 15;42(2):181-5.
22. Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R.H (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Biochemistry 86:2172-2175.
23. Cooper AJ (1998). Systematic review of *Propionibacterium acnes* resistance to systemic antibiotics. Med J Aust 169: 259–261.
24. Croux C, Ronda C, Lopez R, Garcia JL. (1993). Interchange of functional domains switches enzyme specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. Mol Microbiol 9:1019–1025.
25. De Jorge, B. L., Sidow, T., Chang, Y. S., Labischinski, H., Berger-Bachi, B., Gage, D. A., Tomasz, A. (1993). Altered muropeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated femA locus. J. Bacteriol. 9, 2779-2782.
26. Djurkovic, S., Loeffler, J.M., 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. Antimicrob. Agents Chemother. 49:1225–1228.
27. Donovan D.M., Foster-Frey, J., Dong S., Rousseau G.M., Moineau S & Pritchard D.G. (2006). The cell lysis activity of the *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30 endolysin relies on the cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase domain. Appl Environ Microbiol 72: 5108–5112.
28. Donovan, D.M., Lardeo, M., Foster-Frey, J. (2006). Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. FEMS Microbiol. Lett.265:133–139.
29. During K, Porsch P, Fladung M, Lorz H. (1993). Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. Plant J3:587–598.
30. During K, Porsch P, Mahn A, Brinkmann O, Gieffers W. (1999). The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. FEBS Lett 449:93–100.
31. Eady, E. A., & Ingham E. (1994). *Propionibacterium acnes*- friend or foe? Rev Med Mic 5:163-173.
32. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. (1997) Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. J Infect Dis 1440–1445.
33. Fischetti, V.A. (2003). Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. Ann N Y Acad Sci 987:207–214.
34. Fischetti, V.A. (2004). The use of phage lytic enzymes to control bacterial infections. In: Kutter E, Sulakvelidze A, Ed. Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton: CRC Press, 321–334.

35. Fischetti, V.A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology* 11:393-400.
36. Gaeng, S., S. Scherer, H. Neve, and M. J. Loessner. (2000). Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2951–2958.
37. Garcia, P., Garcia, J.L., Garcia, E., Sanchez-Puelles, J.M., Lopez, R. (1990) Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene* 86:81-88.
38. Guttman, B., Raya, R., Kutter, E. (2005). Basic phage biology. *In* Kutter, E., Sulakvelidze, A. (ed.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. 5th ed. CRC Press.
39. Hermoso, J., Garcia, J., Garcia, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 10:461–472.
40. Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9:486-493.
41. Horgan, M., O'Flynn, G., Garry, J., Cooney, J., Coffey, A., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., McAuliffe, O. (2009). Phage lysin, LysK, can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Appl Environ Microbiol* 75: 872–874.
42. Jado, I. (2003). Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* 52:967–973.
43. Kamisango, K., Saiki, I., Tanio, Y., Okumura, H., Araki, Y., Sekikawa, I., Azuma, I, Yamamura, Y. (1982). Structures and Biological activities of peptidoglycans of *Listeria monocytogenes* and *Propionibacterium acnes*. *J. Biochem.* 92, 23-33.
44. Kim, W.S., Salm, H., Geider, K. (2004). Expression of bacteriophage øEa1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 150:2707–2714.
45. Kutter, E., Raya, R., Carlson, K. 2005. Molecular mechanisms of phage infection. *In* Kutter, E., Sulakvelidze, A. (ed.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. 5th ed. CRC Press.
46. Labischinski, H., Maidhof, H. 1994. Bacterial peptidoglycan: overview and evolving concepts. *In* Ghuyssen, J.-M., Hakenbeek, R. (ed.). *Bacterial cell wall*. Elsevier Science BV.
47. Le Gaff, A., Bunetel, L., Mouton, C. & Bonnaure-Mallet, M., (1997). Evaluation of root canal bacteria and other antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microb Imm* 12, 318-322.
48. Leiberman, A, Dagan R, Leibovitz E, Yagupsky P, Fliss DM. (1999). The bacteriology of the nasopharynx in childhood. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 49: S151–S153.
49. Lenski, R.E. (1988). Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage. *Adv Microb. Ecol.* 10:1–44.
50. Loeffler, J.M., Djurkovic, S., Fischetti V.A. (2003). Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 71:6199–6204.
51. Loeffler, J.M., Fischetti V.A. (2003). Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 47:375–377.
52. Loessner, M.J. (2005). Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* 8:480-487.

53. Loessner, M.J., Kramer, K., Ebel, F., Scherer, S., (2002). C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol* 44:335–349.
54. Lood, R., Mörgelin, M., Holmberg, A., Rasmussen M., Collin, M., (2008). Inducible Siphoviruses in superficial and deep tissue isolates of *Propionibacterium acne*. *BMC Microbiology*, 8:139.
55. Low, L.Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A., Liddington, R.C. (2005). Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *J Biol Chem* 280:35433–35439.
56. Manoharadas, S., Witte, A., Blasi, U. (2008). Antimicrobial activity of a chimeric enzibiotic towards *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biotechnology*.
57. Markert, A. Zillig, W. (1965). Studies on the lysis of *Escherichia coli* C by bacteriophage ϕ X174, *Virol.* 25 :88–97.
58. McGinley, K.J., Webster, G.F., Leyden, J.J. (1978). Regional variations of cutaneous propionibacteria. *Appl Environ Microbiol.* 35(1):62-6.
59. Morita, M., Tanji, Y., Orito, Y., Mizoguchi, K., Soejima, A., Unno, H. (2001). Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin against gram-negative bacteria. *FEBS* 500: 56–59.
60. Mylonakis, E., Calderwood, S. B. 2001. Infective endocarditis in adults. *N.Engl. J.Med.* 1318-1330.
61. Nakatsuji, T., Liu, T., Huang, C., Gall, R. L., Huang, C. (2008). Vaccination Targeting a Surface Sialidase of *P. acnes*: Implication for New Treatment of Acne Vulgaris. *PLoS ONE* 3(2): e1551.
62. Nallamsetty, S., Waugh, D. S. 2006. Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role during the folding of their fusion partners. *Protein Expr. Purif.* 45: 175-182.
63. Nau R, Eiffert H. (2002). Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitidis. *Clin Microbiol Rev* 15:95–110.
64. Navarre, W.W., Ton-That, H., Faull, K.F., Schneewind, 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.
65. Nelson, D., Loomis, L., 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 U S A* 98:4107–4112.
66. Nguyen, L., Levy, D., Ferroni, A., Gehanno, P., Berche, P. (1997). Molecular epidemiology of *Streptococcus pyogenes* in an area where acute pharyngotonsillitis is endemic. *J Clin Microbiol* 35: 2111–2114.
67. O’Flaherty, S., A. Coffey, W. Meaney, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross. (2005). The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187:7161–7164.
68. O’Grady, N. P., Alexander, M., Dellinger, E. P., Gerberding, J. L., Heard, S. O., Maki, D. G., Masur, H., McCormick, R. D., Mermel, L. A., Pearson M. L., Raad, I. I., Randolph, A., Weinstein, R. A. 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 23:759-769.

69. Obeso, J. M., B. Martinez, A. Rodriguez, and P. Garcia. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 128:212–218.
70. Ochsendorf F (2006). Systemic antibiotic therapy of acne vulgaris. *J Dtsch Derm Ges* 4:828–841.
71. Orito, Y., Morita, M., Hori, K., Unno, H., Tanji, Y. (2004). *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin can enhance permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane and induce cell lysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:105–109.
72. Patron, R. L., Climo, M. W., Goldstein, B. P., Archer, G. L. (1999). Lysostaphin treatment of experimental aortic valve endocarditis caused by a *Staphylococcus aureus* isolate with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1754-1755.
73. Payne, D., Tomasz, A. (2004). Antimicrobials. The challenge of antibiotic resistant bacterial pathogens: the medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents. *Curr Opin Microbiol* 7:435–438.
74. Perl, T., Cullen, J., Wenzel, R., Zimmerman, B., Pfaller, M., Sheppard, D., Twombly, J., French, P., Herwalt, L. (2002). Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 24:1871–1877.
75. Pritchard, D.G., Dong, S., Baker, J.R., Engler JA. (2004). The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology* 150:2079–2087.
76. Rashel, M., J. Uchiyama, T. Ujihara, Y. Uehara, S. Kuramoto, S. Sugihara, K. Yagyū, A. Muraoka, M. Sugai, K. Hiramatsu, *et al.* (2007). Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *J. Infect. Dis.* 196:1237–1247.
77. Sambrook, J., Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
78. São-José, C., Nascimento, J., Parreira, R. and Santos, M.A. (2007). Release of progeny phages from infected cells. *In Bacteriophages: Genetics and Molecular Biology*. p. 309-336. Ed. S. Macgrath and D. van Sinderen. Horizon Scientific Press and Caister Academic Press).
79. 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.
80. Sao-Jose, C., Parreira, R., Vieira, G., 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. Bacter.* 182:5823–5831.
81. Sass, P. & Bierbaum G. (2007). Lytic activity of recombinant bacteriophage f11 and f12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 73:347–352.
82. Schaffner, W., Melly, M. A., Hash, J. H., Koenig, M. G. (1967). Lysostaphin: an enzymatic approach to staphylococcal disease. I. In vitro studies. *Yale J. Biol. Med.*39:215-229.
83. Schleifer, K. H. (1986). Gram-positive cocci. *In Holt, J. G., Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. S. (ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co.
84. Schuch, R., Nelson, D., Fischetti, V.A. (2002). A bacteriolytic enzyme that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418:884–889.

85. Service, R.F. (2004). Orphan drugs of the future. *Science* 303:1798–1798.
86. Sheehan, M.M., Garcia, J.L., Lopez, R., Garcia, P. (1996). Analysis of the lysin of the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling. *FEMS Microbiol Lett* 140:23–28.
87. Summers, W. C. (1999). Felix d'Herelle and the origins of molecular biology. Yale University Press, New Haven, Conn.
88. Tabor, S., and Richardson, C. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1074–1078
89. Takác, M., Witte, A., Bläsi, U. (2005). Functional analysis of the lysis genes of *Staphylococcus aureus* phage P68 in *Escherichia coli*. *Microbiology* 151:2331-2342.
90. Trilla, A., Miro, J. M. 1995. Identifying high risk patients for *Staphylococcus aureus* infections: skin and soft tissue infections. *J. Chemother.* 7:37-43.
91. Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* ii:1241.
92. Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56:395–411.
93. Vasala A, Valkkila M, Caldentey J, Alatosava T. (1995). Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Appl Environ Microbiol* 61:4004–4011.
94. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med* 344:11–16.
95. Wang, N., Smith, D.L., Young, R. (2000). Holins: The protein clocks of bacteriophage infections, *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 799–825.
96. Webster, G. F., & Cummins, C. S., (1978). Use of Bacteriophage Typing to Distinguish *Propionibacterium acnes* Types I and II. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 84-90
97. Wenzel, R.P. (2004). The antibiotic pipeline—challenges, costs, and values. *N Engl J Med* 523–526.
98. Whitman, W.B., Coleman, D.C. & Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *P Natl Acad Sci USA* 95: 6578–6583.
99. Wurch, T., Lestienne, F., and Pauwels P.J., (1998). A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnology Techniques*, 653–657
100. Yokoi, K., Kawahigashi, N., Uchida, M., Sugahara, K., Shinohara, M., Kawasaki, K., Nakamura, S., Taketo, A., Kodaira, K. (2005). The two component cell lysis genes holW_{MY} and lysW_{MY} of the *Staphylococcus warneri* M phage ΦW_{MY}: Cloning, sequencing, expression and mutational analysis in *Escherichia coli*. *Gene* 351: 97-108.
101. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. (2004). Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* 186:4808–4812.
102. Young, R.Y., Wang, I-N., Roof, W.D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* 8:120–128.
103. Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S., Loessner, M.J. (2002). The murein hydrolase of the bacteriophage f3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl Environ Microbiol* 68:5311–5317.