



2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Análise funcional de maltocinasas e trealose sintases/maltocinasas bifuncionais

Andreia F. N. M. Lamaroso

Análise funcional de maltocinasas e trealose
sintases/maltocinasas bifuncionais

Andreia Filipa Nisa Mendes Lamaroso

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Análise funcional de maltocinases e trealose sintases/maltocinases bifuncionais

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor Nuno Miguel da Silva Empadinhas (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra)

Andreia Filipa Nisa Mendes Lamaroso

2012

Agradecimentos

Os meus agradecimentos:

Ao Doutor Nuno Empadinhas por me ter acolhido no seu grupo, pela disponibilidade para orientar este trabalho, pelo auxílio e encorajamento e pela partilha de conhecimentos importantes.

Ao Doutor Vítor Mendes por todo o tempo concedido a ensinar-me, por todos os conhecimentos importantes que me transmitiu e pelo companheirismo. Pelo constante auxílio, encorajamento e paciência, mesmo após a sua ida para Cambridge.

À Doutora Susana Alarico e à Mestre Ana Maranha pelo auxílio, pelos conhecimentos transmitidos e pelo companheirismo e espírito de entreajuda.

Ao Prof. Doutor Rui Carvalho pela disponibilidade para a identificação de um composto por ressonância magnética nuclear, ao Doutor Tiago Faria pela disponibilidade e apoio e ao Vítor Carmona pela clonagem de um dos genes utilizados neste trabalho.

À Prof. Doutora Teresa Gonçalves pelo acesso incondicional ao seu laboratório e aos membros do seu grupo pelo companheirismo.

A todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

Índice

Abreviaturas	7
Resumo	8
Abstract	10
Capítulo 1: Introdução	12
1.1 Trealose	13
1.1.1 Importância da Trealose.....	13
1.1.2 Biossíntese da Trealose	13
1.1.3 Interação entre o Metabolismo da Trealose e dos α -Glucanos.....	15
1.1.3.1 Via GlgE.....	17
1.1.3.2 Organização e Distribuição dos Genes da Via GlgE	19
1.2 Maltocinase e Trealose Sintase.....	20
Capítulo 2: Materiais e Métodos.....	25
2.1 Identificação e Análise de Sequências das Enzimas Mak e TreS ou TreS/Mak em diferentes Microrganismos	26
2.2 Estirpes de Microrganismos	26
2.3 Extração de DNA Genómico.....	27
2.4 Amplificação dos Genes <i>mak</i> e <i>treS/mak</i>	28
2.5 Clonagem dos Genes <i>mak</i> e <i>treS/mak</i>	31
2.5.1 Clonagem no Vector de Clonagem (TA <i>cloning</i>).....	31
2.5.2 Clonagem num Vector de Expressão.....	32
2.6 Estirpes, Condições de Crescimento e Expressão.....	32
2.7 Preparação de Extractos.....	33
2.8 Ensaio Enzimáticos.....	33
2.8.1 Teste da Actividade das Maks.....	33
2.8.2 Teste da Actividade das TreSs/Maks.....	34
2.9 Especificidade de Substratos	34
2.9.1 Especificidade das Maks por Substratos.....	34
2.9.2 Especificidade das TreSs/Maks por Substratos.....	35
2.10 Identificação de um composto desconhecido por Ressonância Magnética Nuclear	35
Capítulo 3: Resultados e Discussão.....	37
3.1 Identificação e Análise de Sequências das Enzimas Mak e TreS ou TreS/Mak em diferentes Microrganismos	38

3.2 Amplificação e Clonagem dos Genes <i>mak</i> e <i>treS/mak</i>	41
3.3 Maltocinasas.....	42
3.3.1 Expressão dos genes <i>mak</i>	42
3.3.2 Actividade das Maks	44
3.3.3 Especificidade de substratos das Maks	46
3.3.3.1 Mak de <i>K. radiotolerans</i>	46
3.3.3.2 Mak de <i>P. torridus</i>	49
3.3.3.3 Domínio Mak de <i>P. fluorescens</i>	51
3.3.3.4 Mak de <i>S. aurantiaca</i>	54
3.4 Trealose sintases/Maltocinasas.....	59
3.4.1 Expressão do gene <i>treS/mak</i> de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	59
3.4.2 Actividade da TreS/Mak de <i>P. fluorescens</i>	59
3.4.3 Especificidade de substratos da TreS/Mak de <i>P. fluorescens</i>	62
3.4.4 Identificação do composto desconhecido por RMN	65
Capítulo 4: Conclusões	67
Capítulo 5: Bibliografia	70
Capítulo 6: Anexos	i
6.1 Meios de Crescimento	ii
6.1.1 Meio Ancylobacter-Spirosoma.....	ii
6.1.2 Meio Corynebacterium Agar	ii
6.1.3 Meio GYM Streptomyces	iii
6.1.4 Meio Luria-Bertani (LB)	iii
6.1.5 Meio PTYG	iv
6.1.6 Meio R2A	iv
6.2 Soluções para Extração de DNA Genómico	v
6.2.1 Tampão de Lise (Reagente GES)	v
6.3 Electroforese em Gel de Agarose 1%	v
6.3.1 Tampão TAE 50x (Stock)	v
6.3.2 Gel de Agarose 1%	vi
6.4 Células Competentes.....	vi
6.4.1 Meio SOB	vi
6.4.2 Solução RF1	vii
6.4.3 Solução RF2	vii
6.4.4 Preparação de Células Competentes	vii

6.4.5 Solução de Sais 10x (Stock)	viii
6.5 Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE)	viii
6.5.1 Tampão para as Amostras (<i>SDS Reducing Buffer</i>)	viii
6.5.2 Tampão de Corrida 10x, pH 8,3.....	ix
6.5.3 Gel <i>Resolving</i> (12%)	ix
6.5.4 Gel <i>Resolving</i> (10%)	x
6.5.5 Gel <i>Stacking</i> (4%).....	x
6.5.6 Preparação do Gel de Poliacrilamida com SDS.....	xi
6.5.7 Solução de Coloração	xi
6.5.8 Solução de Descoloração	xii

Abreviaturas

APS - Persulfato de amónio (de Ammonium Persulfate)

BLAST - Ferramenta para alinhamento de sequências (de Basic Local Alignment Search Tool)

BTP - Bis-Tris Propano

G+C - Guanina+citosina

GlgA - Glicogénio sintase

GlgB - Enzima de ramificação de α -glucanos

GlgC - ADP-glucose pirofosforilase

GlgE - Maltosiltransferase

GlgP - Glicogénio fosforilase

GlgX - Enzima de remoção de ramificações de α -glucanos

Mak - Maltocinase (de maltokinase)

MGLPs - Lipopolissacáridos de Metilglucose (de Methylglucose Lipopolysaccharides)

NCBI - Centro Nacional para Informação de Biotecnologia (de National Center for Biotechnology Information)

OtsA - Trealose-6-fosfato sintase

OtsB - Trealose-6-fosfato fosfatase

PCR - Reacção de Polimerização em Cadeia (de Polymerase Chain Reaction)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

Rv3032 - α -1,4-glucosiltransferase

SDS - Dodecilsulfato de Sódio (de Sodium Dodecylsulfate)

SDS-PAGE - Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio (de Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

TLC - Cromatografia de camada fina (de Thin Layer Chromatography)

TreP - Trealose fosforilase

TreS - Trealose sintase

TreS/Mak - Trealose sintase/maltocinase (enzima bifuncional)

TreT - Trealose glicosiltransferase sintase

TreY - Maltooligosiltrealose sintase

TreZ - Maltooligosiltrealose hidrolase

Resumo

Foi recentemente descoberta em *Mycobacterium tuberculosis* uma nova via para a síntese de α -glucanos a partir de trealose, que foi validada a nível genético como um novo alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose. Nesta via intervêm várias enzimas, nomeadamente a trealose sintase (TreS) e a maltocinase (Mak).

A unidade transcripcional *treS/mak* está presente numa grande variedade de procariotas, incluindo apenas um arqueão. Em alguns microrganismos estes genes encontram-se fundidos num só, codificando uma enzima bifuncional, a trealose sintase/maltocinase (TreS/Mak). Foram construídas árvores filogenéticas com sequências de Maks, TreSs e TreS/Maks de diferentes microrganismos de modo a constatar a distribuição destas enzimas nos diferentes grupos filogenéticos. A partir de uma destas árvores, foram seleccionadas algumas enzimas Mak e TreS/Mak de microrganismos dos diferentes grupos formados para confirmação da sua função biológica.

Efectuou-se seguidamente um estudo funcional das enzimas Mak e TreS/Mak seleccionadas. As sequências de algumas Maks apresentam valores de homologia moderados entre os diferentes organismos e, até à data, nenhuma fusão TreS/Mak foi caracterizada. Os genes *mak* e *treS/mak* seleccionados foram amplificados, clonados e expressos em *E. coli*, que não possui actividade de Mak, tendo sido produzidas recombinantemente com sucesso quatro enzimas Mak e uma enzima TreS/Mak bifuncional. Seguidamente, foram realizados ensaios para testar a actividade destas enzimas em extracto, designadamente a sua especificidade para cada um dos substratos potenciais e a possível actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase observada em algumas enzimas com sequências com homologia relevante com Maks e responsáveis pela inactivação de alguns antibióticos desta classe.

As enzimas Mak expressas com sucesso apresentaram a actividade esperada em extracto e, dos diferentes aceitadores de grupos fosfato testados, apenas a maltose foi utilizada com eficiência na síntese de maltose-1-fosfato, enquanto que ATP, GTP e UTP foram dadores de fosfato eficientes na síntese daquele metabolito. Nos ensaios efectuados com antibióticos aminoglicosídeos não detectámos actividade, o que indica

que as enzimas estudadas não apresentam actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase nas condições testadas.

A enzima recombinante TreS/Mak de *Pseudomonas fluorescens* não apresentou a actividade esperada, isto é, a conversão directa de trealose em maltose-1-fosfato, tendo sido obtido um composto desconhecido como produto. Foram obtidos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) com vista à identificação do composto, tratando-se aparentemente de uma hexose bifosforilada. Esta enzima bifuncional utilizou maltose, trealose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoheptaose na síntese deste composto e apenas ATP foi utilizado como dador de grupos fosfato. Nos ensaios efectuados com antibióticos aminoglicosídeos, também não detectámos actividade, o que sugere que a TreS/Mak de *Pseudomonas fluorescens* não apresenta actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase.

Os resultados obtidos com este trabalho fornecem provas concretas sobre a identidade de maltocinases hipotéticas de vários grupos taxonómicos e servirá como base para trabalhos futuros que visem explorar a evolução não só destas enzimas, como também da via metabólica que canaliza trealose para a síntese de importantes polissacáridos de reserva como o glicogénio, ou com função mais específica, como por exemplo os α -glucanos da cápsula ou os polissacáridos de metilglucose de micobactérias, através de maltose-1-fosfato sintetizada por maltocinases.

Palavras-chave: maltocinase, trealose sintase, maltose-1-fosfato, trealose, função.

Abstract

A new pathway for the synthesis of α -glucans from trehalose has been recently discovered in *Mycobacterium tuberculosis*, and it has been genetically validated as a new promising target for the development of new drugs against tuberculosis. Diverse enzymes are involved in this pathway, namely trehalose synthase (TreS) and maltokinase (Mak).

The transcriptional unit *treS/mak* is present in a range of prokaryotes including only one archeal species. The *treS* and *mak* genes are fused in some microorganisms, encoding a bifunctional enzyme, trehalose synthase/maltokinase (TreS/Mak). We built phylogenetic trees with Mak, TreS and TreS/Mak sequences from different microorganisms to examine the enzyme distribution in the different phylogenetic groups. Mak and TreS/Mak enzymes from microorganisms of the different groups were selected from one of these trees to confirm their biological function.

Subsequently, a functional study of the selected Mak and TreS/Mak enzymes was carried out. The Mak sequences have moderate homology values between the different organisms and, until now, no TreS/Mak fusion was characterized. The selected *mak* and *treS/mak* genes were amplified, cloned and expressed in *E. coli*, which lacks Mak activity, and four recombinant Makers and one recombinant TreS/Mak were successfully produced. Afterward, assays to test the activity of these enzymes in cell extracts were performed, namely their specificity to each of the potential substrates and the possible activity of aminoglycoside phosphotransferase, which was observed in a few enzymes with relevant homology with Makers and responsible for the inactivation of some aminoglycoside antibiotics.

The successfully expressed Mak enzymes exhibited the expected activity and, among the different acceptors tested only maltose was efficiently used in the production of maltose-1-phosphate while ATP, GTP and UTP were efficient phosphate donors to the synthesis of the phosphorylated metabolite. Activity was not detected in the assays performed with aminoglycoside antibiotics, which indicates that these enzymes lack aminoglycoside phosphotransferase activity, at least in the conditions tested.

The activity of the recombinant TreS/Mak from *Pseudomonas fluorescens* was unexpected, since this enzyme produced an unknown compound instead of maltose-1-phosphate. Nuclear magnetic resonance spectra were obtained to identify the compound,

which seems to be a biphosphorylated hexose. This TreS/Mak enzyme used maltose, trehalose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose and maltoheptaose to produce this compound and only ATP was used as a phosphate donor. Activity was also not detected in the assays performed with aminoglycoside antibiotics, which suggests that this enzyme lacks aminoglycoside phosphotransferase activity.

The results obtained with this work provide concrete evidence about the identity of hypothetical maltokinases from several taxonomic groups and will serve as a base for future work aiming to explore the evolution of these enzymes and of the pathway that channels trehalose for the synthesis of important storage polysaccharides, such as glycogen or polysaccharides with a more specific metabolic function, such as capsular α -glucans or the methylglucose polysaccharides from mycobacteria, through the maltose-1-phosphate produced by maltokinases.

Keywords: maltokinase, trehalose synthase, maltose-1-phosphate, trehalose, function.

Capítulo 1: Introdução

1.1 Trealose

1.1.1 Importância da Trealose

Os hidratos de carbono ou açúcares, desempenham funções essenciais à vida. Estas moléculas podem ser utilizadas como fonte de energia, como mensageiros químicos e para a biossíntese de componentes estruturais (Elbein *et al.*, 2003).

A trealose é um dissacárido de glucose ubíquo, encontrando-se numa vasta gama de organismos, que inclui bactérias, leveduras, fungos, invertebrados e plantas (Elbein *et al.*, 2003), mas não se encontra em células de mamíferos (Murphy *et al.*, 2005). A trealose apresenta uma ampla diversidade de funções que dependem do sistema biológico em análise (Argüelles, 2000). Relativamente aos organismos procaríotas, a trealose pode ser utilizada como fonte de carbono e de energia, como soluto compatível e como componente de estruturas mais complexas como alguns glicolípidos da parede celular (Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003). Quando a célula é exposta a alguma condição de stress ambiental (nomeadamente desidratação, dessecação, calor, frio e oxidação), a síntese de trealose é induzida e os seus níveis aumentam no citoplasma (Murphy *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Este dissacárido apresenta uma estrutura invulgar não redutora, o que lhe confere características físicas e estereoquímicas únicas que lhe permitem proteger membranas celulares e proteínas contra inativação ou desnaturação resultantes de várias condições de stress e de limitações nutricionais, possibilitando ainda a manutenção da integridade celular (Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003).

Em micobactérias e organismos relacionados a trealose não só está presente no citoplasma em níveis elevados como também é um componente estrutural importante de vários glicolípidos que constituem a parede celular (Elbein *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011).

1.1.2 Biossíntese da Trealose

Foram identificadas até à data cinco vias distintas para a biossíntese de trealose: OtsA-OtsB, TreY-TreZ, TreS, TreP e TreT (De Smet *et al.*, 2000; Elbein *et al.*, 2003; Nobre *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). A via OtsA-OtsB, que constitui a via mais

estudada e mais distribuída pelos microrganismos, envolve duas reacções: a condensação de UDP-glucose e glucose-6-fosfato em trealose-6-fosfato e UDP. A trealose-6-fosfato é de seguida desfosforilada em trealose. Estas reacções são catalisadas pelas enzimas trealose-6-fosfato sintase (codificada pelo gene *otsA*) e trealose-6-fosfato fosfatase (codificada pelo gene *otsB*), respectivamente (De Smet *et al.*, 2000; Woodruff *et al.*, 2004).

A via TreY-TreZ é uma via alternativa para a formação de trealose a partir de glicogénio, na qual se verifica um rearranjo nos resíduos de glucose terminais na cadeia do polissacárido cuja ligação α -1,4 é rearranjada numa ligação α -1,1 entre as duas glucoses da trealose. Subsequentemente, este dissacárido terminal é clivado da extremidade da molécula de glicogénio sendo assim libertada uma molécula de trealose. A primeira reacção é catalisada pela enzima maltooligosiltrealose sintase (codificada pelo gene *treY*), enquanto que a segunda reacção é catalisada pela enzima maltooligosiltrealose hidrolase (codificada pelo gene *treZ*) (De Smet *et al.*, 2000; Woodruff *et al.*, 2004).

A enzima TreP actua principalmente no sentido de hidrólise de trehalose na presença de um dador de fosfato resultando na formação de glucose e glucose-1-fosfato. Eventualmente alguns fungos e poucas bactérias conseguem utilizar a reacção inversa como via alternativa para síntese de trealose (Elbein *et al.*, 2003).

A enzima TreT foi a última via para a síntese de trealose a ser descoberta. Esta enzima utiliza glucose em vez de glucose-6-fosfato como aceitador de uma segunda glucose activada em ADP-glucose (Nobre *et al.*, 2008).

Finalmente, a via TreS envolve o rearranjo intramolecular da maltose de modo a que a sua ligação α -1,4 seja convertida numa ligação α -1,1 para formar a trealose. Esta reacção é catalisada pela enzima trealose sintase (TreS) codificada pelo gene *treS* (De Smet *et al.*, 2000; Woodruff *et al.*, 2004). A enzima TreS também tem a capacidade de efectuar a reacção inversa, ou seja, a conversão de trealose em maltose. No entanto, a TreS de *Mycobacterium smegmatis* apresenta maior afinidade para maltose ($K_m \sim 10$ mM) do que para trealose ($K_m \sim 90$ mM) (Pan *et al.*, 2004).

A maioria dos organismos procarionotas possui apenas a via OtsA-OtsB para a síntese de trealose (Woodruff *et al.*, 2004). Contudo, existem evidências de que as vias OtsA-OtsB, TreY-TreZ e TreS estão presentes e funcionais em algumas micobactérias, nomeadamente *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG e *Mycobacterium smegmatis*. A presença das três vias para a síntese deste dissacárido

realça o papel essencial que a trealose desempenha na fisiologia micobacteriana (De Smet *et al.*, 2000; Woodruff *et al.*, 2004).

Woodruff e colaboradores (Woodruff *et al.*, 2004) construíram mutantes de *M. smegmatis* sem as três vias para a síntese de trealose e verificaram que estes mutantes apenas conseguem crescer se a trealose for suplementada no meio de crescimento. Os autores demonstraram ainda que as três vias para a síntese de trealose são mutuamente redundantes neste organismo. Por outro lado, Murphy e seus colegas (Murphy *et al.*, 2005) mostraram que, ao introduzirem mutações independentes em cada uma das três vias para a síntese de trealose em *M. tuberculosis*, a via OtsA-OtsB era estritamente essencial à sobrevivência do organismo. Esta via constitui a via dominante e não é possível compensar a sua perda recorrendo às restantes vias em *M. tuberculosis*.

1.1.3 Interação entre o Metabolismo da Trealose e dos α -Glucanos

Glucanos são polissacáridos constituídos por unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas, sendo classificado como α -glucano (por exemplo, o glicogénio) ou β -glucano (por exemplo, a celulose) de acordo com o tipo de ligação glicosídica (α ou β) (Sutherland, 2001).

As micobactérias apresentam diferentes tipos de glucanos (Chandra *et al.*, 2011) e neste trabalho vamos focar-nos nos seguintes α -glucanos: glicogénio intracelular, o α -glucano capsular e os lipopolissacáridos de metilglucose (MGLPs), cujas cadeias principais são constituídas por glucoses ligadas por ligações α -1,4. O glicogénio é um polímero de glucose ubíquo em bactérias, sendo a sua função armazenar energia e carbono. O esqueleto do glicogénio consiste em unidades de glucose ligadas por ligações α -1,4, ocorrendo a introdução de ramificações através de ligações α -1,6 (Chandra *et al.*, 2011; Garg *et al.*, 2007).

As micobactérias apresentam uma cápsula extracelular para além da parede celular, sendo o α -glucano um dos seus principais constituintes (Chandra *et al.*, 2011). A estrutura do α -glucano capsular é muito semelhante à do glicogénio intracelular. Pensa-se que a cápsula desempenha funções ao nível da patogénese, tem actividades anti-fagocíticas e imunomoduladoras e permite a evasão do microrganismo do sistema imunitário por mimetismo molecular, uma vez que a estrutura do α -glucano capsular é semelhante à do glicogénio (Kaur *et al.*, 2009; Sambou *et al.*, 2008).

As micobactérias sintetizam ainda dois tipos de polissacáridos invulgares intracelulares, os lipopolissacáridos de metilglucose (MGLPs) e os polissacáridos de metilmanose, sendo ambos constituídos por hexoses metiladas. O polissacárido de metilglucose apresenta principalmente unidades de glucose (e metilglucose) unidas por ligações α -1,4 que permitem que esta molécula adopte uma conformação em hélice (Empadinhas *et al.*, 2008; Jackson & Brennan, 2009). Estes polissacáridos formam complexos 1:1 com ácidos gordos de cadeia média e pensa-se que a sua função fisiológica seja transportar e proteger os ácidos gordos recém-sintetizados da degradação por esterases existentes no citoplasma. Deste modo podem também regular o processamento desses ácidos gordos para a síntese de ácidos micólicos característicos da parede das micobactérias, e lípidos mais complexos. Portanto, foi proposto que estes polissacáridos estão envolvidos na regulação do metabolismo lipídico em micobactérias (Stadthagen *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2012). Deste modo, os MGLPs são considerados α -glucanos muito especializados (Chandra *et al.*, 2011).

A via GlgC-GlgA clássica para a formação de α -glucanos envolve três reacções: A enzima GlgC (ADP-glucose pirofosforilase) transforma glucose-1-fosfato em ADP-glucose, que é subsequentemente polimerizada em α -glucano linear pela acção da enzima GlgA (glicogénio sintase). Finalmente, a enzima GlgB (enzima de ramificação de α -glucanos) introduz ramificações na cadeia de α -glucano linear (Chandra *et al.*, 2011; Garg *et al.*, 2007). A via GlgP constitui a via clássica para a degradação de α -glucanos e envolve a acção conjunta das enzimas GlgP (glicogénio fosforilase) e GlgX (enzima de desramificação), formando-se glucose 1-fosfato (Chandra *et al.*, 2011).

Os MGLPs são sintetizados através da via Rv3032, que constitui uma via alternativa para a síntese de α -glucanos, mas apenas parte das enzimas envolvidas nesta via complexa são conhecidas (Stadthagen *et al.*, 2007; Empadinhas *et al.*, 2008; Kalscheuer *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2012). O gene *Rv3032* codifica uma α -1,4-glucosiltransferase que se julga ser a principal responsável pela extensão dos MGLPs (apesar desta enzima também estar envolvida no alongamento de outros α -1,4-glucanos). O gene *Rv3031* é um gene que codifica uma possível enzima de ramificação que se pensa ser a responsável pela formação de ligações glicosídicas α -1,6 nos MGLPs e que pode eventualmente ter actividade redundante com a enzima GlgB (Jackson & Brennan, 2009; Stadthagen *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2012).

Estudos recentes em diferentes bactérias permitiram constatar a interacção complexa entre o metabolismo da trealose e dos α -glucanos, que ocorre através de três

vias: a via TreY-TreZ, a via TreS e a via GlgE descrita abaixo (secção 1.1.3.1). A via TreY-TreZ permite a degradação de glicogénio em trealose (Chandra *et al.*, 2011), como já foi referido. Pan e colaboradores (Pan *et al.*, 2008) demonstraram que a TreS de *Mycobacterium smegmatis*, para além de interconverter trealose e maltose, também converte glicogénio em trealose através da sua actividade de amilase, e sugeriram que esta enzima, por si só, constitui outra via para a degradação de glicogénio em trealose. Os autores propuseram ainda que a TreS apresenta dois locais activos distintos, sendo um responsável pela interconversão de trealose e maltose e o outro pela actividade de amilase. Estes autores verificaram ainda que, em *M. smegmatis*, elevadas concentrações intracelulares de trealose aparentemente causam ou estimulam a acumulação de glicogénio quando a enzima TreS está presente. Assim, foi proposto que a TreS desempenha funções de sensor e regulador dos níveis intracelulares de trealose e quando os níveis intracelulares de trealose são muito elevados, podendo inclusive ser tóxicos para as células, a TreS converte a trealose em glicogénio, envolvendo a maltose como um intermediário (Pan *et al.*, 2008). Alternativamente, a trealose podia ser hidrolizada em glucose através da acção da enzima trealase, que se encontra em muitos organismos que sintetizam e/ou utilizam trealose, incluindo *M. smegmatis* (Carroll *et al.*, 2007; Elbein *et al.*, 2010). Contudo, é necessário despender energia para sintetizar a trealose e provavelmente perder-se-ia esta energia ao ser efectuada esta degradação, já que as células não têm capacidade para armazenar elevadas quantidades de glucose no seu citoplasma. A conversão de trealose em glicogénio tem ainda a vantagem de que esta se encontra rapidamente disponível para a célula em caso de necessidade. Portanto, a trealase não parece estar envolvida na regulação dos níveis intracelulares de trealose (Elbein *et al.*, 2010). Por outro lado, quando há carência de trealose, pensa-se que a TreS também tem capacidade para aumentar os níveis intracelulares de trealose. Primeiro, a TreS transforma o glicogénio em maltose através da sua actividade de amilase, seguindo-se a interconversão de maltose em trealose (Elbein *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2008).

1.1.3.1 Via GlgE

Recentemente, foi descoberta em *M. tuberculosis* a via GlgE, uma nova via para a síntese de α -glucanos a partir de trealose (Kalscheuer *et al.*, 2010), tendo sido também identificada em parte em *M. smegmatis* (Elbein *et al.*, 2010). Nesta via intervêm 4

enzimas: a trealose sintase (TreS), a maltocinase (Mak), a GlgE (maltosiltransferase) e a GlgB (enzima de ramificação dos α -glucanos). Inicialmente, a TreS interconverte trealose e maltose e a Mak fosforila a maltose em maltose-1-fosfato na presença de ATP (Mendes *et al.*, 2010). Em muitos microorganismos os genes *treS* e *mak* são dois genes adjacentes do mesmo operão, o que sugere que a maltose-1-fosfato é produzida a partir de trealose via maltose através de reacções sequenciais mediadas por TreS e Mak. A maltose-1-fosfato é então utilizada como unidade de construção (dissacarídeo) para a formação de cadeias lineares de α -1,4-glucano pela enzima GlgE (maltosiltransferase). Seguidamente, a enzima GlgB vai introduzir ramificações α -1,6 nas cadeias lineares de α -1,4-glucano. Os genes *glgE* e *glgB* que codificam estas enzimas formam um operão (Kalscheuer *et al.*, 2010). O gene *glgE* foi considerado essencial para o crescimento de *M. tuberculosis* e demonstrou-se que o gene *glgB* também é essencial neste microrganismo (Sasseti *et al.*, 2003; Kalscheuer *et al.*, 2010).

Kalscheuer e colaboradores (Kalscheuer *et al.*, 2010) demonstraram que a inactivação de GlgE é letal para *M. tuberculosis*, tanto *in vitro* como num modelo de ratinho. Esta letalidade deve-se ao aumento dos níveis de maltose-1-fosfato, o substrato da enzima GlgE, que acumula até atingir níveis tóxicos para a célula. A eliminação de GlgB também resultou na acumulação de maltose-1-fosfato. Os autores afirmam que a toxicidade de maltose-1-fosfato pode não ser directa, ocorrendo através de mecanismos pleiotrópicos mais complexos e ainda desconhecidos.

Letalidade sintética consiste em qualquer combinação de duas mutações que, quando separadas não são letais, mas que em conjunto resultam em inviabilidade. Kalscheuer e colaboradores (Kalscheuer *et al.*, 2010) verificaram que o bloqueio da via Rv3032 (através da disrupção do gene *Rv3032*) ou da via GlgE (através da disrupção do gene *treS*) não afecta o crescimento de *M. tuberculosis*. Contudo, o bloqueio das duas vias em simultâneo é sinteticamente letal para o microrganismo, o que sugere que as vias são pelo menos parcialmente redundantes. Mais concretamente, sugere que ambas as vias estão envolvidas na síntese de um α -glucano que é fundamental à sobrevivência de *M. tuberculosis*, quer a nível estrutural quer a nível funcional. Portanto, os produtos da via GlgE são provavelmente sujeitos (pelo menos em parte) a modificações posteriores, sendo produzidos derivados relacionados com os MGLPs a nível estrutural e/ou funcional que ainda não foram identificados (Chandra *et al.*, 2011; Kalscheuer *et al.*, 2010). Neste contexto, tanto GlgE como GlgB foram validados a nível genético como alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos contra a tuberculose, mas

GlgE constitui um alvo mais atractivo uma vez que os mamíferos apresentam homólogos de GlgB (Chandra *et al.*, 2011; Kalscheuer *et al.*, 2010).

As funções fisiológicas da via GlgE podem ser multifacetadas mas são ainda desconhecidas. Para além da interacção com as vias GlgC-GlgA e Rv3032, pensa-se que esta via pode estar envolvida na síntese de glicogénio intracelular, na síntese de α -glucano capsular e na síntese de MGLPs. Esta via pode ainda ser importante na persistência de *M. tuberculosis* em microambientes no hospedeiro cuja disponibilidade de nutrientes é limitada, uma vez que o glicogénio é um polímero de armazenamento intracelular ubíquo (Kalscheuer *et al.*, 2010).

1.1.3.2 Organização e Distribuição dos Genes da Via GlgE

Como já foi mencionado, as enzimas TreS, Mak, GlgE e GlgB fazem parte da via GlgE. Chandra e colaboradores (Chandra *et al.*, 2011) analisaram a organização destes genes em diferentes microrganismos e verificaram que os genes *mak* e *treS* se encontram fundidos com mais frequência do que separados. Os genes *mak* e *glgE* estavam mais associados com a via GlgE uma vez que foram muito raramente encontrados na ausência dos outros dois genes da via. Os genes *treS* e *glgB* foram encontrados sozinhos ou em conjunto muito frequentemente sem os genes *mak* e *glgE*, o que sugere que estes genes desempenham funções noutros contextos (podendo, por exemplo, fazer parte de outras vias). Para além disso, estes investigadores realizaram também uma análise comparativa de genomas com o intuito de avaliar a ocorrência das diferentes vias biossintéticas de α -glucanos em diferentes microrganismos. Relativamente à via GlgE, os autores encontraram o gene *glgE* em 21% de todos os genomas de bactérias completamente sequenciados que foram analisados, e este gene foi encontrado em apenas um genoma de um arqueão. Todos os genes da via GlgE (*treS*, *mak*, *glgE* e *glgB*) estavam presentes em 14% dos genomas analisados. A via GlgE estava presente principalmente em organismos com genomas grandes e ricos em G+C e com estilos de vida complexos, incluindo muitos organismos que interagem com plantas. Esta via foi encontrada em muitos organismos que pertencem à ordem *Actinomycetales*, nomeadamente espécies de *Mycobacterium*, *Corynebacterium* e *Streptomyces*. O organismo *Picrophilus torridus* DSM 9790 foi o único arqueão, com sequência genómica disponível, que apresentava todos os genes da via GlgE e que apresentava uma maltocinase (Mak).

1.2 Maltocinase e Trealose Sintase

A maltocinase (Mak) catalisa a formação de maltose-1-fosfato e ADP a partir de maltose e ATP (Drepper *et al.*, 1996). A maioria dos genomas disponíveis de micobactérias possui o gene *mak* (Mendes *et al.*, 2010), que foi considerado essencial para o crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv (Sasseti *et al.*, 2003), sendo um potencial alvo para desenvolvimento de fármacos contra a tuberculose.

Apesar do metabolito maltose-1-fosfato ter sido inicialmente identificado em extractos de *Mycobacterium bovis* BCG nos anos 60 (Narumi & Tsumita 1967), a enzima Mak foi apenas identificada nos anos 90 em extractos de uma estirpe de *Actinoplanes* (Drepper *et al.*, 1996). A Mak de *Actinoplanes missouriensis* foi bioquimicamente caracterizada (Niehues *et al.*, 2003), tratando-se uma enzima monomérica com uma massa molecular estimada de 57 kDa. A actividade máxima foi verificada a 55°C e a pH óptimo entre 7 e 9. Esta Mak seguiu a cinética de Michaelis-Menten para os substratos maltose e ATP, com valores de K_m de 2,6 mM para o primeiro e de 0,54 mM para o segundo. A enzima ostentou elevada especificidade para maltose como aceitadora de grupos fosfato, tendo os maltooligosacáridos maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose resultado em actividade fraca. A enzima também apresentou elevada especificidade para ATP como dador de grupos fosfato relativamente a CTP, GTP, TTP e UTP, que resultaram em reduzida ou nenhuma actividade enzimática. Foi ainda constatado que a actividade da Mak de *Actinoplanes missouriensis* era independente da fase em que se encontravam os microrganismos (exponencial ou estacionária) e do conteúdo em maltose do meio de crescimento.

Posteriormente, a Mak de *A. missouriensis* e a Mak de *Streptomyces coelicolor* foram isoladas e exaustivamente caracterizadas para se confirmar a sua identidade e propriedades (Jarling *et al.*, 2004). Verificou-se que as propriedades destas enzimas eram semelhantes às propriedades da enzima caracterizada por Niehues *et al.* (2003). Jarling *et al.* (2004) testaram ambas as enzimas Mak para averiguar se estas apresentavam actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase. Os autores constataram que nenhuma das enzimas fosforilou os aminoglicosídeos testados, apesar de estas enzimas terem sequências relacionadas com aminoglicosídeo fosfotransferases.

A primeira Mak de uma micobactéria a ser bioquimicamente caracterizada foi a Mak de *Mycobacterium bovis* BCG (Mendes *et al.*, 2010). Esta enzima apresenta uma

identidade de sequência de 99 a 100% relativamente à Mak de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enzima é um monómero em solução, com uma massa molecular de $50,7 \pm 4,2$ kDa. Esta Mak é dependente de maltose e ATP, sendo o valor de K_m para a maltose de $2,52 \pm 0,40$ mM e para o ATP de $0,74 \pm 0,12$ mM. A enzima é dependente de catiões divalentes, sendo o Mg^{2+} o melhor activador. A actividade máxima foi verificada a 60°C e pH entre 7 e 9 (a 37°C). Em relação à especificidade de substratos, a utilização dos aceitadores de fosfato maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoheptaose resultou em actividade residual. Portanto, apenas a maltose é utilizada com eficiência por esta Mak de *M. bovis* BCG/*M. tuberculosis*, tal como aconteceu para as enzimas de *A. missouriensis* e *S. coelicolor*. No entanto, para além de ATP, a enzima também produziu maltose-1-fosfato a partir de GTP e UTP com eficiência, ao contrário das enzimas de *A. missouriensis* e *S. coelicolor*. A possibilidade de utilização de diferentes substratos para a síntese de maltose-1-fosfato parece sugerir uma exigência absoluta por este metabolito, confirmando a essencialidade do gene *mak* em *M. tuberculosis* (Sasseti *et al.*, 2003). Os autores também testaram os antibióticos aminoglicosídeos gentamicina, higromicina B, canamicina e estreptomicina como aceitadores de grupos fosfato, mas não verificaram actividade. Os dados bioquímicos das maltocinases que foram caracterizadas encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo dos dados bioquímicos das maltocinases que foram caracterizadas, que são as maltocinases de *Actinoplanes missouriensis*, *Streptomyces coelicolor* e *Mycobacterium bovis* BCG.

	Mak de <i>A. missouriensis</i>	Mak de <i>S. coelicolor</i>	Mak de <i>M. bovis</i> BCG
Peso molecular	57 kDa (estimado)	53 kDa	$50,7 \pm 4,2$ kDa
Actividade máxima	55°C	45°C	60°C
pH óptimo	7 a 9	7,0	7 a 9
Valores de K_m	2,6 mM para maltose 0,54 mM para ATP	-	2,52 mM para maltose 0,74 mM para ATP
Especificidade de substratos	Maltose e ATP	Maltose e ATP	Maltose, ATP, GTP e UTP
Actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase	Não	Não	Não

A enzima trealose sintase catalisa a interconversão reversível entre trealose e maltose (Zhang *et al.*, 2011). A actividade desta enzima foi inicialmente demonstrada em *Pimelobacter* sp. nos anos 90 por Nishimoto *et al.* (1995), tendo sido posteriormente purificada a partir de extractos celulares deste microrganismo com um peso molecular estimado de 62,0 kDa. Nishimoto *et al.* (1996) verificaram que a TreS catalisa a conversão de maltose em trealose e vice-versa, mas não utilizou outros açúcares. Os autores verificaram ainda que a taxa de conversão de maltose em trealose era independente da concentração de maltose. A temperatura e o pH óptimos desta enzima eram 20°C e pH 7,5, respectivamente. Após a caracterização desta TreS, muitas mais foram caracterizadas, nomeadamente as enzimas de *Thermobifida fusca* (Wei *et al.*, 2004), *Mycobacterium smegmatis* (Pan *et al.*, 2004), *Picrophilus torridus* (Chen *et al.*, 2006) e *Arthrobacter aurescens* (Xiuli *et al.*, 2009). A TreS de *Thermobifida fusca* foi clonada e expressa em *E. coli* (Wei *et al.*, 2004), com peso molecular deduzido de 66 kDa. A temperatura e o pH óptimos eram de 25°C e 6,5, respectivamente, ao converter maltose em trealose. Contudo, quando os autores aumentaram a concentração de enzima recombinante ou quando aumentaram a temperatura para 37°C, a TreS produziu glucose em elevada proporção. A actividade da TreS recombinante foi ainda afectada por elevadas concentrações de glucose.

A TreS de *M. smegmatis* foi inicialmente purificada a partir de extractos celulares (Pan *et al.*, 2004), apresentando um peso molecular de aproximadamente 68 kDa. No entanto, a enzima activa apresentou um peso molecular de aproximadamente 390 kDa, sugerindo que forma um hexâmero de seis subunidades idênticas. Esta enzima foi também clonada e expressa em *E. coli* por estes autores. Como já foi referido, os valores de K_m para a maltose e para a trealose foram de aproximadamente 10 mM e 90 mM, respectivamente, o que indica que a maltose é o substrato preferido. Os autores também verificaram a produção de 8 a 10% de glucose. O pH óptimo desta enzima foi 7. Mais tarde, Pan *et al.* (2008) mostraram que a enzima TreS de *M. smegmatis* (TreS em extractos deste organismo e TreS recombinante produzida em *E. coli*) também converte glicogénio em trealose através da sua actividade de amilase. Esta enzima tem também a capacidade de converter maltooligosacáridos, nomeadamente maltoheptaose, em maltose e trealose através da sua actividade de amilase. Estes autores propuseram ainda que esta enzima apresenta dois locais activos distintos, sendo um responsável pela

interconversão de trealose e maltose e o outro pela actividade de amilase, como já foi mencionado.

Chen e colaboradores (Chen *et al.*, 2006) clonaram e expressaram a enzima TreS de *Picrophilus torridus* em *E. coli*. A enzima recombinante apresentou um pH óptimo de 6,0 e uma temperatura óptima de 45°C, mantendo elevada actividade a pH 5 e a 60°C. A TreS recombinante revelou uma eficiência catalítica superior para maltose em relação a trealose, sugerindo que a maltose é o substrato preferencial. Os autores verificaram também que a conversão máxima de maltose em trealose foi independente da concentração de maltose e aumentou a temperaturas mais reduzidas. Esta TreS apresentou cinco aminoácidos conservados e importantes para a actividade de enzimas da família α -amilase, o que indica que esta enzima pode desempenhar actividade de α -amilase.

A TreS de *Arthrobacter aurescens* foi também clonada e expressa em *E. coli* (Xiuli *et al.*, 2009). A enzima recombinante possui um peso molecular de 68 kDa e catalisa a conversão entre maltose e trealose, produzindo também 13% de glucose. A temperatura e o pH óptimos consistiram em 35°C e 6,5, respectivamente. Os autores verificaram ainda que a actividade da enzima aumentou com a adição de 1 mM de Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Ca^{2+} . Os dados bioquímicos das trealose sintases mencionadas que foram caracterizadas encontram-se resumidamente na Tabela 2.

Tabela 2: Dados bioquímicos de trealose sintases que foram caracterizadas: as TreSs de *Pimelobacter sp.* R48, *Thermobifida fusca*, *Mycobacterium smegmatis*, *Picrophilus torridus* e *Arthrobacter aureescens*.

	TreS de <i>Pimelobacter</i> <i>sp.</i>	TreS de <i>T. fusca</i>	TreS de <i>M. smegmatis</i>	TreS de <i>P. torridus</i>	TreS de <i>A. aureescens</i>
Peso molecular	62,0 kDa (estimado)	66 kDa (estimado)	68 kDa (390 kDa activa)	-	68 kDa
Temperatura óptima	20°C	25°C	-	45°C	35°C
pH óptimo	7,5	6,5	7,0	6,0	6,5
Valores de K_m	-	-	10 mM maltose e 90 mM trealose	-	-
Especificidade de substratos	Maltose e trealose	-	Maltose, trealose e maltooligos- sacáridos	-	-
Produção de glucose	-	Sim	Sim	-	Sim
Actividade de amilase	-	-	Sim	Talvez	-

A unidade transcripcional *treS/mak* está presente numa grande variedade de procariontas, incluindo um arqueão, sugerindo um envolvimento numa via metabólica comum. Em alguns microrganismos estes genes encontram-se fundidos num só, codificando a enzima bifuncional trealose sintase/maltocinase (TreS/Mak), que se pensa catalisar a formação de maltose-1-fosfato directamente a partir de trealose (Mendes *et al.*, 2010). No entanto, a diversidade de sequências de possíveis maltocinases presentes nos vários grupos taxonómicos representa um desafio de identificação, que se traduziu na anotação incorrecta de várias maltocinases, contrariamente ao que acontece com as outras enzimas da via GlgE, cujas sequências são bastante conservadas. Como tal, havia necessidade de confirmar a função nos vários grupos taxonómicos em que a Mak está presente, assim como a função das enzimas bifuncionais TreS/Mak, já que nenhuma destas foi caracterizada. Para tal, seleccionámos organismos representantes de vários grupos taxonómicos com TreS e Mak, tanto na forma fundida como independente, a partir de uma árvore filogenética para testarmos a actividade destas enzimas. Este trabalho fornece provas concretas sobre a identidade de possíveis maltocinases e servirá como base a trabalhos futuros que explorem a função metabólica não só destas enzimas, como também das da via GlgE.

Capítulo 2: Materiais e Métodos

2.1 Identificação e Análise de Sequências das Enzimas Mak e TreS ou TreS/Mak em diferentes Microrganismos

Para identificar os genes *mak* e *treS/mak* em genomas de diferentes microrganismos com o intuito de estudar as enzimas correspondentes, foram utilizadas as sequências de aminoácidos das enzimas Mak e TreS de *Mycobacterium bovis* BCG (números de acesso YP_976263 e YP_976262, respectivamente) em alinhamentos de sequências (recorrendo à ferramenta BLAST) na base de dados do Centro Nacional para Informação de Biotecnologia (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Através destes alinhamentos, foi possível identificar e registar sequências de aminoácidos das enzimas Mak e TreS ou TreS/Mak de diferentes microrganismos, cujos genomas se encontram sequenciados e disponíveis no NCBI. As sequências recolhidas foram analisadas, recorrendo aos programas clustalX2 e GUIDANCE para gerar alinhamentos e ao programa MEGA5 para construir árvores filogenéticas. A árvore filogenética presente na Figura 1 foi construída a partir de 41 sequências, usando o clustalX2 para um alinhamento inicial e para a construção da primeira árvore filogenética. Após eliminação de sequências parálogas e ortólogas com alta homologia, procedeu-se a uma nova eliminação de sequências tendo o cuidado de manter os pesos relativos de cada grupo taxonómico. Realizou-se um novo alinhamento recorrendo ao programa GUIDANCE para eliminar zonas que contribuem para uma baixa qualidade de alinhamento. Procedeu-se a um novo alinhamento usando o programa clustalX2 e à construção de uma árvore filogenética sem raiz usando o programa MEGA5 com um método de evolução mínima.

2.2 Estirpes de Microrganismos

De modo a ser elaborado um estudo relativamente às enzimas Mak e TreS/Mak nos diferentes grupos taxonómicos, foi necessário obter microrganismos para cultivo (Anexos, secção 6.1) e extrair o respectivo DNA genómico, ou alternativamente obter o DNA genómico de microrganismos mais difíceis de cultivar. Infelizmente, não foi possível obter todos os microrganismos (ou o respectivo DNA) que se pretendiam

estudar inicialmente dado que algumas das estirpes com genoma sequenciado não estão depositadas em colecções de cultura.

Os microrganismos *Actinosynnema mirum* (DSM 43827), *Corynebacterium glutamicum* DSM (20300), *Dyadobacter fermentans* (DSM 18053), *Geodermatophilus obscurus* (DSM 43160), *Kineococcus radiotolerans* (DSM 14245), *Spirosoma linguale* (DSM 74) e *Streptomyces viridochromogenes* (DSM 40736) e o DNA cromossómico dos microrganismos *Picrophilus torridus* (DSM 9790), *Opitutus terrae* (DSM 11246) e *Stigmatella aurantiaca* (DSM 53787) foram obtidos a partir da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Alemanha).

O microrganismo *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 foi fornecido pelo Dr. Stuart Levy da *Tufts University* (Massachusetts, EUA). O DNA do microrganismo *Arthrospira maxima* CS-328 foi fornecido pelo Dr. Donald A. Bryant da *The Pennsylvania State University* (Pensilvânia, EUA).

2.3 Extracção de DNA Genómico

O DNA genómico dos microrganismos obtidos foi extraído através de um método apropriado para microrganismos Gram-positivos e com DNA rico em guanina+citosina (G+C), já que a maioria dos microrganismos obtidos apresentam estas características. Para tal, foi utilizado um protocolo adaptado de Nielsen *et al.*, 1995.

Inicialmente, foram ressuspendidas duas ansas de 1 µL com biomassa celular do microrganismo em 100 µL de água ultra-pura estéril num microtubo. Foram adicionados 300 µL de tampão de lise à suspensão (Anexos, secção 6.2), que foi misturada recorrendo ao vórtex e o microtubo foi incubado em gelo durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionada RNase (Qiagen) de modo a obter uma concentração final de 0,125 mg/mL, o microtubo foi invertido algumas vezes de modo a misturar suavemente o seu conteúdo e foi incubado a 37°C durante 1 hora. Foi ainda adicionada proteinase K (Sigma-Aldrich) de modo a obter uma concentração final de 0,07 mg/mL, o microtubo foi novamente invertido algumas vezes de modo a misturar suavemente o seu conteúdo, e foi incubado a 37°C durante 50 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 250 µL de acetato de amónia a 7,5 M, recorreu-se ao vórtex para misturar e o microtubo foi incubado em gelo durante 10 minutos. Foi adicionado tampão de extracção com CTAB

(Biosciences) (0,1 volumes) e incubado a 65°C durante 20 minutos. Seguidamente, foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (Biochemica) e recorreu-se ao vórtex para misturar de forma a obter um preparado homogéneo. Foi necessário centrifugar (13000 × g, 10 minutos) e remover a fase aquosa para um novo microtubo. O DNA foi então precipitado com isopropanol (0,54 volumes) e foi efectuada uma nova centrifugação (13000 × g, 5 minutos). Finalmente, foi necessário lavar o DNA com 1 mL de etanol 70% duas vezes, secar e ressuspender em 30 µL de água ultra-pura estéril.

2.4 Amplificação dos Genes *mak* e *treS/mak*

Os genes *mak* e *treS/mak* dos diferentes microrganismos foram amplificados a partir do DNA cromossómico obtido, ou a partir do DNA cromossómico extraído. Relativamente aos genes *treS/mak*, também foi amplificada apenas a sequência que corresponde ao gene *mak* a partir da sequência do gene fundido. Os *primers* para amplificação foram desenhados com base nas sequências genómicas dos microrganismos e foi adicionado um local de restrição para a enzima NdeI a cada *primer forward* e um local de restrição para a enzima HindIII a cada *primer reverse* (Tabela 1). Foi ainda removido o codão stop de cada *primer reverse* de modo a possibilitar a tradução de uma cauda de seis histidinas no terminal carboxílico das enzimas, sendo esta cauda codificada pelo plasmídeo de expressão pET30a.

A DNA polimerase utilizada para a realização da maior parte das reacções em cadeia da polimerase (PCRs) foi a KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen), uma polimerase muito robusta com actividade de *proofreading*. Primeiro, o DNA foi desnaturado a uma temperatura de 95°C durante 2 minutos. Em seguida, foram realizados 30 ciclos com uma etapa de desnaturação (20 segundos a 95°C), uma etapa de *annealing* (10 segundos às temperaturas indicadas da Tabela 3) e uma etapa de extensão (70°C durante 45 segundos para os genes *mak* e 2,5 minutos para os genes *treS/mak*). Por fim, foi efectuada uma etapa de extensão a 70°C, que teve a duração de 5 minutos para os genes *mak* e 10 minutos para os genes *treS/mak*.

Contudo, foi necessário recorrer a outra DNA polimerase, a AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase (Invitrogen), para amplificar os genes *mak* de *Actinosynnema*

mirum, de *Kineococcus radiotolerans* e de *Streptomyces viridochromogenes*, genes estes que foram mais difíceis de amplificar. Nas PCRs com esta DNA polimerase, o DNA foi inicialmente desnaturado a uma temperatura de 95°C durante 5 minutos. Foram então efectuados 30 ciclos constituídos por uma etapa de desnaturação (1 minuto a 95°C), uma etapa de *annealing* (1 minuto às temperaturas indicadas também da Tabela 3) e uma etapa de extensão (1 minuto e 45 segundos a 72°C). Finalmente, foi realizada uma etapa de extensão durante 5 minutos a 72°C.

Os produtos de cada PCR foram corridos num gel de agarose 1% (Anexos, secção 6.3) e em seguida purificados através da utilização do kit JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (Genomed) de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 3: *Primers* e temperaturas de *annealing* utilizados para amplificar os genes de interesse dos diferentes microrganismos através de PCR. Cada *primer forward* apresenta um local de restrição para a enzima NdeI (sublinhado) e cada *primer reverse* apresenta um local de restrição para a enzima HindIII (sublinhado).

Microorganismo	Gene	<i>Primer forward</i> (5'-3')	<i>Primer reverse</i> (5'-3')	Temp. de <i>annealing</i>
<i>A. mirum</i>	<i>mak</i>	ATAAACATATGACGCAACCCGAGGCTC	ATTAAGCTTCGCTCCTTCTCCGGTGATC	55°C
<i>A. maxima</i>	<i>mak</i>	AAATACATATGGCTAAAAGTTGGCATCAAAATATTTTC	ATAAAGCTTGACCACAAACCTCTAAGAGTTG	-
	<i>treS/mak</i>	AAATACATATGGCACAATCAAAACTCAATAATG	ATAAAGCTTGACCACAAACCTCTAAGAGTTG	-
<i>C. glutamicum</i>	<i>mak</i>	AAATACATATGAGCATTTGGCCAACACATC	ATAAAGCTTGCTAGAAGCCTTTCGACCG	58°C
<i>D. fermentans</i>	<i>mak</i>	AACCACATATGCTGGA AAAA ACTGGAACGC	ATAAAGCTTAGCCACCACAGCCGCTCC	60°C
	<i>treS/mak</i>	AACCACATATGGAATACAGGAAGGAATGCC	ATAAAGCTTAGCCACCACAGCCGCTCC	58°C
<i>G. obscurus</i>	<i>mak</i>	AAATACATATGAACGCCCTGACCCGGACTTCG	ATAAAGCTTGGTCTGTCGCTCGCCGG	63°C
<i>K. radiotolerans</i>	<i>mak</i>	AAATACATATGAGCGGGATGTCCGCACC	ATTAAGCTTGGACGGTTCGGCGGAGGC	61°C
<i>O. terrae</i>	<i>mak</i>	AAATACATATGCCGGAGCTCGGGCCGAGAG	ATAAAGCTTCCGGTCCGGTTCGTCGAGC	-
	<i>treS/mak</i>	AAATACATATGCCCTGTATCACCCCTGAAAAC	ATAAAGCTTCCGGTCCGGTTCGTCGAGC	62°C
<i>P. torridus</i>	<i>mak</i>	*	*	*
<i>P. fluorescens</i>	<i>mak</i>	AAATACATATGGAAGAGCTGCTCGAAGCGC	ATAAAGCTTCTCTCCACCAAGATCGGAAAAG	60°C
	<i>treS/mak</i>	AAATACATATGGCGAAGAAACCCAAAGGC	ATAAAGCTTCTCTCCACCAAGATCGGAAAAG	61°C
<i>S. linguale</i>	<i>mak</i>	AAATACATATGAGCCAGAACACCGGCATGATG	ATAAAGCTTCTCGCGTTTTTGTTCAGC	63°C
	<i>treS/mak</i>	AAATACATATGCTTATTTCGCAACCCATGAC	ATAAAGCTTCTCGCGTTTTTGTTCAGC	-
<i>S. aurantiaca</i>	<i>mak</i>	AATTACATATGACACCCCGTGGACCTGACCAAG	ATAAAGCTTCTCGCGCTCCTCCATCCTCAAG	60°C
<i>S. viridochromogenes</i>	<i>mak</i>	AAATACATATGAAAGGACCGGACGCCATGTC	ATAAAGCTTGGTTCAGGTGGCCGGACTCG	55°C

* O gene *mak* de *P. torridus* foi amplificado e clonado em pET30a pelo Vítor Carmona.

2.5 Clonagem dos Genes *mak* e *treS/mak*

2.5.1 Clonagem no Vector de Clonagem (TA cloning)

De modo a aumentar a eficiência desta clonagem, foi necessário efectuar PCR a cada um dos genes apenas com adeninas, tendo sido utilizada a Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Este PCR consistiu numa única etapa de extensão a 72°C durante 20 minutos. Os respectivos produtos foram purificados recorrendo ao kit JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit (Genomed) segundo as instruções do fabricante.

Em seguida, foi realizada a ligação de cada gene ao vector de clonagem pGEM[®]-T Easy (Promega) e a transformação das células competentes *E. coli* estirpe DH5 α (Anexos, secção 6.4). Foram transferidos 10 μ L desta ligação para um microtubo contendo as células competentes *E. coli* estirpe DH5 α , seguindo-se incubação em gelo durante 20 minutos. Procedeu-se ao choque térmico, que consistiu em mergulhar o microtubo num banho a 42°C durante exactamente 45 segundos, e depois 2 minutos em gelo. Foram adicionados 500 μ L de meio LB com solução de sais 1x (diluição da solução de sais 10x (Anexos, secção 6.4.5) com meio LB) ao microtubo, tendo este sido incubado 1 hora a 37°C para a recuperação das células. Finalmente, as células transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB com ampicilina (100 μ g/mL), ao qual foi previamente adicionado IPTG e X-Gal de modo a permitir a selecção azul/branco entre os clones. As caixas de Petri foram incubadas a 37°C para o crescimento dos clones.

Os clones brancos foram crescidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB com ampicilina (100 μ g/mL), num agitador a 160 rpm e a 37°C. O plasmídeo foi extraído destes clones através da utilização do kit ZR Plasmid Miniprep[™]-Classic (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e HindIII (Takara) e os produtos obtidos foram corridos num gel de agarose 1% de modo a confirmar se o plasmídeo contém o gene *mak* ou *treS/mak* inseridos. A banda do gene, quando estava presente, foi cortada e purificada como já foi referido.

2.5.2 Clonagem num Vector de Expressão

Para esta clonagem, é necessário que tanto os genes *mak* ou *treS/mak* como o plasmídeo pET30a (Novagen) estejam digeridos com as enzimas NdeI e HindIII. O plasmídeo e cada gene foram ligados através da utilização da enzima Speedy ligase (NZYTech), seguindo-se a transformação de células competentes *E. coli* estirpe DH5 α . As células transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB com canamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as caixas de Petri foram incubadas a 37°C para o crescimento dos clones. Os clones resultantes foram crescidos em meio LB com canamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o plasmídeo foi extraído como já foi mencionado.

Mais uma vez, foi necessário digerir o plasmídeo com as enzimas NdeI e HindIII para confirmar se este contém o gene *mak* ou *treS/mak*. Finalmente, sendo os clones positivos, foi necessário transformar células competentes *E. coli* estirpe BL-21 com este plasmídeo, que foram plaqueadas em meio sólido LB com canamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os clones resultantes foram positivos.

2.6 Estirpes, Condições de Crescimento e Expressão

As células de *E. coli* estirpe BL-21 que contêm o plasmídeo pET30a com o gene *mak* ou *treS/mak* foram crescidas em *erlenmeyers* de 1L com 250 mL de meio LB com canamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), num agitador a 160 rpm e a 37°C até à fase exponencial de crescimento ($\text{D.O.}_{610} = 0,8-1$). Foi adicionado IPTG numa concentração final de 0,1 mM para induzir a expressão do gene (*mak* ou *treS/mak*) e a temperatura foi reduzida para 30°C. As células foram recolhidas 4 horas após a indução através de centrifugação (10000 $\times g$, 10 minutos, 4°C).

2.7 Preparação de Extractos

As células de *E. coli* estirpe BL-21 que contêm a Mak ou a TreS/Mak recombinante foram ressuspensas em 5 mL de tampão Bis-tris propano (BTP) a 20 mM e pH 7. As células foram lisadas recorrendo a um sonificador, seguindo-se uma centrifugação ($13000 \times g$, 5 minutos, 4°C) para recolher a fracção solúvel de cada extracto. A fracção solúvel foi dialisada durante 16 horas de modo a serem removidos todos os metabolitos, para evitar a presença de possíveis substratos para a Mak ou TreS/Mak recombinantes. Para confirmar a expressão dos genes em cada um dos extractos obtidos e das respectivas fracções solúveis, foi efectuada uma electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (Anexos, secção 6.5). O controlo negativo consistiu num extracto (e respectiva fracção solúvel) obtido a partir de um clone de *E. coli* estirpe BL-21 que continha o plasmídeo pET30a vazio.

2.8 Ensaio Enzimáticos

2.8.1 Teste da Actividade das Maks

Para testar a actividade das enzimas Mak foram efectuadas reacções com um volume total de 50 μ L contendo 5 μ L de fracção solúvel do extracto, 3 mM de maltose, 3 mM de ATP e 10 mM de $MgCl_2$ em 50 mM de BTP a pH 7. Estas reacções foram incubadas a 37°C durante 10 minutos. O controlo negativo destas reacções consistiu em adicionar água destilada em vez da fracção solúvel do extracto.

Recorreu-se a cromatografia de camada fina (TLC) para a visualização da síntese de maltose-1-fosfato e o solvente utilizado era composto por ácido acético/etil acetato/água/amónia 25% (6:6:2:1, v/v) e o corante α -naftol/ácido sulfúrico foi utilizado para revelar a TLC depois de incubação a 120°C por alguns minutos. Os padrões utilizados foram ATP, ADP, maltose e trealose-6-fosfato, que foram utilizados para efeitos de comparação.

2.8.2 Teste da Actividade das TreSs/Maks

Para testar a actividade das enzimas TreS/Mak, foram efectuadas reacções com um volume total de 50 μL , contendo 5 μL de fracção solúvel do extracto, maltose (3 mM e 5 mM) ou trealose (5 e 7,5 mM), 3 mM de ATP e 10 mM de MgCl_2 em 50 mM de BTP a pH 7. Estas reacções foram incubadas a 37°C, tendo sido testados diferentes períodos de tempo (5, 20 e 30 minutos e 1 hora) para tentar verificar a formação de maltose-1-fosfato. O controlo negativo destas reacções consistiu em adicionar água destilada em vez da fracção solúvel do extracto em algumas das reacções, mas também foi utilizada a fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o plasmídeo pET30a vazio. Foi utilizado o mesmo solvente e os mesmos padrões, tendo sido incluída também a trealose como padrão.

2.9 Especificidade de Substratos

2.9.1 Especificidade das Maks por Substratos

Para determinar a especificidade de substratos das diferentes Maks, utilizaram-se glucose, galactose, manose, maltose, isomaltose, trealose, maltotriose, isomaltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoheptaose como possíveis aceitadores de fosfato e ATP, GTP e UTP como possíveis dadores de fosfato (todos da Sigma-Aldrich).

A sequência de aminoácidos da Mak apresenta considerável identidade com sequências de aminoglicosídeo fosfotransferases putativas. Por este motivo, também foi testada a actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase através da utilização dos antibióticos aminoglicosídeos gentamicina (A.G. Scientific), canamicina (NZYTech), higromicina B (Sigma-Aldrich) e estreptomicina (Sigma-Aldrich) como possíveis aceitadores de fosfato. As reacções decorreram num volume total de 50 μL , contendo 5 μL de fracção solúvel do extracto, 3 mM de aceitador de fosfato, 3 mM de dador de fosfato e 10 mM de MgCl_2 em 50 mM de BTP a pH 7. Estas reacções foram incubadas a 37°C durante 10 minutos. O controlo negativo consistiu na fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o plasmídeo pET30a vazio. Os produtos foram visualizados recorrendo a TLC, como já foi mencionado.

2.9.2 Especificidade das TreSs/Maks por Substratos

Para determinar a especificidade de substratos das diferentes TreSs/Maks, foram efectuadas as mesmas reacções utilizadas para as diferentes Maks, com excepção do tempo de incubação a 37°C, que consistiu em 20 minutos.

2.10 Identificação de um composto desconhecido por Ressonância Magnética Nuclear

Em algumas reacções com a enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, verificámos a formação de um composto inesperado e desconhecido, uma vez que não correspondeu a nenhum dos padrões utilizados. Foi decidido que seria necessário identificar o composto por ressonância magnética nuclear (RMN).

Foram efectuadas várias reacções com um volume total de 50 µL, contendo 5 µL de fracção solúvel do extracto, 7,5 mM de trealose, 3 mM de ATP e 10 mM de MgCl₂ em 50 mM de BTP a pH 7. Estas reacções foram incubadas a 37°C durante 20 minutos. Em seguida, foi realizada uma cromatografia preparativa, em que as reacções foram aplicadas em placas de sílica, juntamente com os padrões ATP, ADP, trealose, trealose-6-fosfato e glucose. O solvente utilizado para a migração das misturas era composto por ácido acético/etil acetato/água/amónia 25% (6:6:2:1, v/v) e o corante α -naftol/ácido sulfúrico foi utilizado para corar apenas os padrões e uma das reacções, tendo a restante superfície da placa de TLC sido coberta com papel alumínio. Por comparação com uma das reacções coradas, foi definida a zona não corada das placas onde se encontrava o composto desconhecido, tendo esta zona sido delimitada para remoção da sílica com o composto através da utilização de uma espátula. Foi adicionada água ultra-pura à sílica, seguindo-se a homogeneização com a espátula e um passo de centrifugação (9000 × g, 5 minutos, 4°C). O sobrenadante foi recolhido, congelado e liofilizado. Por fim, efectuou-se a ressuspensão da amostra em D₂O.

Posteriormente, os espectros de RMN foram adquiridos num espectrómetro Varian VNMRS 600 MHz, utilizando uma sonda de 3 mm de detecção indirecta, no caso do protão, e uma sonda 3 mm de banda larga no caso do fósforo-31. O espectro de protão (¹H) consistiu na acumulação de 160 transientes utilizando um pulso de leitura de

radiofrequências de 45° e um tempo de aquisição de 3 segundos a definir uma largura espectral de 7,2 kHz. O espectro de fósforo-31 (^{31}P) requereu a acumulação de 500 transientes, utilizando-se um pulso de leitura de 45° e um tempo de aquisição de 0,5 segundos a definir uma largura espectral de 10 kHz. Funções Lorentzianas de apodização foram aplicadas antes de proceder a transformação de Fourier para melhoria da razão sinal ruído.

Capítulo 3: Resultados e Discussão

3.1 Identificação e Análise de Sequências das Enzimas Mak e TreS ou TreS/Mak em diferentes Microrganismos

A filogenética envolve o desenvolvimento de métodos para reconstruir relações a nível evolutivo entre os organismos, genes ou enzimas, bem como a aplicação destes métodos na construção de árvores filogenéticas com os organismos em estudo. As árvores filogenéticas podem ser construídas com base em dados morfológicos ou dados moleculares (sequências de nucleótidos ou de aminoácidos) (Li, 2008).

Foram construídas árvores filogenéticas com sequências das Maks, TreSs e TreS/Maks de diferentes microrganismos. Estas sequências foram adquiridas através de alinhamentos de sequências no NCBI, como descrito em Materiais e Métodos. Na Figura 1 está representada uma destas árvores, que comparámos com uma árvore filogenética construída a partir das sequências do gene do RNA ribossomal 16S de procariotas (Figura 2).

Embora uma análise mais profunda que possa clarificar a origem e evolução das enzimas TreS e Mak esteja fora do âmbito deste trabalho, construímos árvores filogenéticas para inferir das relações de proximidade entre as sequências destas enzimas disponíveis nas bases de dados e assim seleccionar algumas representantes de grupos filogenéticos óbvios para a análise de validação de função.

Propomos que as enzimas TreS e Mak já se encontravam no antepassado comum entre as arqueias e as bactérias na forma não fundida e que permaneceram na forma não fundida em todas as actinobactérias, com excepção de *Rubrobacter xylanophilus*, que possivelmente perdeu os genes que codificam estas enzimas e terá voltado a recuperá-los numa eventual troca lateral de genes com uma proteobactéria não identificada. Nos restantes grupos de bactérias que apresentam as enzimas TreS e Mak, estas encontram-se na forma fundida, excepto em *Stigmatella aurantiaca* (δ -proteobacteria). Este microrganismo provavelmente adquiriu os genes que codificam as enzimas através de troca lateral de genes com outro microrganismo com enzimas não fundidas.

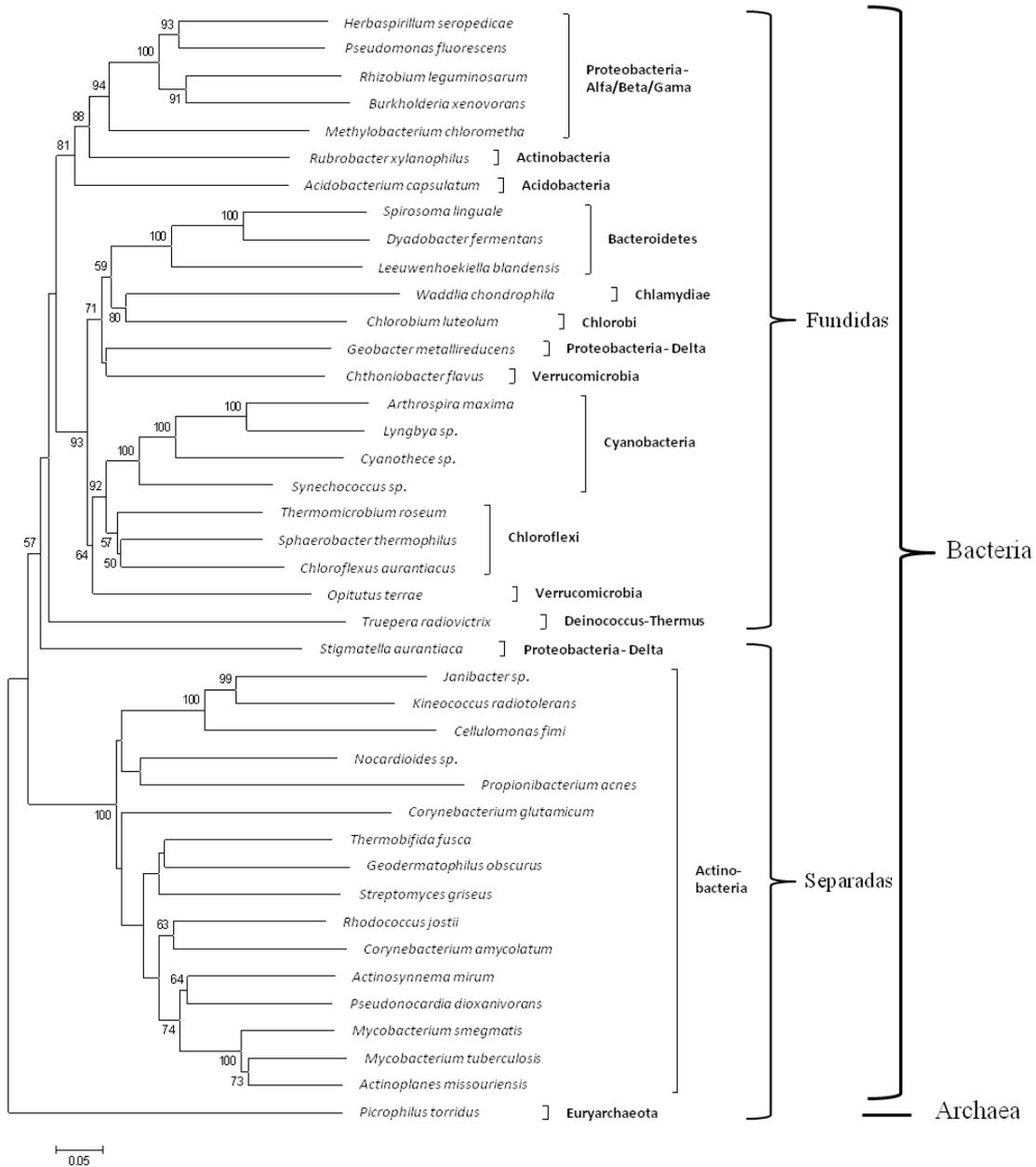


Figura 1: Árvore filogenética com seqüências das Maks, TreSs e TreS/Maks de diferentes microrganismos representantes de todos os grupos taxonômicos em que estas enzimas estão presentes.

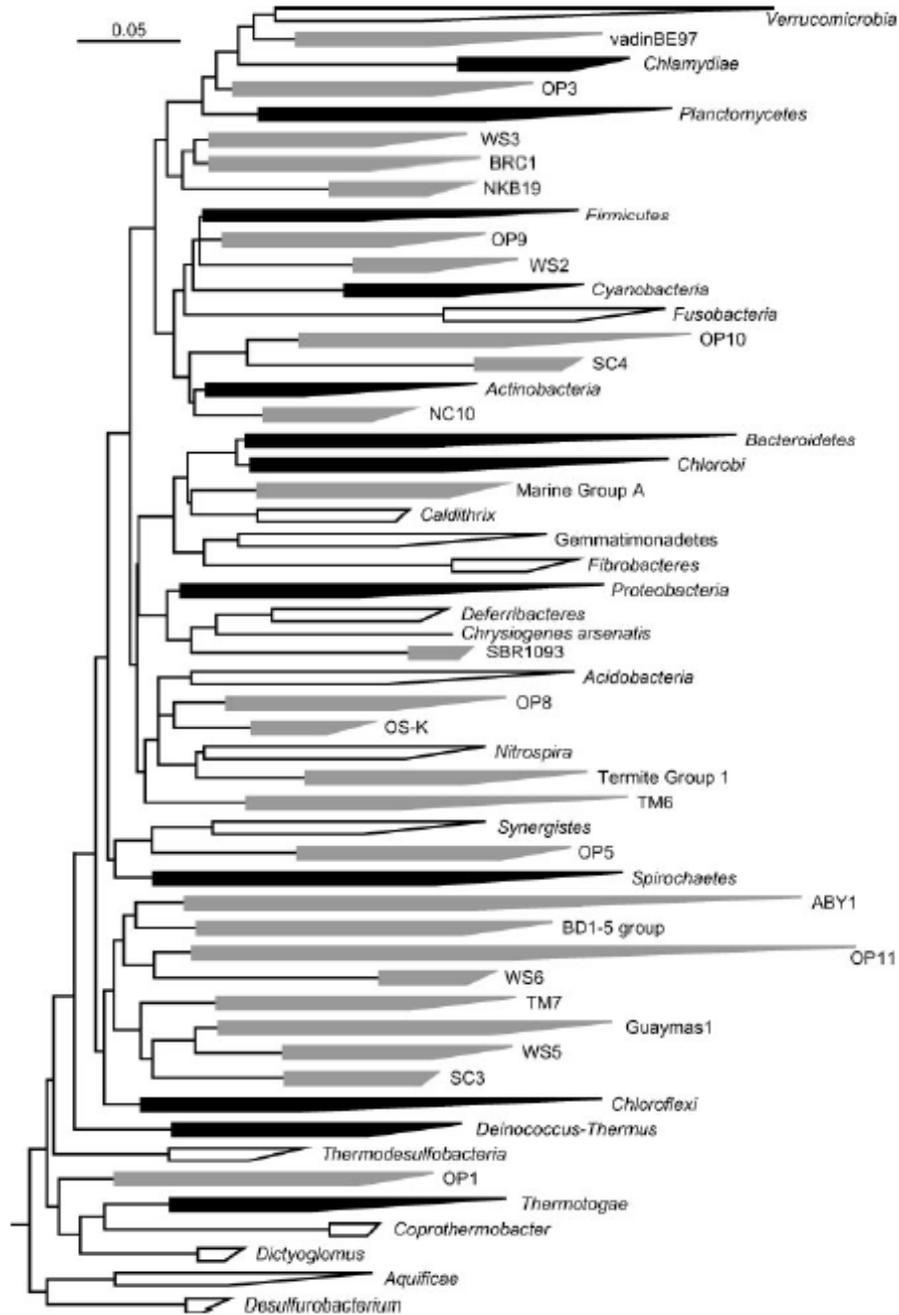


Figura 2: Árvore filogenética construída pela análise comparativa de mais de 600 seqüências do gene do RNA ribossomal 16S, ilustrando os principais grupos filogenéticos das bactérias. A preto estão representados os 12 grupos filogenéticos originais, a branco estão representados os 14 grupos filogenéticos com representantes cultivados reconhecidos desde 1987 e a cinzento estão representados os 26 grupos filogenéticos candidatos que não apresentam representantes cultivados conhecidos. Adaptado de Rappé & Giovannoni, 2003.

A partir da Figura 1, tentámos obter o máximo número de microrganismos ou o respectivo DNA genómico possível (pelo menos um microrganismo de cada grupo taxonómico formado) para procedermos ao estudo de enzimas Mak e TreS/Mak em microrganismos de diferentes grupos filogenéticos, de modo a confirmar a sua função.

3.2 Amplificação e Clonagem dos Genes *mak* e *treS/mak*

De modo a estudarmos as enzimas Mak e TreS/Mak nos diferentes grupos taxonómicos, partimos do DNA cromossómico de diferentes microrganismos para amplificar e clonar os genes *mak* e *treS/mak* em *E. coli* com o intuito de sobreexpressar as enzimas. É importante referir que, no caso dos genes *treS/mak* fundidos, também pretendíamos amplificar e clonar apenas o domínio *mak*. Os genes *mak* e *treS/mak* que foram amplificados e clonados com sucesso encontram-se na Tabela 4. Infelizmente, não foi possível amplificar e clonar todos os genes pretendidos devido a limitações temporais.

Tabela 4: Genes *mak* e *treS/mak* de diferentes microrganismos que se pretendiam amplificar e clonar, estando assinalados com um visto os genes que foram amplificados e clonados com sucesso.

Microrganismo	Gene de interesse	Gene amplificado	Gene clonado
<i>Actinosynnema mirum</i>	<i>mak</i>	✓	-
<i>Arthrospira maxima</i>	<i>mak</i>	-	-
	<i>treS/mak</i>	-	-
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>mak</i>	✓	✓
<i>Dyadobacter fermentans</i>	<i>mak</i>	✓	✓
	<i>treS/mak</i>	✓	-
<i>Geodermatophilus obscurus</i>	<i>mak</i>	✓	✓
<i>Kineococcus radiotolerans</i>	<i>mak</i>	✓	✓
<i>Opiritutus terrae</i>	<i>mak</i>	-	-
	<i>treS/mak</i>	✓	-
<i>Picrophilus torridus</i>	<i>mak</i>	✓*	✓*
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>mak</i>	✓	✓
	<i>treS/mak</i>	✓	✓
<i>Spirosoma linguale</i>	<i>mak</i>	✓	✓
	<i>treS/mak</i>	-	-
<i>Stigmatella aurantiaca</i>	<i>mak</i>	✓	✓
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	<i>mak</i>	✓	-

* O gene *mak* de *P. torridus* foi amplificado e clonado em pET30a por Vítor Carmona.

3.3 Maltocinases

3.3.1 Expressão dos genes *mak*

Após o crescimento e a lise dos clones de *E. coli* com os genes *mak* e a preparação de extractos celulares, procedemos à análise da expressão das respectivas enzimas através de SDS-PAGE. Em relação aos clones com os genes *mak* de *Kineococcus radiotolerans*, *Picrophilus torridus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Stigmatella aurantiaca*, verificámos a expressão das respectivas enzimas nas fracções solúveis dos extractos correspondentes (Figura 3). As enzimas Mak de *K. radiotolerans*, *P. torridus* e *S. aurantiaca* e o domínio Mak da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* apresentaram pesos moleculares de 48 kDa, 50 kDa, 48 kDa e 60 kDa, respectivamente.

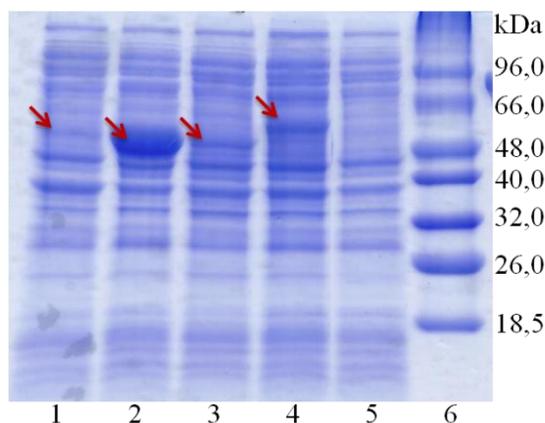


Figura 3: Gel de SDS-PAGE, ilustrando as bandas correspondentes às enzimas maltocinase de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *S. aurantiaca* e domínio Mak da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, que estão assinaladas pelas setas vermelhas. Legenda: 1 - Fracção solúvel do extracto com a Mak de *P. torridus*; 2 - Fracção solúvel do extracto com a Mak de *S. aurantiaca*; 3 - Fracção solúvel do extracto com a Mak de *K. radiotolerans*; 4 - Fracção solúvel do extracto com o domínio Mak da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*; 5 - Controlo (fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL21 com o vector pET30a vazio); 6 - Marcador de pesos moleculares.

No caso do clone com o gene *mak* de *Dyadobacter fermentans*, verificámos que ocorreu sobreexpressão da enzima correspondente no extracto total pela presença de uma banda muito intensa no gel, com um peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Contudo, esta banda não se encontra na fracção solúvel deste extracto (Figura 4), ou seja, a enzima precipitou e formou corpos de inclusão. São vários os motivos que podem levar à formação de corpos de inclusão. Por exemplo, a enzima pode não ter

adquirido a conformação correcta ou pode ser instável, uma vez que foi expressa num sistema heterólogo. Alternativamente, o gene *mak* de *D. fermentans* que foi clonado podia conter erros (sequencia não foi confirmada), e levar à expressão de uma proteína mutante que podia resultar numa conformação incorrecta e precipitação.

Relativamente aos clones com os genes *mak* de *Corynebacterium glutamicum*, *Geodermatophilus obscurus* e *Spirosoma linguale*, não observámos bandas correspondentes às enzimas Mak nos extractos totais nem nas fracções solúveis correspondentes (Figuras 4 e 5). Deste modo, não foi possível observar a expressão das enzimas Mak de *C. glutamicum*, *G. obscurus* e *S. linguale*. Por um lado, o facto de os microrganismos *C. glutamicum* e *G. obscurus* serem filogeneticamente distantes de *E. coli* poderá dificultar a expressão de genes destes microrganismos em *E. coli* devido a diferentes preferências ao nível da utilização de codões. Por outro lado, o gene *mak* de *S. linguale* que foi clonado corresponde apenas ao segmento *mak* de um gene fundido *treS/mak*, o que poderá ter consequências ao nível da expressão. Em última instância, os genes *mak* destes três microrganismos podiam apresentar erros, impossibilitando a tradução dos mesmos em enzimas viáveis.

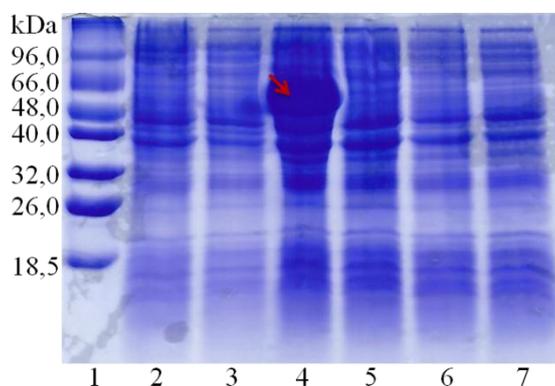


Figura 4: Gel de SDS-PAGE com extractos totais e fracções solúveis dos clones com os genes *mak* de *S. linguale* e *D. fermentans*. A banda correspondente à enzima Mak de *D. fermentans* está assinalada pela seta vermelha. Legenda: 1 - Marcador de pesos moleculares; 2 - Extracto total do clone com o gene *mak* de *S. linguale*; 3 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *S. linguale*; 4 - Extracto total do clone com o gene *mak* de *D. fermentans*; 5 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *D. fermentans*; 6 - Controlo (extracto total de *E. coli* BL21 com o vector pET30a vazio); 7 - Controlo (fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL21 com o vector pET30a vazio).

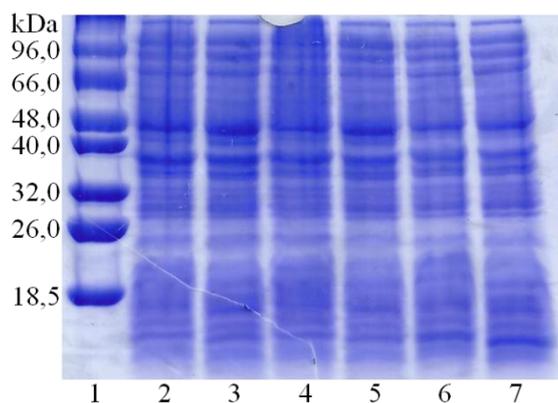


Figura 5: Gel de SDS-PAGE com extractos totais e fracções solúveis dos clones com os genes *mak* de *C. glutamicum* e *G. obscurus*. Legenda: 1 - Marcador de pesos moleculares; 2 - Extracto total do clone com o gene *mak* de *C. glutamicum*; 3 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *C. glutamicum*; 4 - Extracto total do clone com o gene *mak* de *G. obscurus*; 5 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *G. obscurus*; 6 - Controlo (extracto total de *E. coli* BL21 com o vector pET30a vazio); 7 - Controlo (fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL21 com o vector pET30a vazio).

3.3.2 Actividade das Maks

Seguidamente, foram realizados ensaios enzimáticos com as fracções solúveis dos extractos celulares com o objectivo de averiguar se as enzimas Mak efectuavam a reacção esperada, ou seja, a produção de maltose-1-fosfato e ADP a partir de maltose e ATP. As enzimas Mak de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *S. aurantiaca* e o domínio Mak da TreS/Mak de *P. fluorescens* apresentaram a actividade esperada, uma vez que sintetizaram maltose-1-fosfato e ADP a partir de maltose e ATP (Figuras 6 e 7).

Apesar de não ter sido possível observar a expressão das enzimas Mak de *C. glutamicum*, *G. obscurus* e *S. linguale*, foram também realizados ensaios enzimáticos com as fracções solúveis dos extractos correspondentes. Tal como esperado, não verificámos a produção de maltose-1-fosfato nestes ensaios (Figuras 6 e 7).

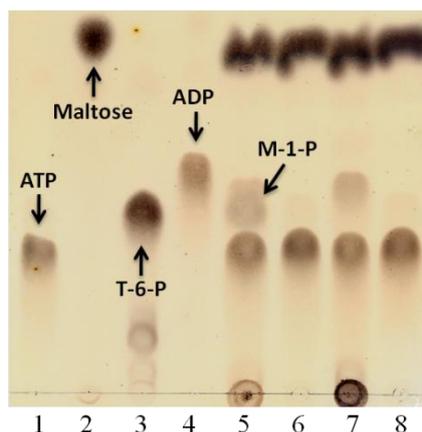


Figura 6: Produtos de reacções visualizados por TLC para o teste da actividade das enzimas Mak de *P. torridus* e *C. glutamicum*, como descrito anteriormente em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Padrões: 1 - ATP; 2 - Maltose; 3 - Trealose-6-fosfato; 4 - ADP. Reacções: 5 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *P. torridus*; 6 - Controlo; 7 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *C. glutamicum*; 8 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram em tudo excepto a fracção solúvel do extracto.

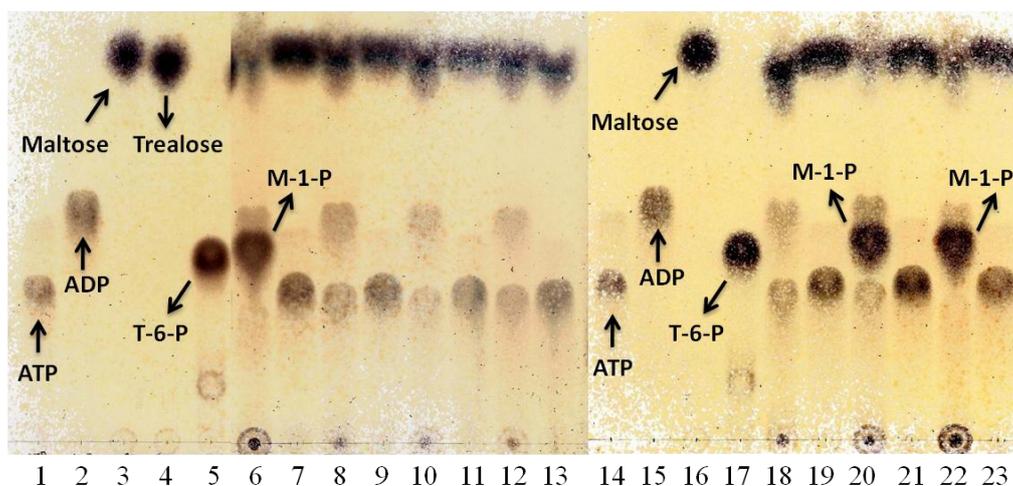


Figura 7: Produtos de reacções visualizados por TLC para o teste da actividade das enzimas Mak de *P. fluorescens*, *C. glutamicum*, *G. obscurus*, *S. linguale*, *D. fermentans*, *K. radiotolerans* e *S. aurantiaca*, como descrito anteriormente em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose; 5 - Trealose-6-fosfato. Reacções: 6 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *P. fluorescens*; 7 - Controlo; 8 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *C. glutamicum*; 9 - Controlo; 10 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *G. obscurus*; 11 - Controlo; 12 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *S. linguale*; 13 - Controlo. Padrões: 14 - ATP; 15 - ADP; 16 - Maltose; 17 - Trealose-6-fosfato. Reacções: 18 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *D. fermentans*; 19 - Controlo; 20 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *K. radiotolerans*; 21 - Controlo; 22 - Fracção solúvel do extracto do clone com o gene *mak* de *S. aurantiaca*; 23 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram em tudo excepto a fracção solúvel do extracto.

3.3.3 Especificidade de substratos das Maks

Posteriormente, foram realizadas reacções com diferentes dadores e aceitadores de grupos fosfato de modo a determinar a especificidade de substratos das diferentes enzimas Mak que apresentaram a actividade esperada. As enzimas aminoglicosídeo fosfotransferases fosforilam antibióticos aminoglicosídeos, conferindo resistência aos mesmos nos organismos que as contêm. Como as enzimas Mak e as aminoglicosídeo fosfotransferases partilham identidade de aminoácidos significativa (Mendes *et al.*, 2010), foi também testada a actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase destas enzimas através de reacções com diferentes antibióticos aminoglicosídeos, de modo a verificarmos se as enzimas Mak conferem resistência a estas moléculas.

3.3.3.1 Mak de *K. radiotolerans*

Para além de utilizar ATP como dador de grupos fosfato, a enzima Mak de *K. radiotolerans* também utilizou GTP e UTP com eficiência para a síntese de maltose-1-fosfato (Figura 9). Verificámos ainda actividade residual para os aceitadores de grupos fosfato maltotriose e maltotetraose (Figuras 8 e 9). Aparentemente, esta enzima não utiliza os restantes aceitadores de grupos fosfato testados (Figura 8, 9 e 10). Não foi detectada actividade nas reacções com os antibióticos aminoglicosídeos gentamicina, canamicina, higromicina B e estreptomicina (Figura 11), sendo pouco provável que esta enzima confira resistência a estas moléculas de forma semelhante ao que acontece com outras Maks já caracterizadas (Mendes *et al.* 2010; Jarling *et al.* 2004).

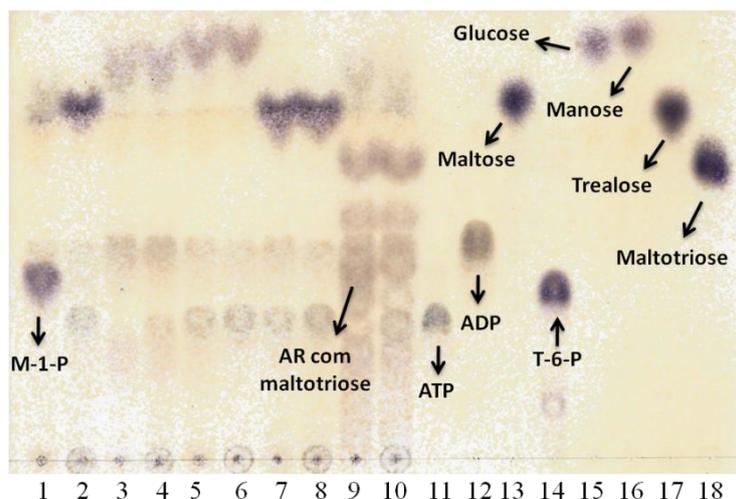


Figura 8: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *K. radiotolerans*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato; AR - Actividade residual. Reacções: 1 - Maltose e ATP; 2 - Controlo; 3 - Glucose e ATP; 4 - Controlo; 5 - Manose e ATP; 6 - Controlo; 7 - Trealose e ATP; 8 - Controlo; 9 - Maltotriose e ATP; 10 - Controlo. Padrões: 11 - ATP; 12 - ADP; 13 - Maltose; 14 - Trealose-6-fosfato; 15 - Glucose; 16 - Manose; 17 - Trealose; 18 - Maltotriose. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

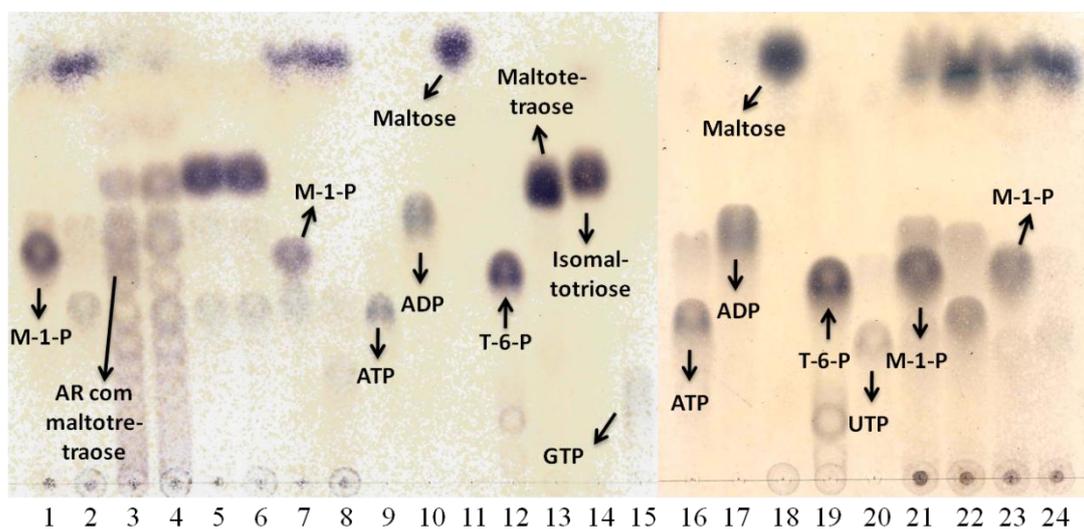


Figura 9: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *K. radiotolerans*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato; AR - Actividade residual. Reacções: 1 - Maltose e ATP; 2 - Controlo; 3 - Maltotetraose e ATP; 4 - Controlo; 5 - Isomaltotriose e ATP; 6 - Controlo; 7 - Maltose e GTP; 8 - Controlo. Padrões: 9 - ATP; 10 - ADP; 11 - Maltose; 12 - Trealose-6-fosfato; 13 - Maltotetraose; 14 - Isomaltotriose; 15 - GTP; 16 - ATP; 17 - ADP; 18 - Maltose; 19 - Trealose-6-fosfato; 20 - UTP. Reacções: 21 - Maltose e ATP; 22 - Controlo; 23 - Maltose e UTP; 24 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

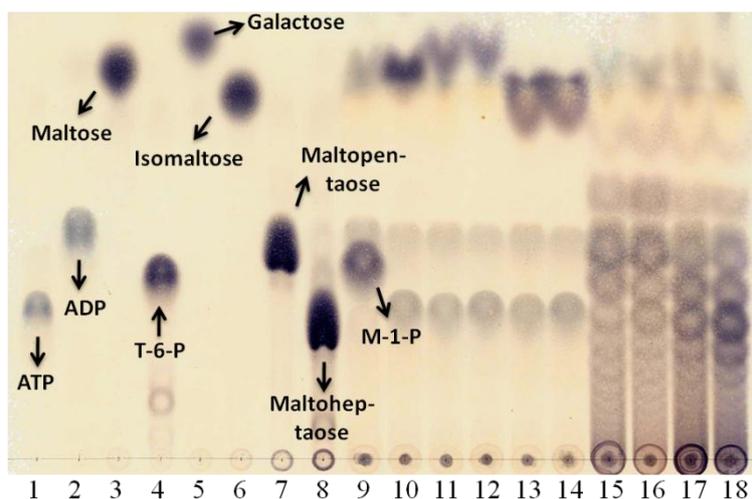


Figura 10: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *K. radiotolerans*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose-6-fosfato; 5 - Galactose; 6 - Isomaltose; 7 - Maltopentaose; 8 - Maltoheptaose. Reacções: 9 - Maltose e ATP; 10 - Controlo; 11 - Galactose e ATP; 12 - Controlo; 13 - Isomaltose e ATP; 14 - Controlo; 15 - Maltopentaose e ATP; 16 - Controlo; 17 - Maltoheptaose e ATP; 18 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

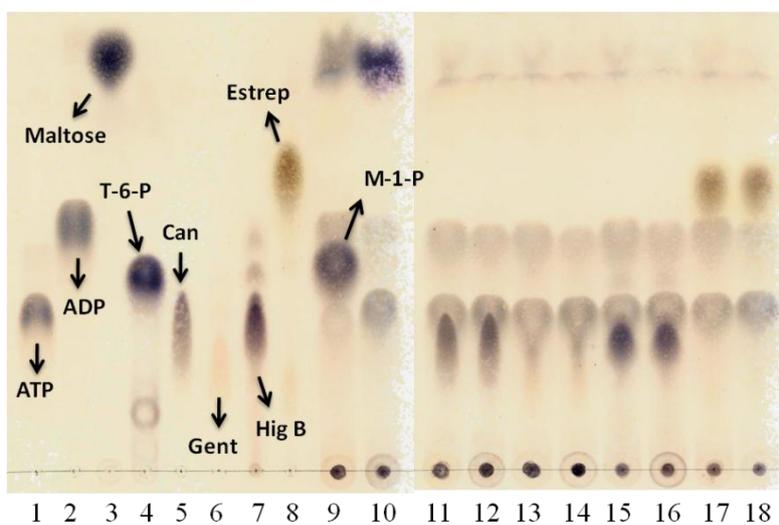


Figura 11: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *K. radiotolerans*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato; Can - Canamicina; Gent - Gentamicina; Hig B - Higromicina B; Estrep - Estreptomicina. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose-6-fosfato; 5 - Canamicina; 6 - Gentamicina; 7 - Higromicina B; 8 - Estreptomicina. Reacções: 9 - Maltose e ATP; 10 - Controlo; 11 - Canamicina e ATP; 12 - Controlo; 13 - Gentamicina e ATP; 14 - Controlo; 15 - Higromicina B e ATP; 16 - Controlo; 17 - Estreptomicina e ATP; 18 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

3.3.3.2 Mak de *P. torridus*

A enzima Mak de *P. torridus* também utilizou GTP e UTP como dadores de grupos fosfato para a produção de maltose-1-fosfato (Figura 13). Para além da maltose, esta enzima não parece utilizar outros aceitadores de grupos fosfato testados (Figuras 12, 13 e 14). Em relação às reacções com os antibióticos aminoglicosídeos gentamicina, canamicina, higromicina B e estreptomicina, não detectámos actividade (Figura 15) e provavelmente esta enzima não apresenta actividade para qualquer aminoglicosídeo, tal como outras Maks já caracterizadas (Mendes *et al.* 2010; Jarling *et al.* 2004).

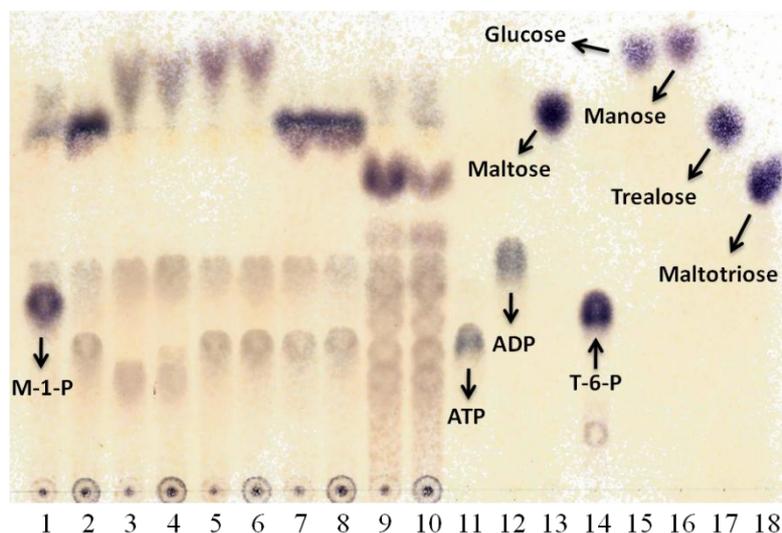


Figura 12: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *P.torridus*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Reacções: 1 - Maltose e ATP; 2 - Controlo; 3 - Glucose e ATP; 4 - Controlo; 5 - Manose e ATP; 6 - Controlo; 7 - Trealose e ATP; 8 - Controlo; 9 - Maltotriose e ATP; 10 - Controlo. Padrões: 11 - ATP; 12 - ADP; 13 - Maltose; 14 - Trealose-6-fosfato; 15 - Glucose; 16 - Manose; 17 - Trealose; 18 - Maltotriose. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

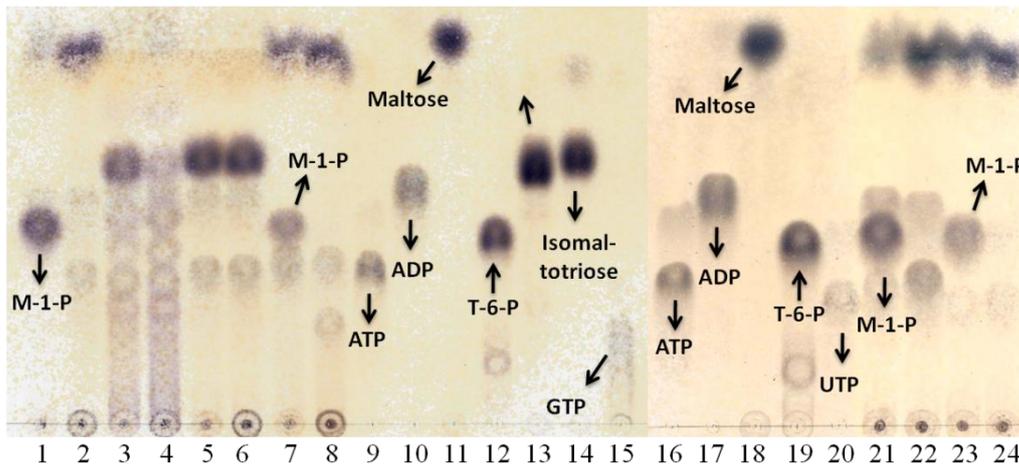


Figura 13: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *P.torridus*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Reacções: 1 - Maltose e ATP; 2 - Controlo; 3 - Maltotetraose e ATP; 4 - Controlo; 5 - Isomaltotriose e ATP; 6 - Controlo; 7 - Maltose e GTP; 8 - Controlo. Padrões: 9 - ATP; 10 - ADP; 11 - Maltose; 12 - Trealose-6-fosfato; 13 - Maltotetraose; 14 - Isomaltotriose; 15 - GTP; 16 - ATP; 17 - ADP; 18 - Maltose; 19 - Trealose-6-fosfato; 20 - UTP. Reacções: 21 - Maltose e ATP; 22 - Controlo; 23 - Maltose e UTP; 24 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

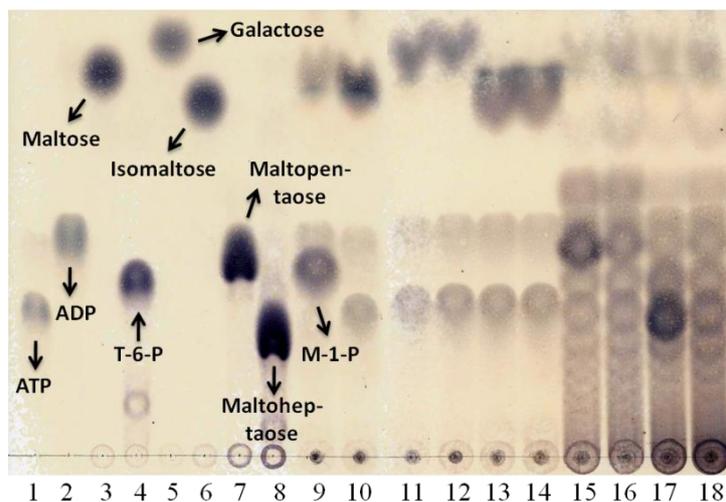


Figura 14: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *P.torridus*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose-6-fosfato; 5 - Galactose; 6 - Isomaltose; 7 - Maltopentaose; 8 - Maltoheptaose. Reacções: 9 - Maltose e ATP; 10 - Controlo; 11 - Galactose e ATP; 12 - Controlo; 13 - Isomaltose e ATP; 14 - Controlo; 15 - Maltopentaose e ATP; 16 - Controlo; 17 - Maltoheptaose e ATP; 18 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

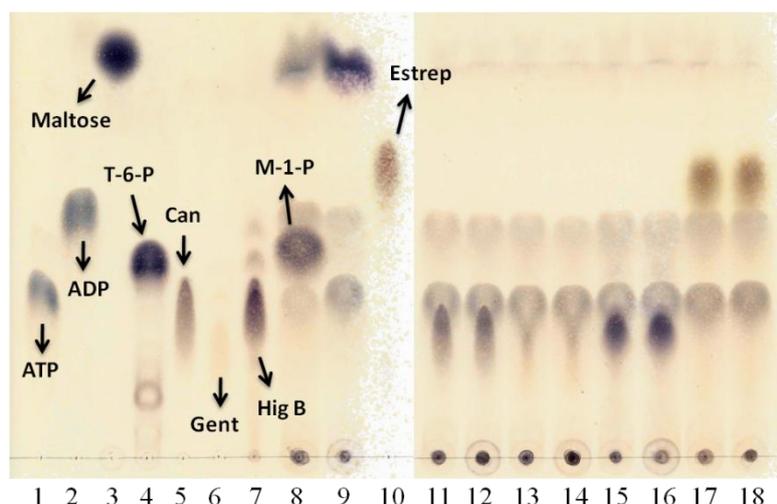


Figura 15: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *P.torridus*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato; Can - Canamicina; Gent - Gentamicina; Hig B - Higromicina B; Estrep - Estreptomicina. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose-6-fosfato; 5 - Canamicina; 6 - Gentamicina; 7 - Higromicina B; 10 - Estreptomicina. Reacções: 8 - Maltose e ATP; 9 - Controlo; 11 - Canamicina e ATP; 12 - Controlo; 13 - Gentamicina e ATP; 14 - Controlo; 15 - Higromicina B e ATP; 16 - Controlo; 17 - Estreptomicina e ATP; 18 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

3.3.3.3 Domínio Mak de *P. fluorescens*

O domínio Mak da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* utilizou eficientemente GTP e UTP como dadores de grupos fosfato, sendo gerada maltose-1-fosfato, para além de ATP (Figura 17). A utilização dos aceitadores de grupos fosfato glucose, maltotriose e maltotetraose resultou em actividade residual (Figuras 16 e 17). Aparentemente, esta enzima não utiliza os restantes aceitadores de grupos fosfato testados (Figura 16, 17 e 18). Também não detectámos actividade nas reacções com os antibióticos aminoglicosídeos gentamicina, canamicina, higromicina B e estreptomicina (Figura 19).

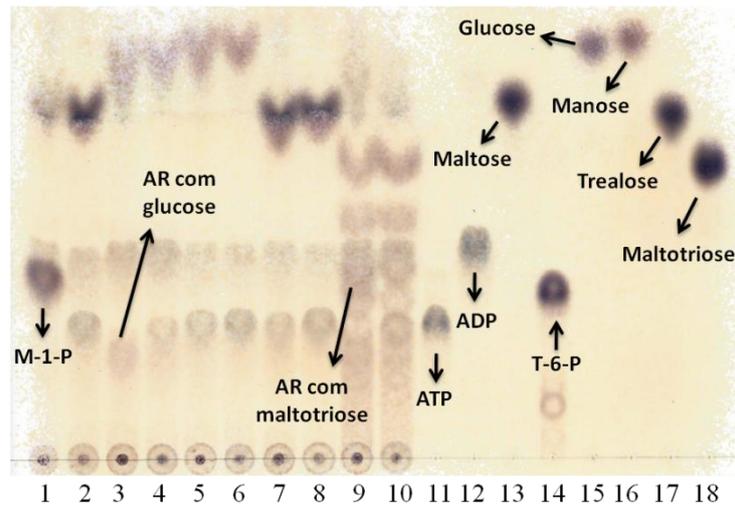


Figura 16: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos do domínio Mak da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato; AR - Actividade residual. Reacções: 1 - Maltose e ATP; 2 - Controlo; 3 - Glucose e ATP; 4 - Controlo; 5 - Manose e ATP; 6 - Controlo; 7 - Trealose e ATP; 8 - Controlo; 9 - Maltotriose e ATP; 10 - Controlo. Padrões: 11 - ATP; 12 - ADP; 13 - Maltose; 14 - Trealose-6-fosfato; 15 - Glucose; 16 - Manose; 17 - Trealose; 18 - Maltotriose. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

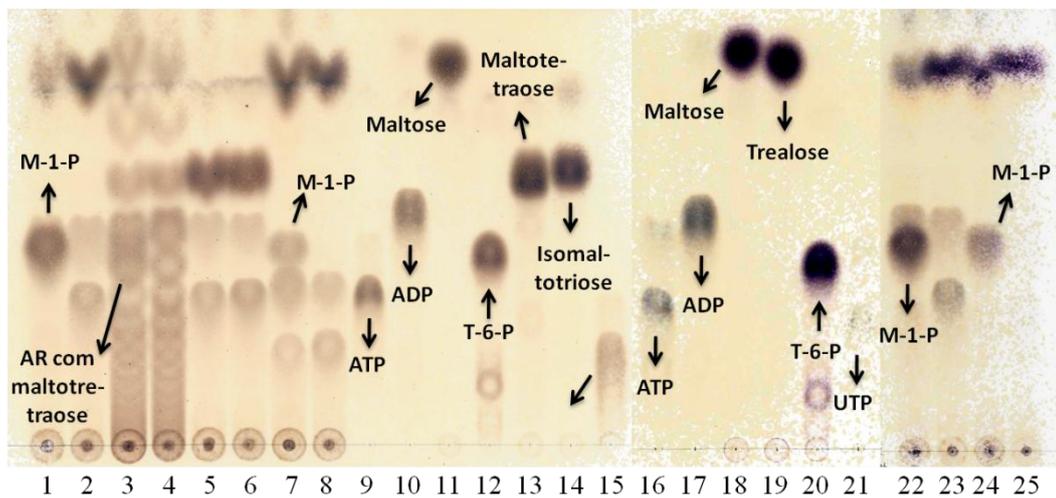


Figura 17: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos do domínio Mak da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato; AR - Actividade residual. Reacções: 1 - Maltose e ATP; 2 - Controlo; 3 - Maltotetraose e ATP; 4 - Controlo; 5 - Isomaltotriose e ATP; 6 - Controlo; 7 - Maltose e GTP; 8 - Controlo. Padrões: 9 - ATP; 10 - ADP; 11 - Maltose; 12 - Trealose-6-fosfato; 13 - Maltotetraose; 14 - Isomaltotriose; 15 - GTP; 16 - ATP; 17 - ADP; 18 - Maltose; 19 - Trealose; 20 - Trealose-6-fosfato; 21 - UTP. Reacções: 22 - Maltose e ATP; 23 - Controlo; 24 - Maltose e UTP; 25 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

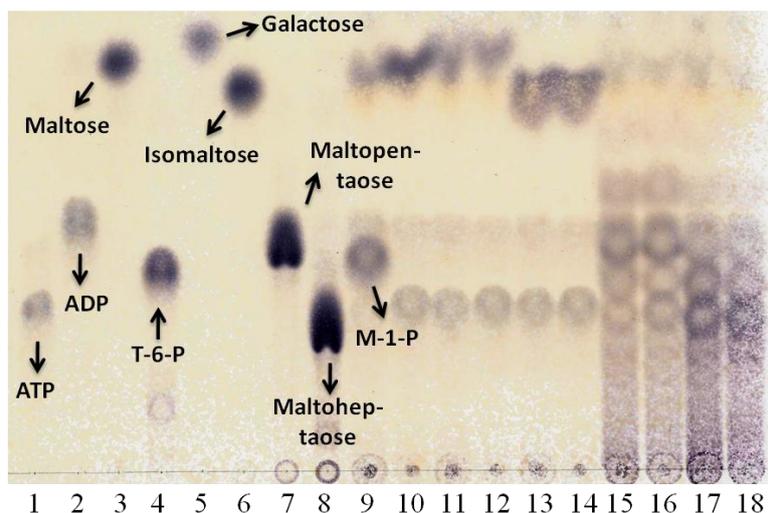


Figura 18: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos do domínio Mak da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose-6-fosfato; 5 - Galactose; 6 - Isomaltose; 7 - Maltopentaose; 8 - Maltoheptaose. Reacções: 9 - Maltose e ATP; 10 - Controlo; 11 - Galactose e ATP; 12 - Controlo; 13 - Isomaltose e ATP; 14 - Controlo; 15 - Maltopentaose e ATP; 16 - Controlo; 17 - Maltoheptaose e ATP; 18 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

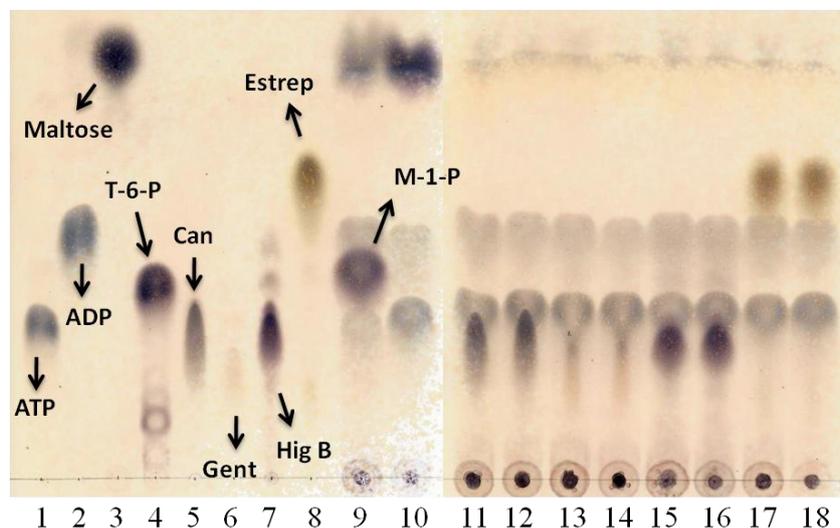


Figura 19: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos do domínio Mak da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato; Can - Canamicina; Gent - Gentamicina; Hig B - Higromicina B; Estrep - Estreptomicina. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose-6-fosfato; 5 - Canamicina; 6 - Gentamicina; 7 - Higromicina B; 8 - Estreptomicina. Reacções: 9 - Maltose e ATP; 10 - Controlo; 11 - Canamicina e ATP; 12 - Controlo; 13 - Gentamicina e ATP; 14 - Controlo; 15 - Higromicina B e ATP; 16 - Controlo; 17 - Estreptomicina e ATP; 18 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

3.3.3.4 Mak de *S. aurantiaca*

Tal como as enzimas até agora referidas, a enzima Mak de *S. aurantiaca* utilizou GTP e UTP como dadores de grupos fosfato, sendo sintetizada maltose-1-fosfato, para além de ATP (Figura 21). Esta enzima não parece utilizar os aceitadores de grupos fosfato testados (Figuras 20, 21 e 22), para além de maltose. Relativamente às reacções com os antibióticos aminoglicosídeos gentamicina, canamicina, higromicina B e estreptomicina, não foi detectada actividade (Figura 23), tal como nas enzimas anteriores.

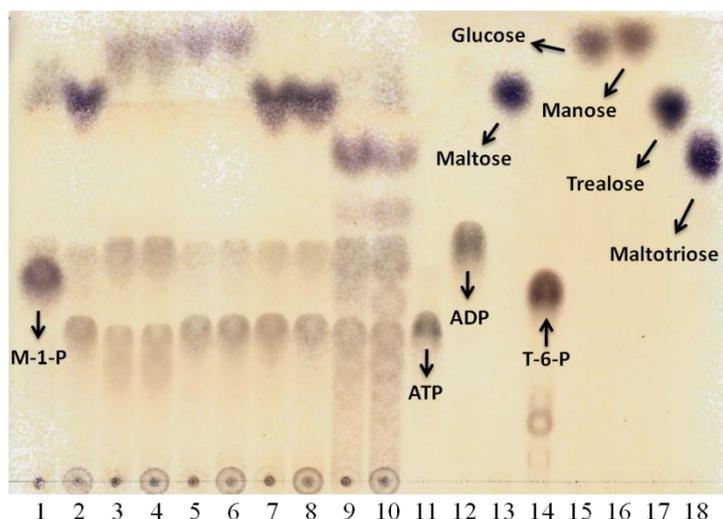


Figura 20: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *S. aurantiaca*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Reacções: 1 - Maltose e ATP; 2 - Controlo; 3 - Glucose e ATP; 4 - Controlo; 5 - Manose e ATP; 6 - Controlo; 7 - Trealose e ATP; 8 - Controlo; 9 - Maltotriose e ATP; 10 - Controlo. Padrões: 11 - ATP; 12 - ADP; 13 - Maltose; 14 - Trealose-6-fosfato; 15 - Glucose; 16 - Manose; 17 - Trealose; 18 - Maltotriose. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

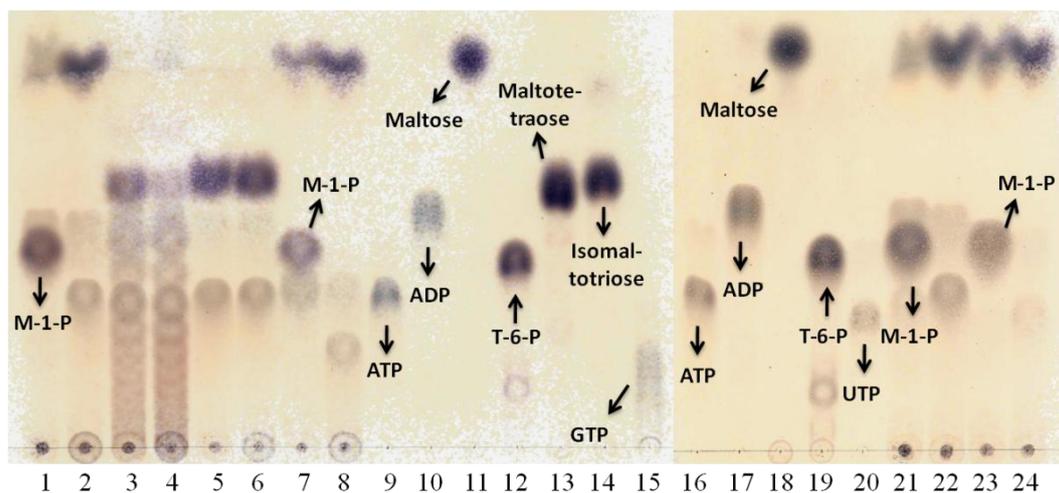


Figura 21: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *S. aurantiaca*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Reacções: 1 - Maltose e ATP; 2 - Controlo; 3 - Maltotetraose e ATP; 4 - Controlo; 5 - Isomaltotriose e ATP; 6 - Controlo; 7 - Maltose e GTP; 8 - Controlo. Padrões: 9 - ATP; 10 - ADP; 11 - Maltose; 12 - Trealose-6-fosfato; 13 - Maltotetraose; 14 - Isomaltotriose; 15 - GTP; 16 - ATP; 17 - ADP; 18 - Maltose; 19 - Trealose-6-fosfato; 20 - UTP. Reacções: 21 - Maltose e ATP; 22 - Controlo; 23 - Maltose e UTP; 24 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

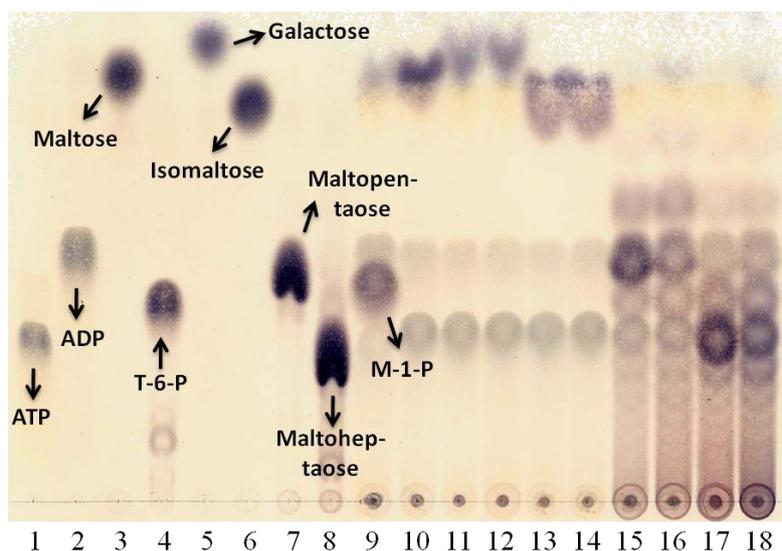


Figura 22: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *S. aurantiaca*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose-6-fosfato; 5 - Galactose; 6 - Isomaltose; 7 - Maltopentaose; 8 - Maltoheptaose. Reacções: 9 - Maltose e ATP; 10 - Controlo; 11 - Galactose e ATP; 12 - Controlo; 13 - Isomaltose e ATP; 14 - Controlo; 15 - Maltopentaose e ATP; 16 - Controlo; 17 - Maltoheptaose e ATP; 18 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

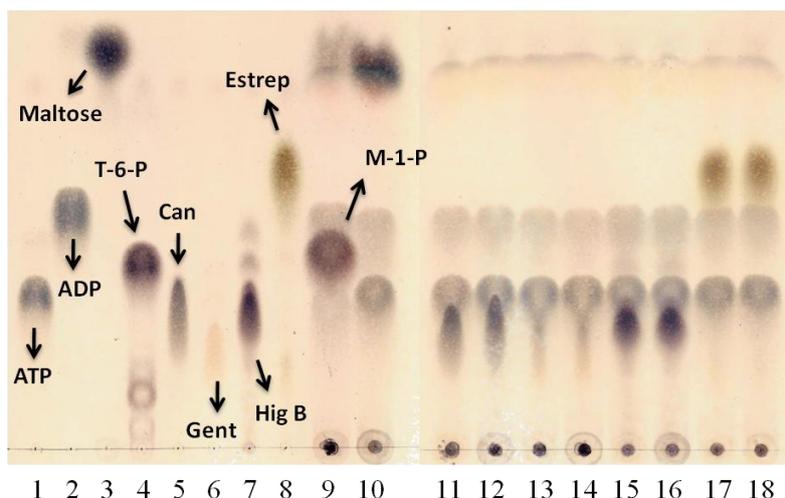


Figura 23: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima Mak de *S. aurantiaca*, como descrito em Materiais e Métodos. M-1-P - Maltose-1-fosfato; T-6-P - Trealose-6-fosfato; Can - Canamicina; Gent - Gentamicina; Hig B - Higromicina B; Estrep - Estreptomicina. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose-6-fosfato; 5 - Canamicina; 6 - Gentamicina; 7 - Higromicina B; 8 - Estreptomicina. Reacções: 9 - Maltose e ATP; 10 - Controlo; 11 - Canamicina e ATP; 12 - Controlo; 13 - Gentamicina e ATP; 14 - Controlo; 15 - Higromicina B e ATP; 16 - Controlo; 17 - Estreptomicina e ATP; 18 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

Os resultados obtidos em relação à especificidade de substratos das enzimas Mak de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *P. fluorescens* e *S. aurantiaca* encontram-se resumidos na Tabela 5.

As enzimas Mak de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *P. fluorescens* e *S. aurantiaca* apenas utilizaram eficientemente a maltose como aceitador de grupos fosfato, o que também foi constatado para as enzimas Mak de *A. missouriensis*, *S. coelicolor* e *M. bovis* BCG (Niehues *et al.*, 2003; Jarling *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2010). Foi ainda detectada actividade residual com maltotriose e maltotetraose para a enzima Mak de *K. radiotolerans*, e com glucose, maltotriose e maltotetraose para a enzima Mak de *P. fluorescens*. Na caracterização da enzima Mak de *M. bovis* BCG também foi verificada actividade residual com maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoheptaose, não tendo sido excluída a hipótese de ter ocorrido contaminação com maltose (Mendes *et al.*, 2010). No entanto, desconhecemos a razão da utilização de glucose de forma residual pela enzima Mak de *P. fluorescens*, já que este resultado não foi constatado para outras enzimas Mak até ao momento.

Em relação aos dadores de fosfato, averiguámos que as enzimas Mak de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *P. fluorescens* e *S. aurantiaca* tinham a capacidade de utilizar ATP, GTP e UTP com eficiência na produção de maltose-1-fosfato, como se observou para a Mak de *M. bovis* BCG (Mendes *et al.*, 2010), e ao contrário das enzimas Mak de *A. missouriensis* e *S. coelicolor* (Niehues *et al.*, 2003; Jarling *et al.*, 2004). Esta flexibilidade ao nível do aceitador de fosfato pode sugerir uma necessidade de maltose-1-fosfato por parte destes microrganismos. Além disso, não foi detectada actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase por parte das enzimas Mak de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *P. fluorescens* e *S. aurantiaca*, o que está de acordo com os resultados obtidos para as enzimas Mak de *S. coelicolor* e *M. bovis* BCG (Jarling *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2010). Portanto, muitas aminoglicosídeo fosfotransferases putativas com significativa similaridade de sequência relativamente a maltocinases encontram-se provavelmente anotadas de forma incorrecta e podem alternativamente desempenhar actividade de maltocinase.

Infelizmente, não foi possível realizar um estudo mais detalhado relativamente às propriedades destas enzimas como inicialmente se pretendia devido a limitações a nível de tempo. Contudo, podemos concluir que as enzimas Mak de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *P. fluorescens* e *S. aurantiaca* apresentam actividade de maltocinase *in vitro*, uma vez que verificámos a produção de maltose-1-fosfato e ADP a partir de maltose e ATP (GTP e UTP) por cada uma delas.

Tabela 5: Resumo da determinação da especificidade de substratos das maltocinases de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *P. fluorescens* e *S. aurantiaca*. Os substratos (aceitadores e dadores de grupos fosfato) utilizados pelas enzimas encontram-se assinalados com um visto.

Substrato	Utilização pela Mak de <i>K. radiotolerans</i>	Utilização pela Mak de <i>P. torridus</i>	Utilização pela Mak de <i>P. fluorescens</i>	Utilização pela Mak de <i>S. aurantiaca</i>
Glucose	-	-	AR	-
Galactose	-	-	-	-
Manose	-	-	-	-
Maltose	✓	✓	✓	✓
Isomaltose	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-
Maltotriose	AR	-	AR	-
Isomaltotriose	-	-	-	-
Maltotetraose	AR	-	AR	-
Maltopentaose	-	-	-	-
Maltoheptaose	-	-	-	-
ATP	✓	✓	✓	✓
GTP	✓	✓	✓	✓
UTP	✓	✓	✓	✓
Gentamicina	-	-	-	-
Canamicina	-	-	-	-
Estreptomicina	-	-	-	-
Higromicina B	-	-	-	-

AR - Actividade residual

3.4 Trealose sintases/Maltocinases

3.4.1 Expressão do gene *treS/mak* de *Pseudomonas fluorescens*

O gene de fusão *treS/mak* de *P. fluorescens* foi clonado e expresso com sucesso em *E. coli*. Após o crescimento e a lise do respectivo clone e a preparação de extractos celulares, analisámos a expressão da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* através de SDS-PAGE. Observámos na fracção solúvel do extracto, uma banda com aproximadamente 120 kDa (Figura 24), que corresponde à massa esperada para o monómero desta enzima. Portanto, a enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* foi expressa com sucesso.

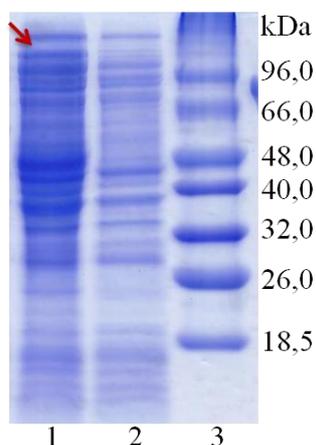


Figura 24: Gel de SDS-PAGE, ilustrando a banda correspondente à enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, que está assinalada pela seta vermelha. Legenda: 1 - Fracção solúvel do extracto com a TreS/Mak de *P. fluorescens*; 2 - Controlo (fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL21 com o vector pET30a vazio); 3 - Marcador de pesos moleculares.

3.4.2 Actividade da TreS/Mak de *P. fluorescens*

Posteriormente, foram efectuados ensaios enzimáticos com a fracção solúvel do extracto celular com o intuito de verificar se a enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* realizava a reacção esperada, isto é, a síntese de maltose-1-fosfato directamente a partir de trealose (na presença de ATP ou outro dador de fosfato). Apesar de já se ter detectado a formação de maltose-1-fosfato pelo domínio Mak desta enzima, realizámos

novamente ensaios enzimáticos com a forma bifuncional para testar esta actividade e verificar se a função Mak se mantinha presente.

Os resultados destes ensaios foram totalmente inesperados porque não foi possível observar síntese de maltose-1-fosfato pela enzima bifuncional a partir de trealose e ATP nem a partir de maltose e ATP (que já tinha sido verificada no domínio Mak expresso anteriormente), apesar de terem sido testadas diferentes concentrações de maltose e trealose e diferentes períodos de tempo. Nas TLCs com os ensaios com trealose e ATP, verificámos a formação de um *spot* novo (Figura 25) que se localiza abaixo do *spot* correspondente ao ATP e que não corresponde a nenhum dos padrões utilizados, tratando-se de um composto novo. Nestas reacções o ATP é completamente consumido. Para além deste *spot*, nos ensaios com trealose e ATP observámos ainda a formação de um outro *spot*, que se localiza acima da maltose e que também não corresponde a nenhum dos padrões utilizados, tendo sido confirmado que se trata de glucose. Na Figura 25 encontra-se um exemplo destas TLCs. Nas TLCs com os ensaios com maltose e ATP também verificámos o surgimento do mesmo *spot*, que corresponde ao composto não identificado, e o outro *spot* correspondente à glucose, sendo este último menos intenso relativamente a ensaios com trealose e ATP. Na Figura 25 encontra-se um exemplo destas TLCs.

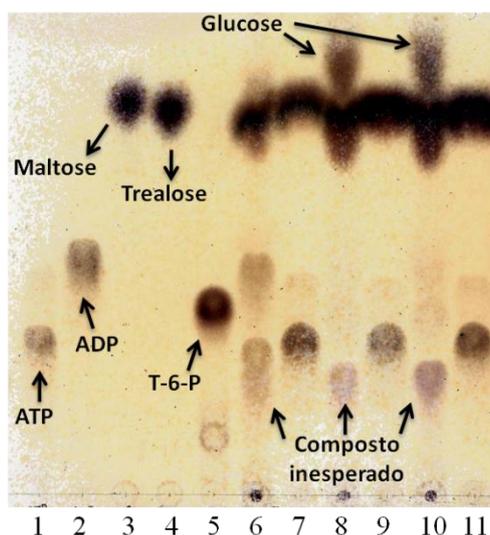


Figura 25: Produtos de reacções visualizados por TLC para o teste da actividade da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, como descrito em Materiais e Métodos. T-6-P - Trealose-6-fosfato. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose; 5 - Trealose-6-fosfato. Reacções: 6 - Maltose (3 mM) e ATP (10 min); 7 - Controlo; 8 - Trealose (5 mM) e ATP (20 min); 9 - Controlo; 10 - Trealose (7,5 mM) e ATP (20 min); 11 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram em tudo excepto a fracção solúvel do extracto.

A produção de glucose nos ensaios realizados com a enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* pode ser explicada pelo facto de que algumas enzimas TreS hidrolisam trehalose a glucose ao interconverterem maltose e trealose, nomeadamente a TreS de *M. smegmatis* e *A. aureescens* (Pan *et al.*, 2004; Xiuli *et al.*, 2009). Inclusivamente, a TreS de *T. fusca* produziu glucose em elevada proporção com o aumento da temperatura de 25°C para 37°C (Wei *et al.*, 2004).

Os resultados dos ensaios com maltose e ATP não estão de acordo com a literatura, uma vez que Jarling *et al.* (2004) verificaram a formação de maltose-1-fosfato a partir de maltose e ATP em extractos celulares de *P. fluorescens*. Estes resultados obtidos com a enzima bifuncional de *P. fluorescens* também desafiam os resultados obtidos com o domínio isolado Mak de *P. fluorescens* expresso em *E. coli*, já que nas reacções com este domínio verificámos a produção de maltose-1-fosfato e ADP a partir de maltose e ATP. Pode ser que a enzima não se encontre na forma bifuncional *in vivo*, se for alvo de uma actividade proteolítica desconhecida. Hipoteticamente, a diminuição de actividade Mak na enzima bifuncional pode ser devido a uma alteração na conformação do domínio Mak pela presença do domínio TreS, uma perda de flexibilidade do local activo do domínio Mak ou até um bloqueio do local activo do domínio Mak pelo domínio TreS. No entanto, o método usado por Jarling e colaboradores foi mais sensível do que o método utilizado neste trabalho, dado que usaram maltose radioactiva para detectar actividade. Como tal, é possível que tenha ocorrido síntese de maltose-1-fosfato pela enzima recombinante produzida por nós, tal como observado por Jarling, mas em quantidades inferiores aquelas que o método que utilizamos permite detectar.

A expressão de TreS/Mak bifuncionais e os subsequentes testes de actividade serão uma mais valia para perceber se as nossas observações são comuns a todas estas enzimas e em que medida a produção deste composto poderá estar relacionada com um mecanismo de canalização de dissacáridos para o metabolismo energético da célula (se se verificar que o composto é semelhante ao intermediário da glicólise frutose-1,6-bifosfato). Estas questões serão analisadas em detalhe após nova expressão e purificação desta enzima bifuncional e recurso a cristalografia e biologia estrutural. Embora tenhamos recentemente obtido a estrutura tridimensional de uma Mak micobacteriana (Fraga J, Maranhã A, Mendes V, Empadinhas N, Macedo-Ribeiro S, Pereira P, unpublished), não se conhecem as estruturas de TreSs nem da TreS/Mak bifuncional.

3.4.3 Especificidade de substratos da TreS/Mak de *P. fluorescens*

Apesar da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* não apresentar a actividade esperada, foram efectuadas reacções com diferentes dadores e aceitadores de grupos fosfato com o objectivo de determinar a especificidade de substratos desta enzima. Foram ainda realizadas reacções com diferentes antibióticos aminoglicosídeos de modo a testar a actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase da enzima bifuncional.

Para além da maltose e da trealose, esta enzima bifuncional também utiliza maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoheptaose como aceitadores de grupos fosfato. Na reacção com glucose como aceitador de grupos fosfato, verificámos actividade residual. Nas TLCs com as reacções com aceitadores de grupos fosfato utilizados pela enzima, observámos a formação do *spot* que corresponde ao composto desconhecido e de glucose (Figura 26). Aparentemente, esta enzima não utiliza GTP e UTP como dadores de grupos fosfato nem utiliza galactose, manose, isomaltose e isomaltotriose como aceitadores (Figuras 26 e 27). Não foi detectada actividade nas reacções com os antibióticos aminoglicosídeos gentamicina, canamicina, higromicina B e estreptomicina (Figura 27). Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 6.

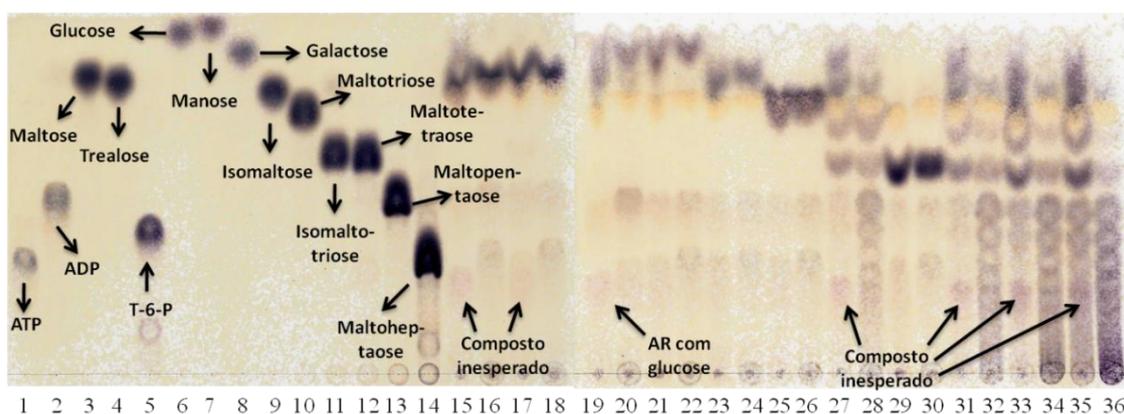


Figura 26: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, como descrito em Materiais e Métodos. T-6-P - Trealose-6-fosfato, AR - Actividade residual. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose; 5 - Trealose-6-fosfato; 6 - Glucose; 7 - Manose; 8 - Galactose; 9 - Isomaltose; 10 - Maltotriose; 11 - Isomaltotriose; 12 - Maltotetraose; 13 - Maltopentaose; 14 - Maltoheptaose. Reacções: 15 - Trealose e ATP; 16 - Controlo; 17 - Maltose e ATP; 18 - Controlo; 19 - Glucose e ATP; 20 - Controlo; 21 - Manose e ATP; 22 - Controlo; 23 - Galactose e ATP; 24 - Controlo; 25 - Isomaltose e ATP; 26 - Controlo; 27 - Maltotriose e ATP; 28 - Controlo; 29 - Isomaltotriose e ATP; 30 - Controlo; 31 - Maltotetraose e ATP; 32 - Controlo; 33 - Maltopentaose e ATP; 34 - Controlo; 35 - Maltoheptaose e ATP; 36 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

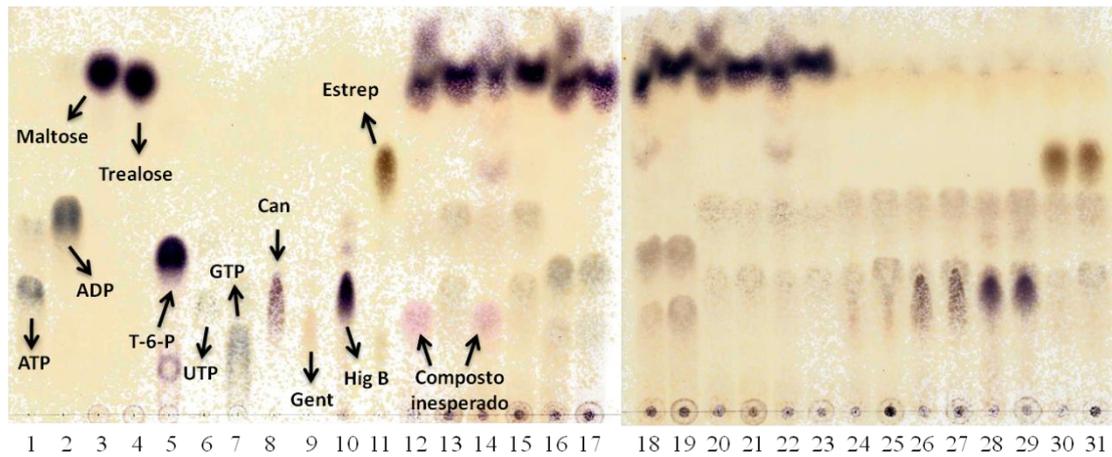


Figura 27: Produtos de reacções visualizados por TLC para determinar a especificidade de substratos da enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*, como descrito em Materiais e Métodos. T-6-P - Trealose-6-fosfato, Can - Canamicina; Gent - Gentamicina; Hig B - Higromicina B; Estrep - Estreptomicina. Padrões: 1 - ATP; 2 - ADP; 3 - Maltose; 4 - Trealose; 5 - Trealose-6-fosfato; 6 - UTP; 7 - GTP; 8 - Canamicina; 9 - Gentamicina; 10 - Higromicina B; 11 - Estreptomicina. Reacções: 12 - Trealose e ATP; 13 - Controlo; 14 - Maltose e ATP; 15 - Controlo; 16 - Trealose e GTP; 17 - Controlo; 18 - Maltose e GTP; 19 - Controlo; 20 - Trealose e UTP; 21 - Controlo; 22 - Maltose e UTP; 23 - Controlo; 24 - Gentamicina e ATP; 25 - Controlo; 26 - Canamicina e ATP; 27 - Controlo; 28 - Higromicina B e ATP; 29 - Controlo; 30 - Estreptomicina e ATP; 31 - Controlo. Controlos: referem-se à reacção anterior e consistiram na utilização da fracção solúvel do extracto de *E. coli* BL-21 com o vector pET30a vazio.

Tabela 6: Resumo da determinação da especificidade de substratos da TreS/Mak de *P. fluorescens*. Os substratos (aceitadores e dadores de grupos fosfato) utilizados pela enzima encontram-se assinalados com um visto.

Substrato	Utilização pela TreS/Mak de <i>P. fluorescens</i>
Glucose	AR
Galactose	-
Manose	-
Maltose	✓
Isomaltose	-
Trealose	✓
Maltotriose	✓
Isomaltotriose	-
Maltotetraose	✓
Maltopentaose	✓
Maltoheptaose	✓
ATP	✓
GTP	-
UTP	-
Gentamicina	-
Canamicina	-
Estreptomicina	-
Higromicina B	-

AR - Actividade residual

Desconhecemos a razão da utilização dos aceitadores glucose (em níveis residuais), maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoheptaose pela enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* e a razão da formação do composto desconhecido nas reacções correspondentes. A Mak de *M. bovis* BCG apresenta apenas actividade residual em reacções com maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoheptaose (Mendes *et al.*, 2010). Neste trabalho, a Mak de *P. fluorescens* também apresentou actividade residual com glucose, com maltotriose e maltotetraose.

Por outro lado, a TreS de *Pimelobacter* sp. R48, para além de maltose e trealose, não utiliza outros açúcares testados, nomeadamente glucose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose (Nishimoto *et al.*, 1996). No entanto, a TreS de *M. smegmatis* tem a capacidade de converter maltooligossacáridos, nomeadamente maltoheptaose, em maltose e trealose através da sua actividade de amilase (Pan *et al.*, 2008). Deste modo, não podemos excluir a possibilidade de que a TreS/Mak de *P. fluorescens* pode apresentar actividade de amilase.

3.4.4 Identificação do composto desconhecido por RMN

De modo a identificarmos o composto desconhecido sintetizado pela TreS/Mak de *P. fluorescens*, foram adquiridos espectros de ^{31}P -RMN e ^1H -RMN (Figura 28 A e B) de uma amostra do composto em análise após cromatografia preparativa para separação do mesmo dos restantes componentes da mistura reactiva.

Como podemos avaliar, esse composto possui duas ressonâncias de ^{31}P de idêntica intensidade e uma outra menos intensa. Todas as ressonâncias de ^{31}P se encontram na região típica dos fosfomonoésteres. No que diz respeito ao espectro de próton verifica-se essencialmente a presença de um multiplete (quarteto) referente a uma contaminação de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e 4 outros conjuntos de ressonâncias de intensidades relativas 2-1-2-2, sugerindo tratar-se de uma hexose. Os espectros de ^1H - e ^{31}P -RMN sugerem assim que o composto em análise será muito provavelmente uma hexose bisfosforilada sem prótons anoméricos destacados. Uma mais completa caracterização e identificação final do composto irá requerer a aquisição de espectros RMN bidimensionais tanto homonucleares (de correlação ^1H - ^1H : COSY – ‘**C**ORrelation **S**pectroscop**Y**’; NOESY – ‘**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**’) como heteronucleares (de correlação ^1H - ^{13}C e ^1H - ^{31}P ; HMQC – ‘**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**orrelation’), pelo que uma de duas estratégias são plausíveis: i) produção de uma maior quantidade de composto compatível com a aquisição destes espectros mesmo em condições de abundância natural; ii) utilização de trealose enriquecida em ^{13}C , que permitirá detecção de ^{13}C com quantidades bem mais reduzidas de composto além de possibilitar a detecção dos acoplamentos escalares ^{13}C - ^{13}C , parâmetro importante numa completa elucidação estrutural.

Após a revelação da identidade e da estrutura do composto, prosseguirmos para o seu papel metabólico, mutagénese e estrutura tridimensional por cristalografia de raios-x.

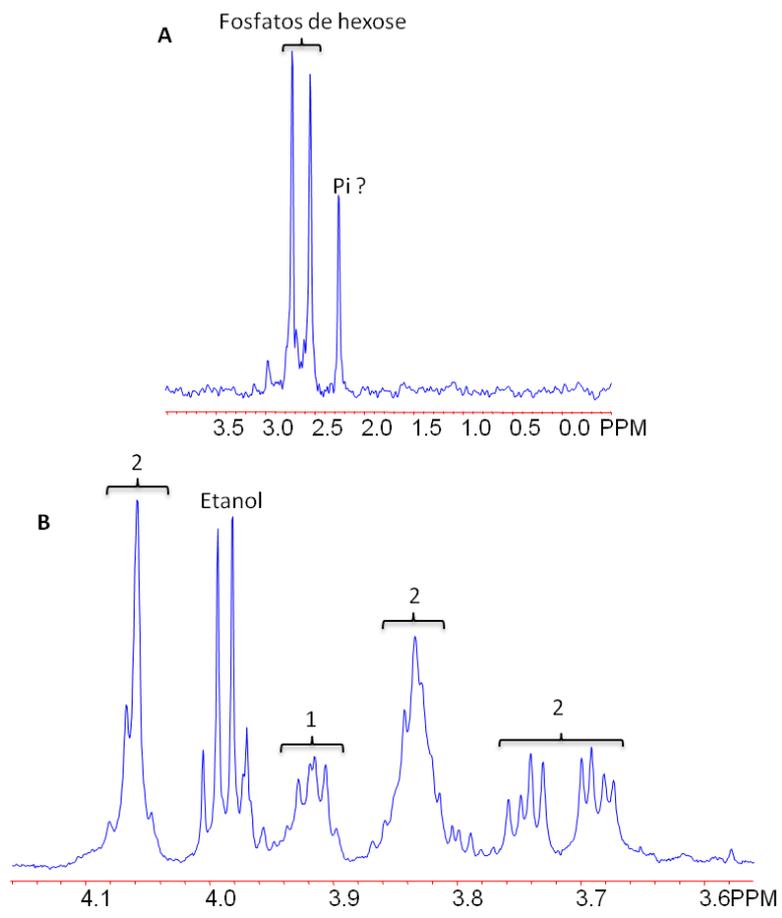


Figura 28: Espectros de RMN para identificação do composto desconhecido sintetizado pela enzima TreS/Mak de *P. fluorescens*. Legenda: A - Espectro ^{31}P -RMN da amostra; B - Espectro ^1H -RMN da amostra.

Capítulo 4: Conclusões

Este trabalho foi iniciado com a construção de árvores filogenéticas com sequências das Maks, TreSs e TreS/Maks de diferentes microrganismos, disponíveis nas bases de dados. A análise destas árvores permitiu uma percepção da distribuição destas enzimas nos diferentes grupos taxonómicos formados, bem como a selecção de enzimas Mak e TreS/Mak de microrganismos destes grupos para validação da sua função biológica prevista, sendo este o principal objectivo deste trabalho. Procedeu-se em seguida ao estudo funcional das enzimas Mak e TreS/Mak seleccionadas. Foi necessário amplificar, clonar e expressar os genes *mak* e *treS/mak* em *E. coli*, tendo sido expressas com sucesso as enzimas recombinantes Mak de *K. radiotolerans*, *P. torridus*, *S. aurantiaca*, a enzima TreS/Mak de *P. fluorescens* e também o domínio Mak desta última. Posteriormente, realizámos ensaios enzimáticos para confirmar a actividade destas enzimas, nomeadamente a especificidade para possíveis substratos e a actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase. Constatámos que as enzimas Mak apresentaram a actividade esperada, uma vez que produziram maltose-1-fosfato a partir de maltose e ATP. A maltose foi o único aceitador de grupos fosfato utilizado com eficiência por estas enzimas, enquanto que o ATP, GTP e UTP foram eficientemente utilizados como dadores de grupos fosfato. Os resultados sugerem que estas enzimas não apresentam actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase, uma vez que não foi detectada actividade pelas Maks em ensaios com antibióticos aminoglicosídeos como potenciais aceitadores de grupos fosfato. Por outro lado, a TreS/Mak de *P. fluorescens* sintetizou um composto desconhecido em vez de maltose-1-fosfato, o que não corresponde à actividade esperada. Este composto foi sintetizado a partir de maltose, trealose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoheptaose como aceitadores de grupos fosfato. Apenas o ATP foi utilizado com eficiência como dador de grupos fosfato pela enzima, mas não GTP nem UTP. Não foi detectada actividade de aminoglicosídeo fosfotransferase. Limitações a nível temporal não permitiram a realização de estudos mais detalhados em relação às propriedades destas enzimas, mas pretendemos levar a cabo esses estudos muito em breve, tanto com estas enzimas como com outras de outros organismos. A análise por RMN para identificação do composto desconhecido sintetizado pela TreS/Mak de *P. fluorescens* ainda não foi absolutamente conclusiva. Os desvios químicos apontam para que seja uma hexose bifosforilada que vai de seguida ser analisada por 2D-NMR para revelar a identidade e estrutura do composto. A partir daí será elaborada a hipótese para enquadramento deste produto no metabolismo bacteriano bem como uma caracterização minuciosa da enzima que o produz, neste

caso uma TreS/Mak bifuncional que não sintetiza maltose-1-fosfato a partir de trealose e ATP, nem a partir de maltose e ATP, como seria esperado.

Com este trabalho foi possível confirmar a actividade de várias enzimas anotadas como possíveis maltocinases *in vitro*, constituindo uma base para trabalhos futuros que explorem a função metabólica não só destas enzimas, mas como também da via que canaliza trealose para a síntese de polissacarídeos de glucose como glicogénio, α -glucano capsular ou lipopolissacarídeos de metilglucose, a partir de maltose-1-fosfato.

Capítulo 5: Bibliografía

Argüelles, JC (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* 174:217-224

Boto, L (2010). Horizontal Gene Transfer in Evolution. ELS DOI: 10.1002/9780470015902.a0022835

Carroll JD, Pastuszak I, Edavana VK, Pan YT, Elbein AD (2007). A novel trehalase from *Mycobacterium smegmatis* – purification, properties, requirements. *FEBS* 274:1701-1714

Chandra G, Chater KF, Bornemann S (2011). Unexpected and widespread connections between bacterial glycogen and trehalose metabolism. *Microbiology* 157:1565-1572

Chen YS, Lee GC, Shaw JF (2006). Gene cloning, expression, and biochemical characterization of a recombinant trehalose synthase from *Picrophilus torridus* in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem* 54(19):7098-104

De Smet KA, Weston A, Brown IN, Young DB, Robertson BD (2000). Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* 146:199-208

Drepper A, Peitzmann R, Pape H (1996). Maltokinase (ATP:maltose 1-phosphotransferase) from *Actinoplanes sp.*: demonstration of enzyme activity and characterization of the reaction product. *FEBS Lett* 388:177-179

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13(4):17R-27R

Elbein AD, Pastuszak I, Tackett AJ, Wilson T, Pan YT (2010). Last step in the conversion of trehalose to glycogen: a mycobacterial enzyme that transfers maltose from maltose 1-phosphate to glycogen. *J Biol Chem* 285(13):9803-1982

Empadinhas N, Albuquerque L, Mendes V, Macedo-Ribeiro S, da Costa MS (2008). Identification of the mycobacterial glucosyl-3-phosphoglycerate synthase. FEMS Microbiol Lett DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.01064.x

Garg SK, Alam MS, Kishan KVR, Agrawal P (2007). Expression and characterization of α -(1,4)-glucan branching enzyme Rv1326c of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Protein Express Purif 51:198-208

Jackson M, Brennan PJ (2009). Polymethylated polysaccharides from *Mycobacterium* species revisited. J Biol Chem 284(4):1949-1953

Jarling M, Cauvet T, Grundmeier M, Kuhnert K, Pape H (2004). Isolation of *makI* from *Actinoplanes missouriensis* and evidence that Pep2 from *Streptomyces coelicolor* is a maltokinase. J Basic Microbiol 44(5):360-373

Kalscheuer R, Syson K, Veeraraghavan U, Weinrick B, Biermann KE, Liu Z, Sacchettini JC, Besra G, Bornemann S, Jacobs Jr WR (2010). Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by targeting GlgE in an α -glucan pathway. Nat Chem Biol 6:376-384

Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, Brennan PJ, Jackson M (2009). Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. Advances in Appl Microbiol 69:23-78

Li WH (2008). Phylogenetics. ELS DOI: 10.1002/9780470015902.a0005135.pub2

Mendes V, Maranha A, Lamosa P, da Costa MS, Empadinhas N (2010). Biochemical characterization of the maltokinase from *Mycobacterium bovis* BCG. BMC Biochem 27:11-21

Mendes V, Maranha A, Alarico S, Empadinhas N (2012). Biosynthesis of mycobacterial methylglucose lipopolysaccharides. Nat Prod Rep 29(8):834-844

Murphy HN, Stewart GR, Mischenko VV, Apt AS, Harris R, McAlister MB, Driscoll PC, Young DB, Robertson BD (2005). The OtsAB Pathway Is Essential for Trehalose Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 280(15):14524-14529

Narumi K, Tsumita T (1967). Identification of α,α -Trehalose 6,6'-Dimannosylphosphate and α -Maltose 1-Phosphate of Mycobacteria. *J Biol Chem* 242(9): 2233-2239

Niehues B, Jossek R, Kramer U, Koch A, Jarling M, Schroder W, Pape H (2003). Isolation and characterization of maltokinase (ATP:maltose 1-phosphotransferase) from *Actinoplanes missouriensis*. *Arch Microbiol* 180:233-239

Nielsen P, Fritze D, Priest FG (1995). Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* 141:1745-1761

Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, Chaen H, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M, Tsujisaka Y (1996). Purification and Properties of a Novel Enzyme, Trehalose Synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Biosci Biotech Biochem* 60(4): 640-644

Nobre A, Alarico S, Fernandes C, Empadinhas N, da Costa MS (2008). A unique combination of genetic systems for the synthesis of trehalose in *Rubrobacter xylanophilus*: properties of a rare actinobacterial TreT. *J Bacteriol* 190(24):7939-46

Pan YT, Edavana VK, Jourdian WJ, Edmondson R, Carroll JD, Pastuszak I, Elbein AD (2004). Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*: Purification, cloning, expression, and properties of the enzyme. *Eur J Biochem* 271:4259-4269

Pan YT, Carroll JD, Asano N, Pastuszak I, Edavana VK, Elbein AD (2008). Trehalose synthase converts glycogen to trehalose. *FEBS* 275:3408-3420

Rappé MS, Giovannoni SJ (2003). The Uncultured Microbial Majority. *Annu Rev Microbiol* 57:369-394

Sambou T, Dinadayala, Stadthagen G, Barilone N, Bordat Y, Constant P, Levillain F, Neyrolles O, Gicquel B, Lemassu A, Daffé M, Jackson M (2008). Capsular glucan and intracellular glycogen of *Mycobacterium tuberculosis*: Biosynthesis and impact on the persistence in mice. *Mol Microbiol* 70(3):762-774

Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ (2003). Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 48(1):77-84

Stadthagen G, Sambou T, Guerin M, Barilone N, Boudou F, Korduláková J, Charles P, Alzari PM, Lemassu A, Daffé M, Puzo G, Gicquel B, Rivière M, Jackson M (2007). Genetic basis for the biosynthesis of methylglucose lipopolysaccharides in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 282(37):27270-27276

Sutherland, IW (2001). Polysaccharides: Bacterial and Fungal. ELS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Wei YT, Zhu QX, Luo ZF, Lu FS, Chen FZ, Wang QY, Huang K, Meng JZ, Wang R, Huang RB (2004). Cloning, Expression and Identification of a New Trehalose Synthase Gene from *Thermobifida fusca* Genome. *Acta Biochim Biophys* 36(7):477-484

Woodruff PJ, Carlson BL, Bunpote S, Pratt MR, Senaratne RH, Mougous JD, Riley LW, Williams SJ, Bertozzi CR (2004). Trehalose Is Required for Growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* 279(28):28835-28843

Xiuli W, Hongbiao D, Ming Y, Yu Q (2009) Gene cloning, expression, and characterization of a novel trehalose synthase from *Arthrobacter aureescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 83(3):477-82

Zhang R, Pan YT, He S, Lam M, Brayer GD, Elbein AD, Withers SG (2011). Mechanistic Analysis of Trehalose Synthase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* 286(41):35601-35609

Capítulo 6: Anexos

6.1 Meios de Crescimento

6.1.1 Meio Ancylobacter-Spirosoma

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Glucose	1 g	0,1%
Peptona	1 g	0,1%
Extracto de levedura	1 g	0,1%
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

O agar foi adicionado depois de se acertar o volume. O meio foi autoclavado.

Este meio foi utilizado para o crescimento do microrganismo *Spirosoma linguale* DSM 74, cuja temperatura óptima de crescimento consiste em 26°C.

6.1.2 Meio Corynebacterium Agar

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Triptona	10 g	1%
Extracto de levedura	5 g	0,5%
Glucose	5 g	0,5%
NaCl	5 g	0,5%
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

O pH foi ajustado para 7,2 a 7,4. O agar foi adicionado depois de se ajustar o pH e acertar o volume. O meio foi autoclavado.

Este meio foi utilizado para o crescimento do microrganismo *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300, cuja temperatura óptima de crescimento é 30°C.

6.1.3 Meio GYM *Streptomyces*

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Glucose	4 g	0,4%
Extracto de levedura	4 g	0,4%
Extracto de malte	10 g	1%
CaCO ₃ (para meio sólido)	2 g	0,2%
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

O pH foi ajustado para 7,2. O agar foi adicionado depois de se ajustar o pH e acertar o volume. O meio foi autoclavado.

Este meio foi utilizado para o crescimento dos microrganismos *Actinosynnema mirum* DSM 43827, *Geodermatophilus obscurus* DSM 43160 e *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736. A temperatura óptima de crescimento para todos estes microrganismos consiste em 28°C.

Para *Geodermatophilus obscurus* foi necessário adicionar 5 a 10% de glicerol (adicionaram-se 50 g de glicerol por litro de meio, ou seja, 5% de glicerol).

6.1.4 Meio Luria-Bertani (LB)

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Triptona	10 g	1%
Extracto de levedura	5 g	0,5%
NaCl	5 g	0,5%
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

O agar foi adicionado depois de se acertar o volume. O meio foi autoclavado.

Este meio foi utilizado para o crescimento dos microrganismos *Escherichia coli* estirpes DH5 α e BL-21 e *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, cujas temperaturas óptimas de crescimento são 37°C e 30°C, respectivamente.

6.1.5 Meio PTYG

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Peptona	5 g	0,5%
Triptona	5 g	0,5%
Extracto de levedura	5 g	0,5%
Glucose	10 g	1%
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,60 g	0,06%
CaCl ₂	0,06 g	0,5 mM
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

O pH foi ajustado para 7,0. O agar foi adicionado depois de se ajustar o pH e acertar o volume. O meio foi autoclavado.

Este meio foi utilizado para o crescimento do microrganismo *Kineococcus radiotolerans* DSM 14245, cuja temperatura óptima de crescimento é 30°C.

6.1.6 Meio R2A

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Extracto de levedura	0,5 g	0,05%
Peptona proteose	0,5 g	0,05%
Casaminoácidos	0,5 g	0,05%
Glucose	0,5 g	0,05%
Amido solúvel	0,5 g	0,05%
Na-piruvato	0,3 g	0,03%
K ₂ HPO ₄	0,3 g	0,03%
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05 g	0,2 mM
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

O pH foi ajustado para 7,2 com K₂HPO₄ ou KH₂PO₄ cristalino, seguindo-se o acerto do volume. Após a adição do agar, o meio foi aquecido até ferver para dissolver o agar e foi autoclavado.

Este meio foi utilizado para o crescimento do microrganismo *Dyadobacter fermentans* DSM 18053, cuja temperatura óptima de crescimento é 28°C.

6.2 Soluções para Extração de DNA Genómico

6.2.1 Tampão de Lise (Reagente GES)

Inicialmente, foram misturados 60 g de *tiocianato de guanidina*, 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 e 20 mL de água ultra-pura, tendo a mistura sido aquecida a 65°C até ficar completamente dissolvida. Após o arrefecimento da mistura, adicionou-se 1 g de sarcosina (*N-Lauroilsarcosina*) e água ultra-pura até perfazer 100 mL. Finalmente, a mistura foi esterilizada por filtração, recorrendo-se a um sistema de filtração estéril com um filtro de 0,45 µm, e foi armazenada à temperatura ambiente.

6.3 Electroforese em Gel de Agarose 1%

6.3.1 Tampão TAE 50x (Stock)

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Tris base	242 g	2 M
Ácido acético	57,1 mL	2 M
Solução aquosa de 0,5 mM EDTA pH 8	100 mL	50 mM

Procedeu-se à dissolução de Tris na solução aquosa de EDTA em simultâneo com o aquecimento da mistura. Foi adicionado ácido acético, seguindo-se o ajuste do pH para 8 com solução de NaOH a 5M.

6.3.2 Gel de Agarose 1%

Reagente	Quantidade por 100 mL	Concentração final
Agarose	1 g	1%
Tampão TAE	100 mL	1x
RedSafe™ 20000x (Intron Biotechnology)	5 µL	1x

A agarose foi dissolvida no tampão TAE 1x e esta mistura foi aquecida até ferver. A mistura foi arrefecida até deixar de libertar vapores, sendo adicionado RedSafe™ nesta fase, seguindo-se agitação ligeira para homogeneizar. Verteu-se a mistura para um suporte apropriado para o gel, foram colocados os pentes e durante 30 minutos aguardou-se que o gel polimerizasse. As amostras (com *loading buffer*) e o marcador de pesos moleculares de DNA foram aplicados no gel, tendo este sido corrido em tampão TAE 1x a 95 V durante aproximadamente 35 minutos.

6.4 Células Competentes

6.4.1 Meio SOB

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Triptona	20 g	2%
Extracto de levedura	5 g	0,5%
NaCl	0,5 g	0,05%
KCl	186 mg	2,5 mM
MgCl ₂ 2 M	2,5 mL	5 mM

O pH foi ajustado para 7,0 e a solução foi autoclavada. O MgCl₂ foi adicionado após a solução ter arrefecido.

6.4.2 Solução RF1

Reagente	Quantidade por 250 mL	Concentração final
RbCl	3,02 g	100 mM
CH ₃ CO ₂ K	0,74 g	30 mM
CaCl ₂	0,28 g	10 mM
MnCl ₂	1,58 g	50 mM
Glicerol	37,5 mL	15%

Os reagentes foram adicionados pela ordem em que se encontram na tabela para evitar a precipitação. O pH foi lentamente ajustado para exactamente 5,8 com ácido acético, também para evitar a precipitação. A solução foi esterilizada através de filtração.

6.4.3 Solução RF2

Reagente	Quantidade por 50 mL	Concentração final
MOPS	0,10 g	10 mM
RbCl	0,06 g	10 mM
CaCl ₂	0,42 g	75 mM
Glicerol	7,5 mL	15%

O pH da solução foi lentamente ajustado para 6,8 a 7,0 para evitar a precipitação. A solução foi esterilizada através de filtração.

6.4.4 Preparação de Células Competentes

As células *E. coli* (estirpe DH5 α ou BL-21) foram crescidas em meio SOB com MgCl₂ até uma D.O.₆₁₀ = 0,3-0,4 a 37°C e a 140 rpm. O volume total de suspensão de células foi separado em tubos *falcon* estéreis (10 mL de suspensão por cada *falcon*), seguindo-se incubação em gelo durante 15 minutos. Em seguida, as células foram recolhidas através de centrifugação (3000 \times g, 15 minutos, 4°C), foram suavemente ressuspendidas em 8 mL de solução RF1 e foram incubadas em gelo durante 15

minutos. As células foram centrifugadas novamente ($3000 \times g$, 15 minutos, 4°C), foram suavemente ressuspendidas em 2 mL de solução RF2 e foram incubadas mais uma vez em gelo durante 15 minutos. Finalmente, foram preparadas alíquotas de 100 μL de suspensão de células, que foram armazenadas a -80°C .

6.4.5 Solução de Sais 10x (Stock)

Reagente	Quantidade por 100 mL	Concentração final
KCl	0,18 g	240 mM
MgCl ₂	2 g	210 mM
MgSO ₄	2,46 g	200 mM
Glucose	2 g	111 mM

A solução foi esterilizada através de filtração.

6.5 Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE)

6.5.1 Tampão para as Amostras (SDS *Reducing Buffer*)

Reagente	Quantidade	Concentração final
H ₂ O	3,55 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 mL	0,06 M
Glicerol	2,5 mL	26%
SDS 10% (m/v)	2,0 mL	2,1%
Bromofenol blue 0,5% (m/v)	0,2 mL	0,01%

O tampão foi armazenado à temperatura ambiente e, antes de ser utilizado, foi necessário adicionar 5% de β -mercaptoetanol. As amostras para correr no gel foram diluídas com este tampão (diluição de pelo menos 1:2) e foram incubadas durante 5 minutos a 95°C .

6.5.2 Tampão de Corrida 10x, pH 8,3

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Tris base	30,3 g	250 mM
Glicina	144 g	1,92 M
SDS	10 g	1%

O pH deste tampão não pode ser ajustado com ácido nem com base.

6.5.3 Gel *Resolving* (12%)

Reagente	Quantidade	Concentração final
Acrilamida/bis-Acrilamida, solução 29:1 (40%) (NZYTech)	1,125 mL	12%
H ₂ O	1,63 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	0,937 mL	0,4 M
Dodecilsulfato de Sódio (SDS) 10% (m/v)	37,5 µL	0,1%
Persulfato de amónio (APS) 30% (m/v)	37,5 µL	0,3%
TEMED	5 µL	ND*

* Não determinada

O APS e o TEMED foram adicionados à mistura imediatamente antes de verter a mistura para a cassete de vidro. A mistura foi suavemente agitada para dar início à polimerização.

6.5.4 Gel *Resolving* (10%)

Reagente	Quantidade	Concentração final
Acrilamida/bis-Acrilamida, solução 29:1 (40%)	1 mL	10%
H₂O	1,9 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1 mL	0,4 M
SDS 10% (m/v)	40 µL	0,1%
APS 10% (m/v)	40 µL	0,1%
TEMED	4 µL	ND*

* Não determinada

O APS e o TEMED foram adicionados à mistura imediatamente antes de verter a mistura para a cassete de vidro. A mistura foi suavemente agitada para dar início à polimerização.

O gel *resolving* 10% foi utilizado para visualizar bandas correspondentes às enzimas TreS/Mak.

6.5.5 Gel *Stacking* (4%)

Reagente	Quantidade	Concentração final
Acrilamida/bis-Acrilamida, solução 29:1 (40%)	0,119 mL	4%
H₂O	0,806 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,313 mL	0,1 M
SDS 10% (m/v)	12,5 µL	0,1%
APS 30% (m/v)	12,5 µL	0,3%
TEMED	2,5 µL	ND*

* Não determinada

O APS e o TEMED foram adicionados à mistura imediatamente antes de verter a mistura para a cassete de vidro. A mistura foi suavemente agitada para dar início à polimerização.

6.5.6 Preparação do Gel de Poliacrilamida com SDS

Primeiro, foi necessário montar a cassette de vidro e o respectivo suporte. Em seguida, foi preparado o gel *resolving* (10% ou 12%), que foi vertido para o interior da cassette de vidro até atingir aproximadamente 1 cm abaixo do nível dos dentes do pente. Este gel foi coberto com isopropanol e aguardou-se que polimerizasse durante 30 minutos. Posteriormente, foi necessário retirar todo o isopropanol da superfície do gel *resolving* ao enxaguar com água, tendo sido também removidos os vestígios de água. Foi então preparado o gel *stacking* (4%), que foi vertido para o interior da cassette de vidro até preencher toda a cassette, foi inserido o pente e aguardou-se que o gel polimerizasse durante 30 minutos. Finalmente, o pente foi removido após a polimerização, foi montada a tina, foram aplicadas as amostras e o marcador de pesos moleculares de proteínas no gel, que foi corrido a 200 V durante aproximadamente 45 minutos.

6.5.7 Solução de Coloração

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Coomassie R-250	1 g	0,1%
Ácido acético glacial	100 mL	10% (v)
Metanol	400 mL	40% (v)

Foram adicionados 100 mL de ácido acético glacial a 500 mL de H₂O ultra-pura. Em seguida, foram adicionados 500 mL de metanol e 1 g de corante Coomassie e a mistura foi agitada para se tornar homogênea. Por fim, a mistura foi filtrada para a eliminação de partículas.

6.5.8 Solução de Descoloração

Reagente	Quantidade por litro	Concentração final
Metanol	250 mL	25% (v)
Ácido acético glacial	75 mL	7,5% (v)

Primeiro, foram adicionados 250 mL de ácido acético glacial a 675 mL de H₂O ultra-pura e só depois foram adicionados 500 mL de metanol à mistura.