

Lígia Francisca Rodrigues Costa

Licenciatura em Bioquímica



**Estudo comparativo dos proteomas extra e intracelular das
actinobactérias *Streptomyces aculeolatus* PTM-29 e PTM-129**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida, Investigadora,
REQUIMTE/CQFB – FCT/UNL
Professora Auxiliar, Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz

Co-orientadora: Doutora Susana P. Gaudêncio, Investigadora Auxiliar,
REQUIMTE, LAQV, DQ e UCIBIO, DCV-FCT/UNL

Lígia Francisca Rodrigues Costa

Licenciatura em Bioquímica

**Estudo comparativo dos proteomas extra e intracelular das
actinobactérias *Streptomyces aculeolatus* PTM-29 e PTM-129**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida, Investigadora Auxiliar, REQUIMTE, DQ – FCT/UNL. Professora Auxiliar, Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz

Co-orientadora: Doutora Susana P. Gaudêncio, Investigadora Auxiliar, REQUIMTE, LAQV, DQ e UCIBIO, DCV DQ – FCT/UNL

Estudo comparativo dos proteomas extra e intracelular das actinobactérias *Streptomyces aculeolatus* PTM-29 e PTM-129.

Copyright © Lígia Francisca Rodrigues Costa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Em primeiro lugar quero agradecer à Profª Doutora Maria Gabriela, por me ter dado a oportunidade de participar neste projeto, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e perseverança, e sobretudo pela evolução académica que me proporcionou.

Quero agradecer igualmente à Doutora Susana Gaudêncio, pelos conhecimentos partilhados pelo apoio e disponibilidade por me ter dado a oportunidade de crescer na área da investigação.

À Mestre Joana Sousa, por me ter transmitido conhecimentos fundamentais para a realização desta tese, por me ter ensinado a ter metodologia e organização no trabalho, pela disponibilidade, paciência, ajuda, preocupação e apoio durante este percurso, muito obrigado!

À Doutora Célia Silveira pelos conselhos assertivos, pela sabedoria transmitida, pela simpatia e disponibilidade, ao Tiago Monteiro e à Sara pelos momentos de descontração e boa disposição partilhados que tornaram as reuniões mais descontraídas e divertidas.

À Professora Rita Sobral pela disponibilidade e sugestões dadas ao longo deste trabalho e à Doutora Florbela Pereira pela simpatia e ajuda prestada em diversas ocasiões.

Agradeço também à Profª Doutora Ilda Sanches por ter disponibilizado o laboratório para a realização de parte do trabalho experimental.

Ao Doutor Jorge Dias e ao restante grupo de investigação da cristalografia pela disponibilização de alguns equipamentos essenciais à realização desta dissertação.

À Doutora Isabel Cunha, do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), obrigado pela realização dos ensaios anti-*macrofouling*.

À minha companheira de laboratório Ana Fernandes pela partilha de opiniões pela ajuda e apoio, momentos de boa disposição, ao restante grupo de investigação, Fredilson, Marisa e Sara, pelo companheirismo, cooperação, em especial à Sofia por estar sempre disponível para ajudar pela amizade e momentos de boa disposição que me proporcionou.

À Nicole pelos momentos de boa disposição, companheirismo, por se desdobrar para que tenhamos sempre tudo a tempo e horas!

À minha amiga de sempre e para sempre, Helena Macedo, por ser a irmã que nunca tive por me ter acompanhado ao longo de toda a minha vida, é um privilégio partilhar e conquistar todas estas etapas contigo, a ti um obrigado gigante!

Ao meu namorado João Miguel, por ser para mim um exemplo de luta e persistência pelo seu apoio fundamental ao longo desta caminhada, obrigado pela paciência, incentivo e coragem, motivação por nunca me deixar desistir de nada, esta conquista é nossa!

À minha família, por serem pilares essenciais na minha vida, à minha Mãe por representar para mim exemplo que me inspira a lutar todos os dias por um futuro melhor, aos meus avós pelo apoio incansável pelo incentivo, a todos vós um muito obrigado!

Finalmente, à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e à FEDER pelo financiamento através dos projetos n.º PTDC/QUI-QUI/119116/2010, PEst-C/EQB/LA0006/2013 e PEst-OE/BIA/UI0457/2011-CREM, bem como ao 7.º Programa Quadro da União Europeia (FP7/2007-2013) sob o acordo n.º PCOFUND-GA-2009-246542 e n.º 269138-NanoGuard.

As actinobactérias marinhas, particularmente a linhagem MAR4, um novo grupo de actinobactérias relacionadas ao género *Streptomyces*, tem se revelado uma fonte rica de isoprenóides híbridos, uma vasta família de metabolitos com um largo espectro de bioatividades. A integração de tecnologias Omics, como genómica, proteómica, transcriptómica e metabolómica, têm desempenhado um papel fundamental no acesso ao potencial de produção destes microrganismos, permitindo o entendimento das vias moleculares envolvidas na biossíntese de metabolitos.

Neste trabalho adotou-se uma abordagem proteómica diferencial, baseada em 2DE, para o estudo comparativo dos proteomas de duas estirpes de actinobactérias marinhas da linhagem MAR4 pertencentes à espécie *Streptomyces aculeolatus*. Codificadas por PTM-29 e PTM-129 estas estirpes partilham 99% de identidade com base na sequência do gene 16S rRNA. Contudo, as estirpes exibem grandes diferenças ao nível do seu metaboloma e, conseqüentemente, ao nível do seu perfil de bioatividade, sendo que a PTM-29 está envolvida na síntese de napiradiomicinas e marinonas com atividades antimicrobianas contra MRSA COL (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e VRE EF82 (*Enterococcus* resistente a vancomicina) enquanto que a PTM-129 não exibiu, até à data, qualquer tipo de bioatividade. Assim, estabeleceu-se a estirpe PTM-129, como a estirpe de referência, com o objetivo de se identificarem biomarcadores proteicos da síntese de metabolitos excretados pela estirpe PTM-29. Adicionalmente, realizou-se um estudo aos exoproteomas das referidas estirpes, utilizando a mesma abordagem, com o objetivo de se identificarem novos metabolitos bioativos, nomeadamente péptidos não ribossomais, frequentemente sintetizados por estes microrganismos. Os proteomas foram analisados num intervalo de pH 4-7, e a recolha das células das referidas estirpes, para os estudos proteómicos, foi efetuada durante a fase estacionária do crescimento, uma vez que esta potencia o metabolismo secundário e, por conseguinte, a expressão das proteínas biossintéticas.

Os proteomas totais das estirpes PTM-29 e PTM-129, apresentaram padrões de expressão semelhantes, com 203 *spots* comuns. No entanto, por outro lado, foi detetado um grande número de *spots* exclusivos de cada uma das estirpes, que representam possíveis candidatos a biomarcadores da síntese dos metabolitos encontrados no metaboloma da estirpe PTM-29. No que diz respeito aos exoproteomas, as estirpes em estudo apresentaram perfis bastante distintos, com apenas 25 *spots* comuns e um grande número de *spots* exclusivos de cada estirpe. A grande diversidade de espécies proteicas observadas ao nível dos exoproteomas constitui uma boa oportunidade de investigação para o *screening* de novos metabolitos bioativos. Neste contexto, o potencial antimicrobiano destes extratos foi testado contra duas bactérias multirresistentes a MRSA COL e VRE EF82, e resultados preliminares revelaram bioatividade das estirpes PTM-29 e PTM-129 contra MRSA, com valores de MIC de 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, respetivamente.

Palavras-chave: Proteómica diferencial, actinobactérias marinhas, metaboloma, bioatividade.

Marine actinomycetes, particularly MAR4 lineage, a new group of actinomycetes related to the *Streptomyces* genus, has proved to be a rich source of hybrid isoprenoids, a broad family of metabolites with a large bioactivity spectrum. The Omics technologies integration, such as genomics, proteomics, transcriptomics and metabolomics, have played a key role in access of potential production of these microorganisms, allowing our understanding of molecular pathways involved in the biosynthesis of metabolites.

In this work we adopted a differential proteomics approach, based on 2DE, for the comparative proteomes study of two marine *actinomycetes* strains from MAR4 lineage belonging to *Streptomyces aculeolatus* specie. Coded PTM-29 and PTM-129, these strains share a 99% of identity based on 16S rRNA sequence. However, PTM-29 and PTM-129 strains exhibit large differences concerning their metabolome level and consequently of their bioactivity profiles. PTM-29 strain is involved in napyradiomycins and marinonas synthesis with antimicrobial activities against MRSA COL and VRE EF82, while PTM-129 not show, to date, bioactivity. In this context, we establish PTM-129 as the reference strain, in order to identify the protein biomarkers of PTM-29 metabolites synthesis. Additionally, a exoproteome study of these strains was performed, using the same approach, with the goal of identifying new bioactive metabolites, including non-ribosomal peptides often synthesized by these microorganisms.

The cells were harvested during the stationary phase of growth, since this enhances the secondary metabolism and thus the biosynthetic proteins expression. The total proteome of the PTM -29 and PTM-129 strains were analyzed in a pH range 4-7. They presented similar expression patterns with 203 common spots, but in other hand, a large number of exclusive protein spots were detected, which could be potential candidates for biomarkers of metabolite synthesis observed at PTM-29 strain metabolome. With regard to exoproteomes, strains showed very different profiles, with only 25 common spots and a large number of exclusive protein spots. The great diversity of protein species found in exoproteomas provides a good opportunity of investigation for a novel bioactive metabolites screening. In this context, antimicrobial potential of this protein fractions were tested against MRSA and VRE and preliminary results showed bioactivity of PTM-29 and PTM-129 strains against MRSA with MIC values of 62.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively.

Key words: Differential proteomics, marine actinomycetes, metabolome, bioactivity.

1 Introdução	1
1.1 Actinobactérias marinhas.....	1
1.1.1 Origem e biodiversidade	2
1.1.2 Isolamento e identificação.....	3
1.1.3 Aplicações biotecnológicas	5
1.1.4 Biossíntese de metabolitos secundários	6
1.1.5 Género <i>Streptomyces</i> (MAR4)	7
1.1.5.1 Metabolitos Secundários de <i>Streptomyces aculeolatus</i> (MAR4)	8
1.2 . Proteómica	9
1.2.1 Estudos de Proteómica em actinobactérias	12
1.3 . Contextualização do trabalho e objetivos	13
2 Materiais e métodos	17
2.1 . Soluções e reagentes	17
I. Crescimentos e preparação das amostras.....	17
II. Eletroforeses	17
2.2 Equipamentos	18
2.3 . Crescimento celular	18
2.3.1 Curva de crescimento celular de <i>Streptomyces aculeolatus</i> - PTM-129	19
2.4 Lise celular e criopreservação.....	19
2.5 Preparação das amostras	20
2.5.1 Precipitação da proteína	20
I. <i>Tratamento da fração proteica intracelular</i>	20
II. <i>Tratamento da fração proteica extracelular</i>	20
2.6 Quantificação da Proteína.....	20
2.7 SDS-PAGE (1D).....	21
2.8 Eletroforese bidimensional	21
2.8.1 Obtenção dos proteomas da fração proteica intracelular.....	21
I. <i>Reidratação das strips</i>	21
II. <i>Focagem Isoelétrica (1ª Dimensão)</i>	21
III. <i>Equilíbrio das strips</i>	21
IV. <i>SDS-PAGE (2ª Dimensão)</i>	22
V. <i>Coloração dos géis</i>	22
2.8.2 Obtenção dos exoproteomas	22
I. <i>Reidratação das strips</i>	22
II. <i>Focagem Isoelétrica (1ª Dimensão)</i>	22
III. <i>Equilíbrio das strips</i>	23
IV. <i>SDS-PAGE (2ª Dimensão)</i>	23

V. Coloração dos géis	23
2.9 Análise dos géis	23
2.10 Ensaio antimicrobianos: exoproteoma	23
I. Obtenção e concentração dos extratos proteicos extracelulares	23
II. Quantificação da proteína dos extratos proteicos extracelulares	24
III. Ensaio biológicos: atividade antimicrobiana	24
3 Resultados e Discussão	29
3.1 Perfil de crescimento celular de <i>Streptomyces aculeolatus</i> - PTM-129	29
3.2 Proteómica Diferencial	30
3.2.1 Proteoma total	30
3.2.2 Exoproteoma	35
3.3 Ensaio antimicrobianos: exoproteoma	38
4 Conclusões e perspectivas futuras	45
5 Referências bibliográficas	49
6 Anexos	59
Anexo I	59
Anexo II	60

Figura 1.1. Árvore radial representativa das relações filogenéticas entre os diferentes grupos MAR...	3
Figura 1.2. Estruturas dos isoprenoides híbridos sintetizados por actinomicetas.	8
Figura 1.3. Esquema representativo do procedimento de eletroforese bidimensional acoplado à espectrometria de massa.....	10
Figura 3.1. Curva de crescimento da estirpe <i>Streptomyces aculeolatus</i> PTM-129 em meio A1.....	30
Figura 3.2. Mapa 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-129 de <i>S.aculeolatus</i> (spots diferencialmente expressos).....	31
Figura 3.3. Mapa 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-29 de <i>S.aculeolatus</i> (spots diferencialmente expressos).....	32
Figura 3.4. Mapa 2D do extrato proteico total das estirpes PTM-29 de <i>S.aculeolatus</i> (spots exclusivos).....	33
Figura 3.5. Mapa 2D do extrato proteico total das estirpes PTM-129 de <i>S.aculeolatus</i> (spots exclusivos).....	34
Figura 3.6. Mapa 2D do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29 de <i>S.aculeolatus</i> (spots comuns).....	36
Figura 3.7. Mapa 2D do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129 de <i>S.aculeolatus</i> (spots comuns).....	36
Figura 3.8. Mapa 2D do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29 de <i>S.aculeolatus</i> (spots exclusivos).....	37
Figura 3.9. Mapa 2D do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129 de <i>S.aculeolatus</i> (spots exclusivos).....	38
Figura 3.10. Géis 1D dos extratos proteicos extracelulares, das estirpes PTM-29 e PTM-129.....	39
Figura 3.11. Teste biológico do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29, contra VRE EF82 (<i>vancomycin-resistant enterococci</i>).....	40
Figura 3.12. Teste biológico do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129, contra VRE EF82 (<i>vancomycin - resistant enterococci</i>)	40
Figura 3.13. Teste biológico do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29, contra MRSA COL (<i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>).....	41
Figura 3.14. Teste biológico do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129, contra MRSA COL (<i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>).....	41

Tabela 3. 1. Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (g) da estirpe *Streptomyces aculeolatus* PTM-129 30

Tabela 6.1 Resultados da análise diferencial dos proteomas totais das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus*. 59

Tabela 6.2 Análise dos spots diferencialmente expressos detetados nos proteomas totais das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus*..... 59

Tabela 6.3 Resultados da análise diferencial dos exoproteomas das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus* 60

Tabela 6.4 Análise dos spots diferencialmente expressos detetados nos exoproteomas das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus*..... 60

°C- Grau centígrado

µg - Micrograma

2D - Bidimensional

2DE - Eletroforese bidimensional (do inglês *two dimensional gel electrophoresis*)

A1 - Meio de cultura A1

Abs - Absorvância

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA - Albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

C - Citosina

CBB - Azul brilhante de *coomassie* (do inglês *Coomassie Brilliant Blue*)

CHAPS - 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio] -1-propanosulfonato (do inglês 3- [(3 *cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate*)

DNA - Ácido desoxirrinucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

HI - Isoprenoides híbridos (*Hybrid isoprenoids*)

min - Minutos

mL - Mililitro

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (*Methicillin-resistant S. aureus*)

nm- Nanómetro

NRPs - Péptidos não ribossomais (do inglês *non ribosomal peptides*)

NRPS - Sintases de péptidos não ribossomais (do inglês *non ribosomal peptide synthases*)

OD - Densidade ótica

ORF- *Open Reading Frame*

pb - Pares de bases

PCR – Reação de polimerase em cadeia (do inglês *Polymerase chain reaction*)

PKs - Policétidos (do inglês *poliketides*)

PKS - Sintases de policétidos (do inglês *poliketide synthases*)

PrISM - Investigação proteómica de metabolismo secundário (do inglês *Proteomic Investigation of Secondary Metabolism*)

PTM - Código da estirpe obtida de sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira, Portugal.

Rpm - Rotação por minuto

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal (do inglês *ribosomal ribonucleic acid*)

s - Segundos

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

TCA - Ácido tricloroacético (do inglês *trichloroacetic acid*)

TEMED - Tetrametietilediamina (do inglês *TetraMethylEthyleneDiamine*)

UV - Ultravioleta

VRE - *Enterococcus* resistente à vancomicina (*Vancomycin resistant Enterococcus faecium*)

µl - Microlitro

Capítulo 1. *Introdução*

1.1 Actinobactérias marinhas

A classe *Actinobacteria* compreende uma diversidade de bactérias gram-positivas caracterizadas por um elevado conteúdo G+C (70-80%) no seu DNA (Mincer et al. 2002). Inserida nesta classe, a ordem *Actinomycetales* é composta por microrganismos vulgarmente designados actinomicetas, os quais correspondem a bactérias filamentosas, geralmente aeróbias, encontradas numa grande variedade de ambientes (Barka et al. 2016). Originalmente considerados como uma forma de transição entre bactérias e fungos devido à sua morfologia, este grupo de microrganismos demonstra uma capacidade única na produção de metabolitos secundários bioativos com utilidade clínica assumindo-se, por esta razão, como um recurso natural bastante valioso tanto em termos económicos como do ponto de vista biotecnológico (Valan et al. 2012; Valli et al. 2012; Meena et al. 2013). Estima-se que 50% dos metabolitos microbianos bioativos descobertos até hoje como antibióticos, agentes anti-tumorais, agentes imunossuppressores e enzimas, foram isolados a partir de actinobactérias, destacando-se o género *Streptomyces* como o táxon mais prolífico (Fenical & Jensen 2006; Lam 2006; Magarvey et al. 2004; Watve et al. 2001).

A exploração exaustiva deste recurso durante as últimas décadas veio estagnar a descoberta de novos fármacos, incentivando o desenvolvimento de novas estratégias como a exploração de *habitats* inexplorados ou subexplorados, com o intuito de encontrar outras fontes para o desenvolvimento de uma nova geração de agentes terapêuticos (Lam 2006).

Dada a vasta área ocupada pelos oceanos, cerca de 70% da superfície terrestre, e a complexidade microbiana que este ecossistema sustenta, naturalmente pensou-se em estender a investigação de novos metabolitos bioativos a este *habitat*. No entanto, a existência de espécies de actinobactérias marinhas foi inicialmente questionada. Aliado a esta e outras razões, como a falta de tecnologia avançada para amostragem nestes habitats e as dificuldades de cultivo deste tipo de bactérias em meios típicos de agar, suscitaram fraca motivação para a investigação deste recurso (Fenical & Jensen 2006). Embora fosse evidente que as actinobactérias encontradas em solos terrestres pudessem ser isoladas a partir de amostras marinhas, principalmente recolhidas em zonas costeiras, só mais tarde foi reconhecida a existência de populações distintas de actinobactérias marinhas adaptadas e metabolicamente ativas neste *habitat* (Jensen et al. 2005). A adaptação destes microrganismos a condições extremas, características dos oceanos, como altas pressões (~1100 atmosferas), condições anaeróbias, temperaturas inferiores a 0°C ou temperaturas superiores a 100°C, nas fontes hidrotermais, e condições acídicas, como pH a 2.8, certamente promoveu a divergência filogenética destas actinobactérias marinhas em relação aos terrestres, criando um nova fonte virtualmente inesgotável e ainda muito pouco explorada de novas espécies e muito provavelmente de novos metabolitos bioativos (Manivasagan, Venkatesan & Kim 2013).

1.1.1 Origem e biodiversidade

Em termos de diversidade de espécies identificadas, o filo Actinobactéria representa uma das maiores unidades taxonómicas entre as maiores linhagens reconhecidas atualmente dentro do domínio *Bacteria* (Ventura et al. 2007). Composta aproximadamente por 80 géneros, estes microrganismos podem ser encontrados numa grande variedade de *habitats* sendo mais abundantes em solos terrestres, onde vivem principalmente como saprófitos (Magarvey et al. 2004).

Apesar de há muito se ter reconhecido que as actinobactérias podem ser isoladas a partir de sedimentos marinhos, a existência de actinobactérias marinhas metabolicamente ativas foi inicialmente rejeitada e a sua expressão na microflora dos oceanos permaneceu durante vários anos desconhecida (Fenical & Jensen 2006). Durante muito tempo se colocou a hipótese de que as actinobactérias isoladas a partir de sedimentos marinhos se tratassem, apenas, de esporos de actinobactérias de origem terrestre com tolerância ao sal. De facto, várias observações sustentavam esta hipótese como a maior abundância de actinobactérias em solos terrestres e a sua maior densidade em zonas costeiras do que a maiores profundidades (Lam 2006). No entanto, é hoje aceite não só a existência de populações distintas de actinobactérias adaptadas e metabolicamente ativas nos oceanos, bem como a ampla diversidade que vieram acrescer dentro do táxon *Actinomycetales*. (Manivasagan, Venkatesan & Kim 2013).

Os oceanos constituem um ambiente único para o crescimento e desenvolvimento da vida microbiana. Em 2005, Bull *et al.* afirmaram que as actinobactérias representam 9% da flora bacteriana presente em sedimentos marinhos (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013). Estudos recentes têm mostrado que as actinobactérias podem ser isoladas não só a partir de zonas costeiras como também a partir de sedimentos de fundos oceânicos (Banskota et al. 2006).

O isolamento de *Rhodococcus marinonascene*, em 1984, constituiu a primeira evidência da existência de actinobactérias de origem marinha. Posteriormente foram reportadas outras novas espécies marinhas pertencentes aos géneros *Dietzia*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris*, *Verrucosipora*, *Nocardia*. e *Sciscionella* (Lam 2006; Subramani & Aalbersberg 2012). Embora a maioria destes tenha origem terrestre, novos géneros exclusivamente marinhos foram recentemente caracterizados como *Salinospora* e *Marinospora* que necessitam de sódio (Na⁺) para o seu crescimento, sendo classificados como actinobactérias marinhas obrigatórios (Maldonado et al. 2005; Mincer et al. 2002).

As actinobactérias marinhas foram divididas por 13 grupos MAR, distribuídas por 6 famílias diferentes, apresentadas na árvore radial da figura 1.1. A classificação taxonómica de alguns destes grupos está ainda por esclarecer, sendo muito provável que incluam novas espécies (Fenical & Jensen 2006).

Apesar da investigação de actinobactérias marinhas ter sido negligenciada durante vários anos, a sua exploração ganhou novo impulso nas últimas três décadas (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013).

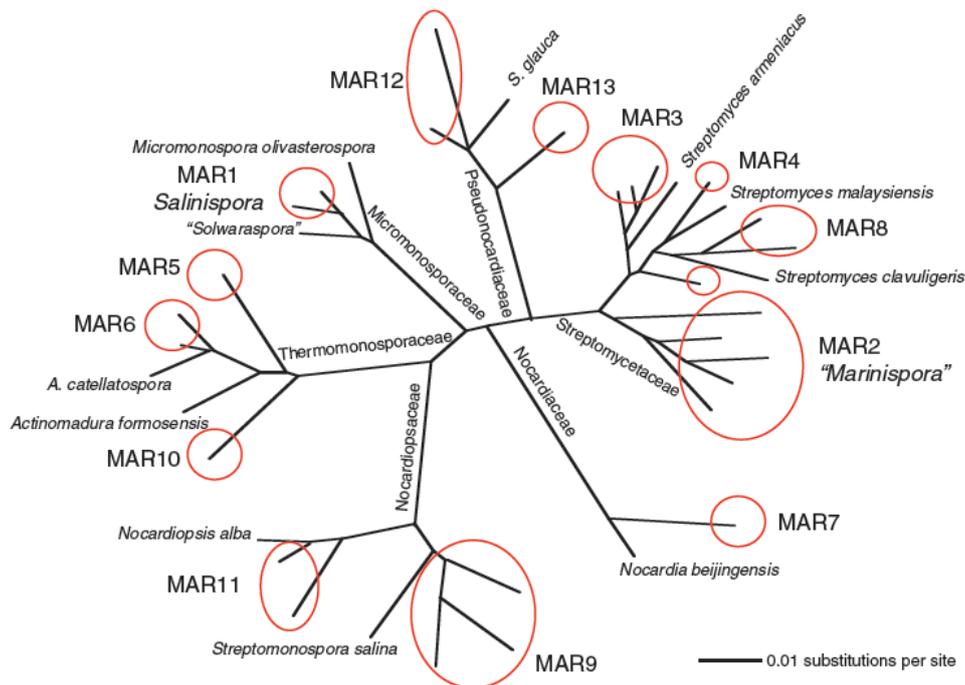


Figura 1.1. Árvore radial representativa das relações filogenéticas entre os diferentes grupos MAR (Fenical & Jensen, 2006).

1.1.2 Isolamento e identificação

Nas últimas décadas um grande número de actinobactérias terrestres foram isoladas e rastreadas em programas de *screening*. Por conseguinte, as probabilidades de isolar novas espécies de actinobactérias destes ambientes diminuíram abruptamente (Bull et al. 2000; Busti et al. 2006). Devido à exaustão destes recursos, atualmente a investigação e procura de novos produtos naturais está direcionada para actinomicetas raros ou encontrados em ambientes incomuns (Khanna et al. 2011).

Perante as dificuldades de isolamento deste tipo de bactérias através das técnicas de isolamento convencionais, vários fatores devem ser tidos em conta durante o procedimento, bem como a aplicação de metodologias seletivas para cada grupo taxonómico de actinobactérias. Assim, fatores como o conhecimento e seleção dos *habitats* para amostragem, pré-tratamento físico e químico das amostras, uso específico de meios seletivos, ajuste das condições de cultura e uso de metodologias específicas e seletivas para determinados géneros são essenciais para o sucesso do isolamento de novas espécies (Hayakawa 2008; Khanna et al. 2011; Manivasagan, Venkatesan & Kim 2013).

Após o isolamento, as estirpes são identificadas preliminarmente através de critérios morfológicos tais como características das colónias em placas, morfologia do micélio de substrato e das

hifas aéreas, morfologia dos esporos, pigmentos produzidos, quimiotipo da parede celular, entre outros (Manivasagan, Venkatesan & Kim 2013). No entanto, a caracterização taxonômica baseada apenas em critérios morfológicos e bioquímicos não oferece uma resposta definitiva e fiável (Khanna et al. 2011).

Sendo atualmente aceite que menos de 1% dos microrganismos podem ser isolados através de técnicas de cultura convencionais, limitando o acesso a grandes diversidades genéticas e aos percursos metabólicos destes microrganismos não cultiváveis, emergem técnicas moleculares independentes de cultura e a metagenômica, para a determinação da extensão total da diversidade microbiana não cultivável (Kennedy et al. 2010; Kodzius & Gojobori 2015a; Trindade et al. 2015).

A presença de espécies nativas dos oceanos tem sido confirmada através de uma abordagem molecular independente de cultura (Das et al. 2007; Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013). Este tipo de ferramenta molecular envolve a extração dos ácidos nucleicos das amostras e a amplificação por PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) das regiões variáveis do gene 16S rRNA através da utilização de *primers* homólogos às regiões conservadas do gene, seguida da análise de uma variedade de moléculas amplificadas (Heuer et al. 1997). Alternativamente, os produtos podem ser clonados e sequenciados para a identificação e enumeração de novas ou raras espécies de actinobactérias presentes na amostra (Monciardini et al. 2002). Várias metodologias moleculares de *community fingerprinting*, incluindo RFLP (“*Restriction fragment length polymorphism*”), PFGE (“*Pulse field gel electrophoresis*”), ARDRA (“*Amplified ribosomal DNA restriction analysis*”), RAPD (“*Random amplified polymorphic DNA*”) e uso de *primers* seletivos para determinados géneros, têm sido desenvolvidas para distinguir actinobactérias raras de outros géneros mais comuns (Khanna et al. 2011).

Entre as diversas metodologias desenvolvidas para o acesso à fisiologia e genética dos microrganismos não cultiváveis, a metagenômica, definida de forma simplista pelo estudo do genoma coletivo de uma dada população microbiana, tem emergido como uma técnica poderosa para a investigação estrutural, evolucionária e metabólica de comunidades microbianas complexas (Banskota et al. 2006; Schneider & Riedel 2010). Este tipo de análises envolve o isolamento de DNA a partir de amostras ambientais, a clonagem destes fragmentos através de um vetor apropriado e transformação num hospedeiro bacteriano para o seu estudo e preservação (Handelsman 2004). A criação de bibliotecas metagenômicas veio simplificar e propiciar o *screening* destes produtos, sendo que a sua análise pode ser direcionada quer em termos de sequenciação, para caracterização taxonômica, quer em termos de função para identificação de clones que expressem genes de interesse (Kennedy et al. 2010; Kodzius & Gojobori 2015)

A metagenômica é uma ferramenta valiosa para o acesso à biodiversidade de microrganismos não cultiváveis e é particularmente atrativa para a descoberta de novos produtos naturais uma vez que, geralmente a informação genética que codifica atividades de interesse é agrupada em *clusters* nos genomas bacterianos, permitindo replicar vias metabólicas individuais (Banik & Brady 2010; Trindade et al. 2015).

1.1.3 Aplicações biotecnológicas

As actinobactérias constituem um dos recursos mais valiosos dentro da comunidade microbiana atualmente conhecida, e as suas aplicações biotecnológicas são tão diversas que podem abranger desde a indústria farmacêutica à bioremediação até outros setores industriais como têxtil, naval e cosmético (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013).

Desde a descoberta da *streptomycina*, o primeiro antibiótico a ser isolado a partir de actinobactérias, estima-se que aproximadamente 10.000 antibióticos tenham sido isolados a partir deste grupo de microrganismos (Valli et al. 2012). A maioria dos antibióticos são metabolitos extracelulares excretados para o meio de cultura e podem incluir estruturas tão diversas como aminoglicosídeos tetraciclina, macrolídeos, glicopéptidos, antraciclinas, entre outros (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013).

Os péptidos e policétidos constituem duas das mais abrangentes classes de metabolitos frequentemente sintetizados por várias espécies de *Streptomyces*. Alguns destes metabolitos têm demonstrado atividades citotóxicas contra linhas de células tumorais, o que torna estes microrganismos uma alvo lógico para a descoberta de novas drogas (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013).

A síntese de pigmentos escuros, como melaninas ou melanóides, é também muito característica destas bactérias, sendo frequentemente usados em medicina, farmacologia e em preparações cosméticas (Vasanthabharathi et al. 2011).

Além do valor evidente destes microrganismos para a indústria farmacêutica, estes têm-se revelado particularmente interessantes para outro tipo de indústrias. As actinobactérias marinhas têm uma diversa gama de atividades enzimáticas e são capazes de catalisar várias reações bioquímicas. Diferentes enzimas industriais têm sido isoladas a partir destes microrganismos, tais como α -amílases, proteases, celulasas, quitinasas, queratinases e xilinasas (Manivasagan et al. 2014).

Tal como uma vasta diversidade de outros microrganismos, as actinobactérias marinhas estão envolvidas na degradação e no *turnover* de vários materiais. Estes microrganismos contribuem para a degradação e reciclagem de compostos orgânicos, desempenhando um papel fundamental na mineralização da matéria orgânica. A sua capacidade de degradar polímeros como a quitina, a celulose e outros materiais recalcitrantes torna estes microrganismos apelativos para estratégias de bioremediação (Das et al. 2006; Dash et al. 2013).

Além de todas as aplicações biotecnológicas referidas, as actinobactérias marinhas representam uma fonte promissora de compostos com potencial atividade *antifouling*. O *biofouling* é um fenómeno caracterizado pela colonização de superfícies naturais ou artificiais submersas no mar por microrganismos, como bactérias marinhas, protozoários e por macrorganismos incrustantes, como cracas, algas, mexilhões, entre outros. Este fenómeno é problemático para diversos setores industriais caso das indústrias marinha e petrolífera devido ao desgaste das infraestruturas, causando enormes perdas económicas devido à manutenção das mesmas e à prevenção deste fenómeno. Já vários

compostos com atividade *antifouling* foram isolados a partir de actinobactérias marinhas, particularmente de espécies de *Streptomyces*, representando uma alternativa viável, sustentável e com menor toxicidade do que as alternativas anti-incrustantes atualmente existentes (Xu et al. 2010; Yebra et al. 2004).

1.1.4 Biossíntese de metabolitos secundários

A síntese de metabolitos secundários ocorre na fase estacionária do crescimento bacteriano, em que se verifica um decréscimo da taxa de crescimento e o peso seco permanece constante (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013). Desta forma, o metabolismo secundário pode ser facilmente desencadeado através da manipulação de fatores que interfiram diretamente com o crescimento destes microrganismos, como a repressão da fonte de carbono, azoto, fósforo, entre outros (Abdelmohsen et al. 2015; Bibb 2005).

A otimização das condições de fermentação pode aumentar a produção de metabolitos secundários em várias ordens de grandeza (Subramani & Aalbersberg 2012).

Apesar destes conhecimentos, numa atualidade em que o uso de metabolitos derivados de microrganismos marinhos está em rápida expansão, tanto na indústria como no campo farmacêutico, é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos que controlam a produção destes metabolitos para se determinar se a produção em larga escala de compostos bioativos é viável para o desenvolvimento de novos fármacos (Hoover et al. 2007).

Vários avanços têm sido feitos neste sentido e já várias vias metabólicas têm sido esclarecidas. A biossíntese da enterocina, um policétido aromático sintetizado por *Streptomyces maritimus*, foi uma das primeiras vias a ser esclarecida por Piel *et al* (Piel et al. 2000). Já a biossíntese da salinosporomida A, um inibidor de proteossoma sintetizada por *Salinispora tropica*, foi decifrada pelo grupo de Moore em 2009 (Eustáquio et al. 2009). Outros dois exemplos proeminentes deste tipo de estudos incluem a síntese de dois compostos citotóxicos: a *thiocolarine* e BE-14106 isolados de *Micromonospora* as quais foram esclarecidas por Lombó *et al* (Lombó et al. 2006). Geralmente este tipo de investigações envolve a clonagem de genes biossintéticos, a sua expressão heteróloga num hospedeiro bacteriano apropriado, e a análise dos produtos e intermediários codificados por estes para a reconstrução das vias que estão na base da biossíntese destes metabolitos (Zotchev 2012; Ongley et al. 2013). Grande parte destes metabolitos são sintetizados por sintases de policétidos (PKS do inglês “*poliketide synthases*”) e sintases de péptidos não ribossomais (NRPS do inglês “*non ribossomal peptide synthases*”) (Wawrik et al. 2005). As vias biossintéticas são muitas vezes complexas e podem gerar vários metabolitos, devido à flexibilidade para a escolha do substrato de certas enzimas envolvidas na biossíntese e da interferência de outras vias. Por isso o seu estudo é de elevado interesse e utilidade para direcionar a síntese de determinados compostos, ou até mesmo gerar novos derivados para o *screening* da sua bioatividade (Zotchev 2012).

Apesar do vasto potencial genético das actinobactérias para a produção de metabolitos secundários, apenas alguns são sintetizados sob condições de laboratório e com rendimentos bastante baixos. Vários conjuntos de fatores são necessários à expressão dos genes biossintéticos como a temperatura, o pH, a salinidade, a presença de moléculas sinalizadoras, muitas vezes sintetizadas por outros organismos, limitando a sua produção em larga escala (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013).

O conhecimento das vias metabólicas e a integração de várias áreas como a biologia sintética, a biossíntese combinatória e a expressão heteróloga podem resolver este problema permitindo não só direcionar a produção de determinado metabolito através da manipulação genética, como aumentar os rendimentos de síntese (Rocha-Martin et al. 2014; Wilkinson & Micklefield 2007).

1.1.5 Género *Streptomyces* (MAR4)

O género *Streptomyces* é altamente diversificado, sendo composto por cerca de 600 espécies formalmente descritas (K. A. Gallagher et al. 2013). Os microrganismos pertencentes a este género são geralmente saprófitos e conhecidos habitantes dos solos terrestres, onde estão envolvidos na degradação de materiais orgânicos recalcitrantes e na supressão de patogénicos de plantas (K. A. Gallagher et al. 2013; Van Wezel & McDowall 2011). Estes microrganismos têm um enorme potencial biossintético, representando um dos mais importantes grupos de *actinomycetes* em termos económicos, sendo responsáveis por aproximadamente 75% dos compostos comercialmente disponíveis como antibióticos (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, et al. 2013).

Pelo facto de constituírem a principal fonte de uma vasta gama de compostos bioativos, o estudo do seu desenvolvimento bem como dos mecanismos que estão na base da regulação da síntese de vários metabolitos secundários tem sido extensivamente reportado na literatura (Van Wezel & McDowall 2011). Estes microrganismos apresentam um crescimento micelial desenvolvendo uma rede ramificada de hifas vegetativas, semelhante a fungos (Lautru et al. 2005). O seu metabolismo secundário é um processo complexo, coordenado com o seu desenvolvimento morfológico, e ocorre na fase estacionária do crescimento, sendo desencadeado como resposta a uma série de fatores ou alterações das condições ambientais, como a escassez de nutrientes, competição com outros microrganismos ou outras condições de stress (Lima Procópio et al. 2012; Manteca & Sanchez 2010).

Apesar de ser um grupo de bactérias muito abundante em solos terrestres, já várias estirpes de *Streptomyces* foram isoladas a partir de sedimentos marinhos, sobretudo de zonas costeiras. No entanto, estas geralmente possuem identidades muito próximas ou até mesmo idênticas às previamente reportadas de origem terrestre. A descoberta de novos filotipos marinhos incluindo uma nova linhagem de actinobactérias marinhas denominada MAR4 veio acrescer a diversidade à família *Streptomyceae*, incluindo novas espécies alcalificas de *Streptomyces* e particularmente à espécie *Streptomyces*

aculeolatus, originalmente reportada como uma espécie de origem terrestre (Fenical & Jensen 2006; K. A. Gallagher et al. 2013).

1.1.5.1 Metabolitos Secundários de *Streptomyces aculeolatus* (MAR4)

A linhagem MAR4 tem sido ligada à produção de isoprenóides híbridos (HI, do inglês “*hybrid isoprenoid*”) (K. A. Gallagher et al. 2013). Estes metabolitos secundários são compostos por uma fração terpenoide, que pode ter vários níveis de complexidade, ligados a uma diversidade de moléculas de origem biossintética como policétidos, péptidos ribossomais e não ribossomais, fenazinas e pirróis. A ligação entre estes dois tipos de metabolitos é promovida por preniltransferases (PTases), num fenómeno denominado prenilação (K. A. Gallaher et al. 2013).

Embora a produção de terpenóides como metabolitos secundários seja mais comum em plantas, as actinobactérias também produzem este tipo de metabolitos que podem incluir pigmentos carotenoides e compostos voláteis, responsáveis pelos distintos odores a terra não só associados às actinobactérias terrestres como marinhas (K. A. Gallagher et al. 2013; Gallagher & Jensen 2015).

Ate à data, vários isoprenóides híbridos têm sido descobertos a partir deste novo grupo, incluindo novos metabolitos pertentes às classes napiradiomicinas, marinonas, lavanducianinas, nitropirrolinas e azamerone, apresentados na figura 1.2 (Gallagher & Jensen 2015).

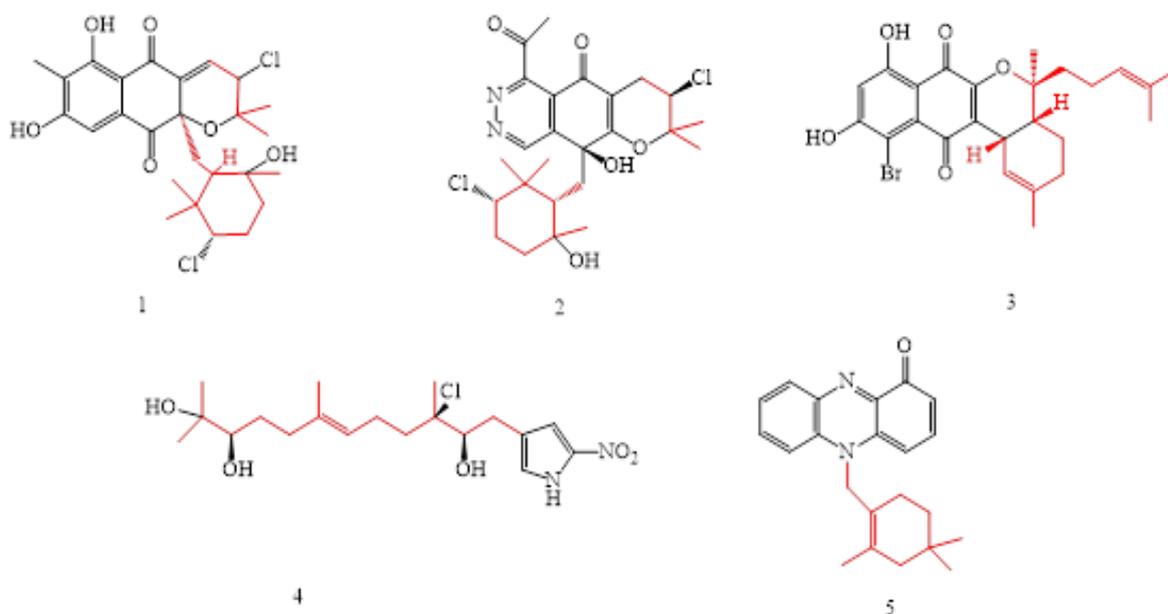


Figura 1.2. Estruturas dos isoprenóides híbridos sintetizados por actinobactérias, a fração isoprenoide está representada a vermelho: 1) napiradiomicina; 2) azamerone; 3) marinona; 4) nitropirrolina; 5) lavanducianina (Adaptado: Gallagher et al. 2010).

Os isoprenóides híbridos são conhecidos por terem uma ampla gama de atividades biológicas e, por isso, o *screening* de metabolitos a partir desta nova linhagem tem se tornado particularmente apelativo (Fenical & Jensen 2006).

1.2. Proteômica

O crescente interesse na descoberta de novos produtos naturais com novas propriedades e clinicamente relevantes, impulsionou a integração de áreas multidisciplinares que têm desempenhado um papel fundamental na dereplicação de compostos, nomeadamente no exercício de identificação de espécies já estudadas ou que não revelam potencial para investigação, apresentando alvos mais promissores para bioprospecção (Rocha-Martin et al. 2014; Newman & Cragg 2012; Gaudêncio & Pereira 2015). A integração das tecnologias “Omics” como a genómica, proteómica, metabolómica e transcriptómica para análise da estrutura e função das comunidades microbianas marinhas, tem revelado potenciais aplicações na descoberta e identificação de novos genes funcionais, novas enzimas catalíticas e até vias metabólicas (Rocha-Martin et al. 2014).

A Proteómica, definida originalmente como o estudo em larga escala das proteínas expressas por um dado organismo, surgiu na década de 90 com a introdução da eletroforese bidimensional (2-DE “*two dimensional electrophoresis*”) aplicada à resolução de misturas proteicas complexas, permitindo a obtenção de mapas reveladores da expressão das proteínas (Maron et al. 2007). Mais tarde, o desenvolvimento de uma metodologia eficiente de ionização de péptidos permitiu a cooperação entre a proteómica e a espectrometria de massa para a identificação rápida e sensível das proteínas (Maron et al. 2007). Paralelamente, os progressos feitos no campo da bioinformática bem como nas tecnologias de sequenciação, refletindo-se esta última num grande aumento do número de genomas microbianos sequenciados, veio expandir a área da proteómica bacteriana permitindo estabelecer relações entre filogenia e função de microrganismos individuais (Maron et al. 2007; Ahmad et al. 2011)

De facto, a proteómica oferece uma visão única e dinâmica das funções celulares desempenhando um papel preponderante na compreensão das vias metabólicas associadas a processos fisiológicos (Lacerda & Reardon 2009). Apesar da proteómica aplicada ao estudo de amostras ambientais estar menos desenvolvida do que em outras áreas e ser um campo especialmente desafiante, tem uma ampla gama de aplicações (Lacerda & Reardon 2009). Desde a simples identificação e catalogação de proteínas, aos estudos proteómicos comparativos e quantitativos, para avaliação de como diferentes condições ambientais podem condicionar a expressão proteica ou até mesmo para o estudo de diferenças entre estirpes bacterianas, tanto ao nível do fenótipo como da própria genética, a descoberta de modificações pós-traducionais que podem afetar a funcionalidade, estudo de interações proteína-proteína, constituem alguns dos exemplos da utilidade dos estudos proteómicos (Jabbour et al. 2006; Schneider & Riedel 2010). Em termos experimentais, a proteómica compreende quatro etapas básicas: i) preparação da amostra, a qual envolve a extração da proteína; ii) 1ª Dimensão: Focagem isoeétrica iii) 2ª Dimensão: SDS-PAGE (“*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*”); iv) identificação das proteínas por técnicas de espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry* MS), (figura 1.3) (Schneider & Riedel 2010).

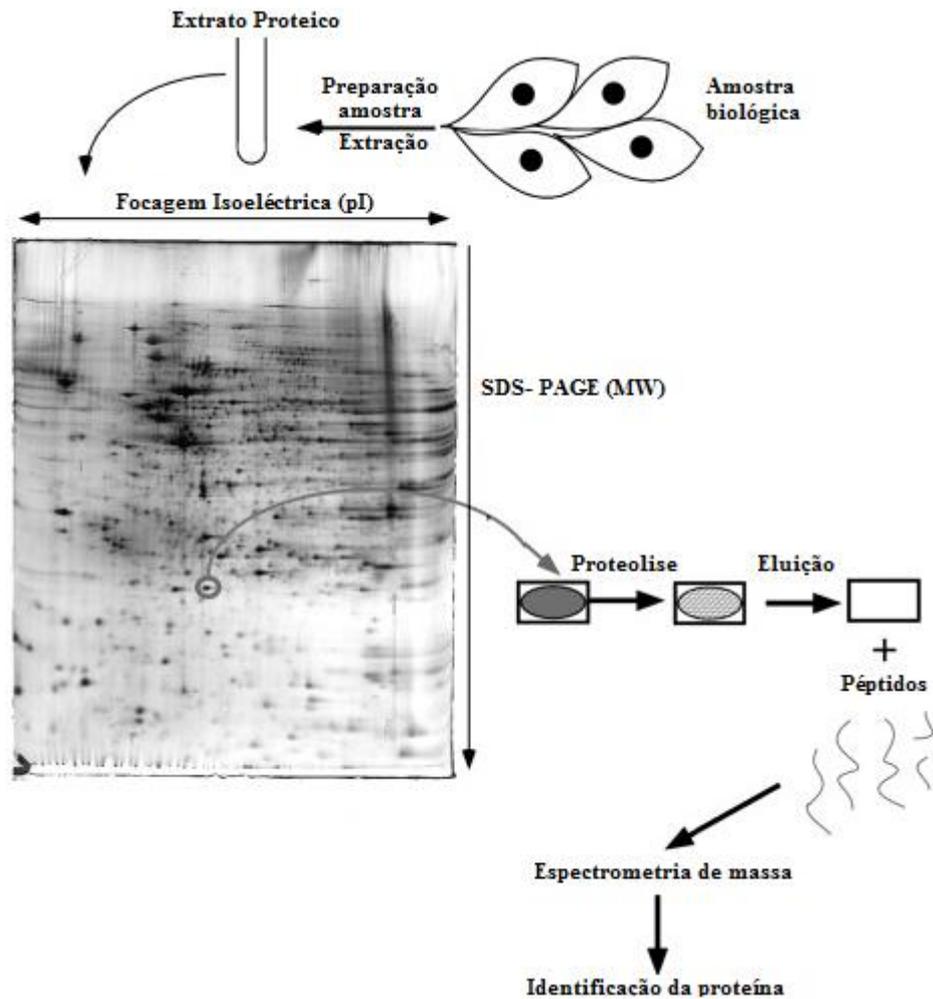


Figura 1.3. Esquema representativo do procedimento de eletroforese bidimensional acoplado à espectrometria de massa. A primeira etapa compreende a preparação da amostra, na qual é realizada a extração do conteúdo proteico das amostras biológicas; a segunda etapa corresponde à focagem isoelétrica da amostra em que as proteínas são separadas segundo o seu ponto isoelétrico; a terceira etapa corresponde à separação das proteínas segundo as suas massas moleculares numa eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Após a deteção das proteínas nos géis e a sua análise quantitativa para deteção de spots de interesse, as proteínas correspondentes aos mesmos, são excisadas do gel, digeridas enzimaticamente e os péptidos resultantes são depois eluídos e analisados por espectrometria de massa para a identificação da proteína. (Adaptado: Rabilloud & Lelong 2011)

A preparação das amostras constitui o passo mais crítico do procedimento. Dependendo do tipo e da complexidade das amostras e dos resultados finais que se pretendam alcançar, diferentes estratégias experimentais devem ser empregues. O protocolo deve ser eficiente e o mais reprodutível possível e, idealmente, deve resultar na solubilização completa da proteína total, na sua desagregação, desnaturação e redução (Almeida et al. 2001; Rabilloud & Lelong 2011; Schneider & Riedel 2010). Durante o procedimento, a integridade das amostras deve ser mantida e a sua complexidade reduzida pela eliminação de substâncias interferentes com as etapas subsequentes (Gorg 2004).

Dependendo da localização das proteínas na amostra, diferentes métodos de extração físicos/químicos devem ser aplicados. O tratamento físico através de altas pressões proporcionadas pela

prensa francesa (*French press*), é geralmente adotado quando se pretendem estudar proteomas de microrganismos, como bactérias, que oferecem uma certa resistência a métodos de extração mais suaves. Esta metodologia promove a lise celular e a consequente libertação do conteúdo proteico (Gorg 2004; Santos et al. 2004).

A proteólise é um fenómeno recorrente neste tipo de procedimento, derivado da libertação de proteases durante a lise celular e, por isso, a proteção da amostra através de uso de um *cocktail* de inibidores de proteases é essencial para gerar resultados válidos e não enviesados. A remoção dos ácidos nucleicos das amostras é geralmente requerida para evitar a contaminação e subsequentes artefactos nos géis 2D, por isso, o uso de uma mistura de endonucleases contendo DNase e RNase é igualmente essencial (Gorg 2004; Rabilloud & Lelong 2011).

A precipitação da proteína e eliminação de substâncias interferentes são passos opcionais do procedimento. No entanto, são de grande utilidade para contornar situações de baixas concentrações de proteína e altas concentrações de sal. Nestes casos, a precipitação/eliminação de substâncias interferentes pode ser promovida através do uso de ácido tricloroacético (TCA) e acetona gelada (Gorg 2004).

Por fim, a amostra deve ser completamente solubilizada, desnaturada e reduzida, para evitar agregação ou interações intermoleculares. A solubilização é promovida por uma solução que contém agentes como a ureia e detergentes como o CHAPS que promovem a desnaturação da proteína e outros componentes, como IPG *buffer*, que ajudam na solubilização da amostra e ainda o ditioneitol (DTT) para a quebra das pontes dissulfeto garantindo que as proteínas permanecem no estado reduzido (Gorg 2004; Wilmes & Bond 2004).

As proteínas são moléculas anfotéricas, ou seja, a sua carga global depende do pH onde estão inseridas, sendo o seu ponto isoelétrico definido pelo pH ao qual a sua carga global é nula. A focagem isoelétrica, correspondente à 1ª dimensão, separa as proteínas segundo os seus pontos isoelétricos através de *strips*, tiras de gel de poliácridamida com gradientes de pH imobilizados, sob a influência de um campo elétrico (Almeida et al. 2001; Santos et al. 2004).

Na segunda dimensão, as proteínas são separadas segundo as suas massas moleculares relativas (Mr), numa eletroforese em gel de poliácridamida em condições desnaturantes SDS-PAGE (“*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*”) (Santos et al., 2004). Entre a primeira dimensão e a segunda, é ainda requerida uma etapa de equilíbrio em que as *strips* são saturadas com o sistema tamponizante, contendo SDS, exigido para a segunda dimensão. A esta solução de equilíbrio é adicionada num primeiro passo um agente redutor geralmente DTT para preservar o estado reduzido das proteínas e, num segundo passo, iodoacetamida, para impedir a reoxidação das mesmas, através da alquilação dos grupos tiol (Gorg 2004).

A coloração dos géis é fundamental para a deteção e determinação das abundâncias relativas das proteínas, representadas idealmente nos géis, como *spots* individuais (Almeida et al. 2001). Existem vários métodos de deteção que oferecem diferentes sensibilidades desde a coloração com azul de

coomassie coloidal (uma das metodologias mais comuns), à coloração com nitrato de prata, até técnicas mais complexas e sensíveis como marcação com sondas fluorescentes. Todas as técnicas referidas são compatíveis com as técnicas MS (Rabilloud & Lelong 2011; Santos et al. 2004).

A espectrometria de massa é uma técnica ímpar capaz de conjugar precisão sensibilidade e rapidez e por isso é geralmente usada para a identificação das proteínas (Almeida et al. 2001). Este tipo de análises é antecedido por uma etapa em que se promove a digestão química ou enzimática das proteínas, geralmente através da tripsina, para produzir um padrão de degradação único que possa ser reconhecido por espectrometria de massa (*peptide mass fingerprint* PMF) (Almeida et al. 2001; Wilkins et al. 1996). Para tal as bandas são previamente, excisadas dos géis e são sujeitas a redução, alquilação e várias etapas de lavagem (Schneider & Riedel 2010). A ionização de desorção a laser assistida por matriz (MALDI “*matrix-assisted laser desorption/ionization*”) é a técnica de ionização mais suave e por esta razão é tipicamente utilizada para a análise de proteínas, geralmente acoplada ao analisador TOF (“*time-of-flight*”). Obtidas as massas dos vários péptidos, a identificação das proteínas é realizada por comparação dos dados obtidos com dados disponíveis em bases de dados (Jabbour et al. 2006; Wilmes & Bond 2004; Wilkins et al. 1996).

1.2.1 Estudos de Proteómica em actinobactérias

Os péptidos não ribossomais (*non-ribosomal peptides* NRPs) e policétidos (*poliketides* PKs) constituem duas das mais valiosas famílias de produtos naturais que podem incluir desde antibióticos, antiproliferativos, agentes imunossupressores e antifúngicos. As actinobactérias, particularmente o género *Streptomyces*, são reconhecidas pela sua habilidade na síntese deste tipo de compostos (Bumpus et al. 2009; Zazopoulos et al. 2003).

Projetos de sequenciação recentes têm revelado genomas destas bactérias de grandes dimensões (superiores a 8Mbp) e um largo reportório genético para o metabolismo secundário com cerca de 20 a 30 agrupamentos de genes, sendo que aproximadamente metade destes codificam sintases de NRPs/PKs (Chen et al. 2013).

Apesar dos avanços na sequenciação de genomas e do uso da bioinformática para prever o potencial biossintético destes microrganismos, existe uma grande disparidade entre o potencial genético destes para a síntese de novos produtos naturais e a atual expressão dos genes envolvidos na biossintese, sob condições de cultura em laboratório (Chen et al. 2013). Neste contexto a proteómica surgiu como uma nova metodologia de bioprospecção no sentido de complementar a genómica e a metabolómica, apoiando-se na procura das enzimas biossintéticas expressas por estes organismos, ao invés das abordagens baseadas somente na genómica como “*genome mining*”, que se sustenta nas sequências de DNA para direcionar a descoberta de novos produtos naturais ou, ainda, nas abordagens de *screening* convencionais conduzidas por bioensaios de metabolitos (Chen et al. 2013; Rocha-Martin et al. 2014; Van Lanen & Shen 2006).

A *Proteomic Investigation of Secondary Metabolism* (PrISM) foi uma plataforma criada para a descoberta de novos produtos naturais baseada na detecção de enzimas biossintéticas (NRPS/ PKS) usando esta informação para direcionar a descoberta tanto dos genes expressos envolvidos na sua biossíntese como do respetivo produto natural (Chen et al. 2013). Com base no grande tamanho destas enzimas multimodulares, com massas moleculares geralmente superiores a 200 kDa, e nos seus marcadores iónicos exclusivos derivados de um cofator comum, esta plataforma adaptou a proteómica acoplada à espectrometria de massa para a detecção seletiva da expressão de genes que codificam NRPS/PKS, sem a necessidade de informação da sequenciação dos seus genomas (Bumpus et al. 2009). Neste programa os microrganismos, crescidos sob diferentes condições de cultura, são rastreados ao nível da expressão de proteínas de alto peso molecular, superior a 200kDa (Chen et al. 2013).

1.3. Contextualização do trabalho e objetivos

No panorama atual em que a resistência aos antibióticos representa um dos maiores problemas de saúde pública, a nível global, a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos é crucial para suprir as necessidades médicas e farmacêuticas atualmente existentes.

Embora a exploração de actinobactérias marinhas estar ainda numa fase inicial, vários novos metabolitos têm sido isolados a partir destes microrganismos nos últimos anos, revelando-se uma fonte promissora para a descoberta de uma nova geração de fármacos com estruturas e propriedades únicas. Apesar do vasto potencial genético deste novo nicho para a biossíntese de metabolitos bioativos, a sua produção em larga escala é ainda limitada pela falta de informação e de dados acerca das vias metabólicas e dos controlos moleculares e genéticos que estão na base deste processo.

O conhecimento da maquinaria biossintética e dos processos de regulação é de vital importância para o acesso ao potencial de produção destes microrganismos, podendo ainda beneficiar posteriormente da engenharia metabólica e genética para direcionar a síntese de um produto específico, aumentar rendimentos de produção e diminuir custos associados.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram a identificação de proteínas envolvidas na biossíntese de metabolitos bioativos da estirpe PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus* da linhagem MAR4, através de uma abordagem proteómica diferencial. As duas estirpes em estudo exibem perfis de bioatividade distintos, a estirpe PTM-29 está envolvida na produção de metabolitos com atividades antibacterianas contra MRSA COL (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e VRE EF82 (*vancomycin - resistant enterococci*) e atividade *antibiofouling* contra larvas de mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), bactérias marinhas (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e *Cobetia marina*) e diatomáceas. Enquanto que a estirpe PTM-129, não exhibe até à data, biossíntese de metabolitos bioativos. Com base nestas diferenças ao nível dos perfis de bioatividade, o principal objetivo foi a identificação de biomarcadores envolvidos na síntese destes metabolitos com o objetivo final de cruzar

dados ao nível do metaboloma/proteoma/genoma, para a compreensão das vias metabólicas que estão na base da síntese destes metabolitos.

Adicionalmente, realizou-se um estudo preliminar dos proteomas extracelulares das estirpes referidas com o objetivo de identificar péptidos não ribossomais, frequentemente sintetizados por NRPS (sintases de péptidos não-ribossomais) neste tipo de microrganismos, e ainda testar as atividades biológicas destas frações proteicas contra MRSA COL e VRE EF82.

Capítulo 2. *Materiais e métodos*

2.1. Soluções e reagentes

I. Crescimentos e preparação das amostras

Os meios foram preparados com água do mar, filtrada com membranas de porosidade de 0,22 µm da *Membrane solutions*, água destilada, amido, extrato de levedura e peptona adquiridos à Dickinson and company. Para a manutenção da integridade das proteínas durante a sua homogeneização recorreu-se a um cocktail de inibidores de proteases (*complete EDTA Roche free*) e uma mistura de endonucleases: desoxirribonuclease I da Roche e ribonuclease I (RNaseI) adquiridos à Sigma. A precipitação da proteína foi realizada com TCA (*trichloroacetic acid*, 99%) e acetona (99%), da Sigma. A filtração das alíquotas retiradas para determinação do peso seco foi realizada através de membranas com porosidade de 0,22 µm da *Membrane solutions*.

II. Eletroforeses

Os géis 1D foram preparados com acrilamida: Bis 30%:3%, PSA (persulfato de amónia; 98%), TEMED (*tetramethylethylenediamine*, 99%) da GE Healthcare, HCl (37%) da Pronalab, tris-base (99,9%) e SDS ($\geq 99\%$) adquiridos à Sigma. As amostras para aplicação nos géis unidimensionais foram incubadas com tampão de amostra preparado com DTT (*dithiotreitol*, 99%) da GE Healthcare, azul de bromofenol proveniente da Merck, glicerol (87%) obtido à Panreac, ácido clorídrico (*hydrochloric acid* HCl) (37%) da Pronalab, SDS ($\geq 99\%$) e tris-base (99,9%) adquiridos à Sigma.

As *strips* foram reidratadas numa solução de reidratação preparada com CHAPS (*3-[(3-cholamidopropyl) -dimethylammonio] -1-propanesulfonate*; 99%) da Calbiochem, DTT (99%) e *IPG buffer* provenientes da GE Healthcare e tiourea (99%) e ureia (99,5%) adquiridos à Merck.

O equilíbrio das *strips* foi efetuado em solução de equilíbrio preparada com azul de bromofenol e ureia (99,5%) adquiridos à Merck, glicerol (87%) da Panreac, HCl (*hydrochloric acid*; 37%) proveniente da Pronalab, N-dodecil-sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*; 99%) e tris-base (*tris-base (hydroxymethyl) aminomethane*; 99,9%) comprados à Sigma. A esta solução foi adicionada, numa primeira etapa, DTT (99%) da Healthcare e posteriormente 2-iodoacetamida (grau de pureza ideal para síntese) da Merck. Para a preparação dos géis da segunda dimensão usou-se acrilamida: bis 40%:3% (razão 37.5:1; grau de pureza para eletroforese), PSA (98%), TEMED (99%) da GE Healthcare, HCl (37%) da Pronalab, tris-base (99,9%) e SDS ($\geq 99\%$) adquiridos à Sigma. Os géis foram posteriormente corados numa solução de coloração contendo ácido ortofosfórico (85%) e azul brilhante de *coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue G250*, CBB G25) com grau de pureza para eletroforese, adquirido à Merck, etanol (96%) da Scarlab e sulfato de alumínio hexadecahidratado (95,0%) da Sigma, sendo que o

excesso de cor foi removido por uma solução de descoloração preparada a partir dos mesmos reagentes à exceção do CBB e do sulfato de alumínio hexadecahidratado.

Todas as soluções foram preparadas com água de pureza A, proveniente de sistemas Millipore MilliQ (resistividade > 18,2 MΩcm-1, a 25 °C).

2.2 Equipamentos

Todos os meios de cultura foram autoclavados na *Uniclave 88*, sendo que todos os processos de inoculação foram realizados em condições de assépsia, à chama, proporcionada pelo bico de Bunsen. Os crescimentos celulares foram mantidos sob agitação a 30°C no SKC 6200 *Orbital shaker* da Lab Companion, e as centrifugações posteriores foram executadas na centrífuga *Avanti J-25* (rotor JA-10) da Beckman. Para a obtenção dos extratos proteicos procedeu-se à homogeneização das células num homogeneizador *Potter-Elvehjem* da Multifix, promovendo-se de seguida a lise celular numa prensa francesa (*french press*) (*Thermo-FA-080*). As medições das absorvâncias das amostras para quantificação da proteína total foram realizadas no espectrofotómetro UV-160A da Shimadzu. As centrifugações relativas à preparação das amostras foram efetuadas numa centrífuga Minifug da Dynamica.

Para correr a 1ª dimensão recorreu-se ao sistema *Ettan IPGphor 3* da GE Healthcare. As *strips* foram reidratadas no tabuleiro de reidratação *Immobiline Dry strip Reswelling Tray* da Amersham Biosciences, a etapa de equilíbrio das mesmas ocorreu sob agitação basculante no *Rocking Platform* da VWR.

A polimerização dos géis usados na 2ª dimensão foi efetuada no *caster Hoefer 600* da GE Healthcare e para os géis unidimensionais usou-se o *caster* da Mini-Protean 3 da BioRad.

Os processos de coloração e descoloração dos géis ocorreram igualmente sob agitação basculante no *Rocking Platform* da VWR.

2.3. Crescimento celular

As estirpes PTM-29 e PTM-129 estudadas no âmbito desta dissertação foram obtidas após um processo de isolamento e purificação dos sedimentos marinhos recolhidos no arquipélago da Madeira, no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos-Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioativos” (projeto ref.-PTDC/QUIQUI/119116/2010, PI: Dr^a Susana Gaudêncio). Este procedimento teve como base o rastreio de actinobactérias, através das semelhanças morfológicas das colónias em placa, a este grupo de bactérias. A propagação das células das estirpes supramencionadas foi realizada em meio A1 (composto por 750 mL de água do mar filtrada, 250 mL de água destilada, 4g de extrato de levedura, 10g de amido e 2g de peptona), durante sete dias, sob agitação, a uma temperatura de 30°C. Para o efeito, primeiramente foram preparados pré-inóculos de cada uma

das estirpes. Os pré-inóculos foram mantidos a 25°C sob agitação durante sete dias, e só após este período de tempo se procedeu à inoculação de meios A1 (1L).

Todos estes procedimentos foram realizados em bancada, sob condições de assepsia (à chama).

2.3.1 Curva de crescimento celular de *Streptomyces aculeolatus* - PTM-129

Com o intuito de se otimizar os crescimentos celulares para os estudos proteómicos, determinou-se a curva de crescimento celular da estirpe PTM-129.

Para o efeito adotou-se um protocolo em que o crescimento celular é dado pela relação entre a acumulação de biomassa, determinada pelo peso seco ao longo do tempo, baseado no procedimento descrito por Sejiny 1991.

Inicialmente prepararam-se dois pré-inóculos (30 mL) em meio A1 de cada uma das estirpes a partir dos respetivos *stocks*, tendo sido mantidos a 25°C, sob agitação durante sete dias. Após este intervalo de tempo procedeu-se à inoculação em meios A1 (10% do volume total). Estes crescimentos foram mantidos a 30°C sob agitação durante oito dias. Diariamente foram retiradas alíquotas (5 mL) em duplicado, de cada uma das culturas, sendo posteriormente filtradas sob vácuo em membranas de porosidade 0,22 µm, o *pellet* daí obtido foi lavado com água destilada, e guardado em placas de *petri* previamente taradas. Deixou-se secar à temperatura ambiente dez minutos e determinou-se o peso húmido de cada uma das alíquotas. As alíquotas foram posteriormente armazenadas numa estufa a 60°C durante 2 dias, ao fim dos quais se determinou o peso seco.

A taxa de crescimento específica e o tempo de duplicação foram calculados a partir do peso seco em função do tempo, representado numa escala logarítmica.

A manipulação das culturas foi realizada sob condições de assepsia, à chama.

2.4 Lise celular e criopreservação

Após o período de crescimento das culturas procedeu-se à recolha das células por centrifugação a 8000 x *g* durante 15 minutos, a 10°C. Concluído este processo, foram armazenados a -80°C, cinco tubos *falcon* com 40 mL do sobrenadante e um tubo *falcon* com as células recolhidas, respetivas aos crescimentos de cada uma das estirpes.

As células foram homogeneizadas na presença de endonucleases: DNaseI e RNaseI para uma concentração final de 0,010 mg/mL e de um cocktail de inibidores de proteases com uma concentração final de 0,02 mg/mL. Seguidamente, realizou-se a lise celular numa prensa francesa a cerca de 16000 *psi* e, de forma a remover detritos celulares, realizou-se uma centrifugação a 8000 x *g*, durante 15 minutos, a 4°C. Os extratos proteicos daqui resultantes foram armazenados a -80°C.

2.5 Preparação das amostras

2.5.1 Precipitação da proteína

De forma a otimizar os resultados dos géis 2D, procedeu-se à precipitação quantitativa da proteína presente nas amostras, contornando problemas relativos a substâncias interferentes próprias do meio de crescimento como o sal, que geram alta condutividade, e ainda situações de baixa concentração de proteína.

I. Tratamento da fração proteica intracelular

Adicionaram-se volumes iguais de TCA (20%) e amostra. A mistura foi incubada em gelo, durante 30 minutos. Após este intervalo de tempo realizou-se uma centrifugação a 8000 x g, a 4°C, durante 15 minutos.

Desta centrifugação obteve-se um *pellet*, composto pela fração proteica, ao qual foram adicionados (após a remoção do sobrenadante) 300 µl de acetona gelada. Procedeu-se a uma segunda centrifugação, a 10000 x g, durante 5 minutos, a 4°C. Finalizada esta etapa, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em solução de reidratação.

II. Tratamento da fração proteica extracelular

Procedeu-se como o descrito no ponto **I** da secção 2.5.1, com a exceção de que se realizou uma centrifugação 8000 x g, durante 10 minutos, a 4°C, para remoção de alguns detritos celulares em suspensão, antes de se iniciar o protocolo.

2.6 Quantificação da Proteína

A quantificação da proteína total, após o procedimento de precipitação e concentração das frações proteicas intracelular e extracelular das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus*, foi realizada através do *kit BioRad Protein Assay* (BioRad). Este *kit* baseia-se no método de *Bradford* em que é usado um corante, o *Coomassie Brilliant Blue G-250*, que possui afinidade para as proteínas. Este corante apresenta máximos de absorção diferentes na sua forma livre (465 nm) ou ligada à proteína (595 nm), sendo a este último comprimento de onda que se efetuam as leituras das absorvâncias das amostras. Desta forma, a concentração de proteína é diretamente proporcional à absorvância.

A concentração da proteína total foi feita por intrapolação dos valores de absorvância das amostras na curva de calibração obtida a partir de várias diluições da solução padrão de proteína, tendo-se usado para o efeito a albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA) da GE Healthcare.

2.7 SDS-PAGE (1D)

O gel de separação foi preparado com 0,375 M de Tris-HCl a pH 8,8, 12,5% de acrilamida: bis 30%:3, 0,2 % SDS, 0,05% TEMED e 0,05% PSA e o gel de concentração com 0,128 M de tampão Tris-HCl pH 6,8, 12,5% de acrilamida: bis 30%:3, 0,2 % SDS, 0,05% TEMED e 0,05% PSA.

As amostras foram incubadas em tampão de amostra constituído por 0,0625 M de Tris-HCl a pH 6,8, 2% de SDS, 10% (v/v) de glicerol, 0,1 M de DTT e 0,01% de azul de bromofenol. Antes da sua aplicação nos poços, as amostras foram fervidas durante 3 min e imediatamente centrifugadas a baixa velocidade durante 2 min.

Os géis foram corridos a uma voltagem inicial de 80V durante 30 min e, posteriormente, a 120V durante 1 h.

2.8 Eletroforese bidimensional

2.8.1 Obtenção dos proteomas da fração proteica intracelular

I. Reidratação das strips

As *strips* de pH imobilizados 4-7 (11 cm) foram reidratadas *overnight* em solução de reidratação composta por 7 M de ureia, 2 M de tiourea, 4% de CHAPS (m/v), 1,5% (v/v) de tampão de IPG, 0,002% de azul de bromofenol (m/v); a esta solução adicionou-se 250 µg de amostra e agente redutor DTT 0,28% (m/v).

II. Focagem Isoelétrica (1ª Dimensão)

A focagem isoelétrica foi realizada a 20 °C num programa de 4 passos, somando-se um total de 13 kV, corridos em 5 h.

- 1) voltagem constante de 500 V (1 h, 500 Vh)
- 2) gradiente de voltagem de 500 V até 1000 V (1 h, 800 Vh)
- 3) gradiente de voltagem de 1000 V até 6000 V (2 h e 30 min, 8800 Vh)
- 4) voltagem constante de 6000 V (30 min, 2900 Vh)

III. Equilíbrio das strips

As *strips* foram preparadas para a segunda dimensão através da incubação das mesmas, durante 15 min, sob agitação basculante, em duas soluções de equilíbrio (6 M de ureia, 50 mM de Tris-base-HCl a pH 8,8, 30% (v/v) de glicerol, 2% (m/v) de SDS e 0,002% de azul de bromofenol) a primeira contendo DTT (10 mg/mL) e a segunda iodocetamida (25 mg/mL).

IV. SDS-PAGE (2ª Dimensão)

Concluído o processo de equilíbrio das *strips*, estas foram aplicadas num gel, previamente preparado, com 12,5% de acrilamida: bis 40%:3%, 0,375 M de Tris-HCl a pH 8,8, 0,2% SDS, 0,05% de TEMED e 0,04% de PSA. O sistema foi selado com solução de agarose 1% em tampão corrida (0,025 M de Tris-base, 0,192 M de glicina e 0,2% de SDS).

Os géis correram inicialmente a 80 V durante 30 min, de forma a promover uma transferência homogênea da amostra, da primeira dimensão para a segunda dimensão.

Concluída esta etapa, aumentou-se a voltagem para os 250 V e deixou-se correr durante aproximadamente 3 h 30 min.

V. Coloração dos géis

No final da corrida os géis foram cuidadosamente retirados dos vidros e lavados com água destilada durante 10 minutos, sob agitação basculante, repetindo-se o procedimento três vezes. A coloração dos mesmos foi feita através da sua incubação *overnight* numa solução com 0,02% (m/v) azul *coomassie* coloidal (CBB G250, 5% (m/v) de sulfato de alumínio hexadecahidratado, 10% (v/v) etanol, 2% (v/v) de ácido ortofosfórico. Após este processo os géis foram lavados com água destilada duas vezes durante 2 min e 30 s, sendo incubados posteriormente em solução de descoloração contendo 10% (v/v) de etanol e 2% (v/v) de ácido ortofosfórico. Os géis permaneceram nesta solução durante 2 h sob agitação. Finalizada esta etapa, os géis foram novamente lavados em água destilada (2 vezes durante 2 min e 30 s) e guardados em água destilada

2.8.2 Obtenção dos exoproteomas

I. Reidratação das strips

A reidratação das *strips* de pH imobilizados 4 -7 de 7 cm foi feita tal como o descrito no ponto I da secção 2.8.1. alterando apenas a quantidade de amostra aplicada para 50 µg.

II. Focagem Isoelétrica (1ª Dimensão)

A focagem isoeletrica foi realizada a 20 °C com um programa de 4 passos, somando-se um total de 5,325 kV corridos em 5 h.

- 1) voltagem constante de 200V (1h, 200 Vh)
- 2) gradiente de voltagem de 200 até 1000V (1h, 250 Vh)
- 3) gradiente de voltagem dos 1000V até aos 5000V (1h e 30 min, 375 Vh)
- 4) voltagem constante de 5000V (1 h e 45 min, 4500 Vh)

III. Equilíbrio das strips

Este procedimento foi realizado tal como o descrito no ponto III da secção 2.8.1.

IV. SDS-PAGE (2ª Dimensão)

Os géis foram preparados com 12,5% de acrilamida: bis 40%:3%, 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8, 0,2% SDS, 0,05% de TEMED e 0,05% de PSA. As *strips* foram aplicadas no topo do gel e o sistema selado com solução de agarose 1% em tampão corrida. Os géis foram corridos a 80V durante 15 min aumentando-se posteriormente a voltagem para os 150 V durante uma hora.

V. Coloração dos géis

Procedimento igual ao descrito no ponto V da secção 2.8.1.

2.9 Análise dos géis

As imagens dos géis 2D foram processadas e analisadas pelo *software Melanie 7.0* da Gene Bio, através do qual se realizou a validação estatística das abundâncias relativas das proteínas. Este *software* permite a deteção das proteínas dos géis, representadas nestes como *spots*, e o seu emparelhamento (*matching*), no qual são estabelecidas as correspondências entre proteínas dos diferentes géis, ou seja, *spots* representativos da mesma proteína são agrupados nos diferentes replicados técnicos e biológicos. As alterações significativas na abundância das proteínas, estabelecidas com base no volume relativo do *spot*, um valor normalizado que corresponde ao volume do spot em relação a todos os *spots* da imagem, foram analisadas através de dois critérios estatísticos disponíveis no software. O *fold change* que corresponde à razão das intensidades de um determinado spot exibido em diferentes classes, para o qual foi definido um valor mínimo de 2 e a análise da variância estatística (ANOVA), onde foi estabelecido um *p-value* máximo de 0.05, a fim de comparar os *spots* agrupados nos vários replicados técnicos e biológicos e detetar variações entre eles. Sempre que se verificou a conjugação destes dois critérios em simultâneo para um determinado *spot*, considerou-se que este era diferencialmente expresso numa das duas estirpes em estudo.

2.10 Ensaio antimicrobianos: exoproteoma

I. Obtenção e concentração dos extratos proteicos extracelulares

Primeiramente realizou-se uma extração líquido-líquido, dos sobrenadantes das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus* obtidos na secção 2.4, com 20 mL de acetato de etilo, repetindo-se o procedimento duas vezes.

As fases orgânicas foram descartadas, e procedeu-se à liofilização de 10 mL das fases aquosas de cada um dos meios de cultura das referidas estirpes. Concluída a liofilização, as amostras foram ressuspensas em 1mL das seguintes soluções tampão: 0,05M MES (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid) pH 5,5, 0,05 M tampão tris-HCl pH 7 e 0,05 M tampão fosfato pH 8,8.

Para testar a melhor solubilidade nos diferentes tampões fizeram-se géis 1D onde foram aplicadas as amostras liofilizadas e ressuspensas nos vários tampões, seguindo o procedimento descrito na secção 2.7.

II. Quantificação da proteína dos extratos proteicos extracelulares

A concentração de proteína solubilizada nos diferentes tampões foi determinada pelo método descrito na secção 2.6.

III. Ensaios biológicos: atividade antimicrobiana

A atividade biológica das frações proteicas extracelulares das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus*, foi testada contra duas linhagens de bactérias multirresistentes: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA COL, “Methicillin resistant” *S. aureus*, Gill et al. 2005) e *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE EF82, “Vancomycin resistant” *Enterococcus faecium*, Tomasz & Mato 1996), num bioensaio em placas de 96 poços.

Estas estirpes foram inoculadas em meio BHI (*Brain heart infusion*), e incubadas a 37°C, *overnight*. Após o período de incubação, procedeu-se à leitura da OD (densidade ótica) dos inóculos num espectrofotómetro a 600 nm, sendo que os valores de OD, para dar início ao ensaio, deveriam situar-se dentro do intervalo 0,04- 0,06, quando tal não se verificou procedeu-se à diluição dos inóculos. Preparou-se a concentração máxima de 250 µg/mL de extrato proteico em cultura de cada uma das estirpes bacterianas multirresistentes, a partir da qual foram feitas diluições seriadas em meio de cultura BHI obtendo-se as seguintes concentrações de extrato proteico em cultura bacteriana: 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL e 7,81 µg/mL, criando-se um fator de diluição de 2 entre as sucessivas diluições. Como controlos negativos, usaram-se os respetivos tampões, utilizados na solubilização dos extratos proteicos de cada estirpe, em cultura bacteriana, preparados na proporção equivalente à concentração máxima de extrato proteico testada. Além disso o meio BHI e as culturas bacterianas (MRSA COL e VRE EF82) foram distribuídos por poços, em triplicados, para o controlo da esterilidade e para o controlo da propagação da cultura (sem influência do extrato proteico ou do tampão), respetivamente. Para cada uma das concentrações testadas foram realizados triplicados.

As placas foram incubadas a 37°C, *overnight*, e os resultados foram observados após 18 a 24h, ao fim das quais se procedeu à leitura da densidade ótica (OD) de cada poço num leitor de microplacas, *Ultra Spec3010 Pro* da *Amersham Biosciences*, a 600 nm. As absorvâncias obtidas para as diferentes

concentrações de extrato proteico testadas, foram comparadas com as absorvâncias observadas nos controlos negativos, em que se preparou a cultura bacteriana em solução tampão sem extrato proteico.

Desta forma definiu-se a concentração mínima inibitória (*minimal inhibitory concentration* MIC) como a concentração mais baixa de extrato proteico testada, capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, a concentração mais baixa de extrato em que a densidade ótica observada era inferior à densidade ótica do controlo negativo.

Capítulo 3. *Resultados e discussão*

3.1 Perfil de crescimento celular de *Streptomyces aculeolatus*- PTM-129

O estudo da fisiologia de bactérias filamentosas, como *Streptomyces*, é limitado pelo seu crescimento micelial com formação de grandes esporos de comportamento agregativo, impossibilitando a quantificação do seu crescimento através de métodos tradicionais, como a densidade ótica. Geralmente, a quantificação do crescimento destas bactérias filamentosas envolve a determinação do peso seco (Fischer & Sawers 2013). Neste sentido otimizou-se o protocolo descrito por Sejny 1991, adequando os intervalos de tempo em que se retiraram as alíquotas para determinação do peso seco ao perfil de crescimento desta bactéria bem como o tempo necessário para a estabilização do peso das alíquotas na estufa. Além disto, dado o comportamento agregativo deste tipo de bactérias o qual dificulta a obtenção de amostras homogêneas e representativas da totalidade da cultura, retiraram-se sempre alíquotas em duplicado para diminuir o erro associado a cada leitura, tendo-se realizado dois ensaios biológicos individuais. Desta forma o valor correspondente a cada leitura corresponde à média de 4 leituras resultantes de dois replicados biológicos e dois replicados técnicos.

Assim a curva de crescimento da estirpe *Streptomyces aculeolatus* PTM-129, obtida a partir da variação do peso seco ao longo do tempo, encontra-se ilustrada na figura.3.1. Pela sua análise é possível constatar que a bactéria permanece no estado de latência durante cerca de 35 horas (aproximadamente um dia e meio), a partir do qual entra na fase exponencial, a qual dura cerca de 73 horas (aproximadamente três dias). A partir daqui, apesar das oscilações do peso seco observadas, parece existir uma tendência para a constância dos valores e, por isso, admite-se que esta corresponde à fase estacionária do crescimento, que dura cerca de 72 horas, ou seja, pelo menos até ao sétimo dia após incubação.

Com base nestes resultados decidiu efetuar-se os crescimentos celulares das duas estirpes em estudo, PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus*, durante sete dias, ao final dos quais se recolheram as células para estudos proteómicos. Desta forma, garantiu-se que o momento de recolha das células corresponde ao período em que metabolismo secundário destas bactérias foi desencadeado e, por conseguinte, as proteínas envolvidas na biossíntese de metabolitos foram expressas.

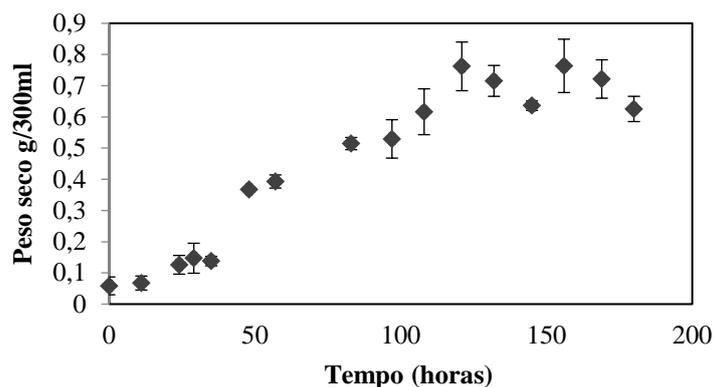


Figura 3.1. Curva de crescimento da estirpe *Streptomyces aculeolatus* PTM-129 em meio A1. Os valores apresentados representam a média de dois ensaios biológicos individuais e dois replicados técnicos.

As constantes associadas ao crescimento desta bactéria, a taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (T_d), estão representadas na Tabela 3.1, e foram calculadas a partir do traçado semi-logarítmico da fase exponencial.

Tabela 3. 1. Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (T_d) da estirpe *Streptomyces aculeolatus* PTM-129

Taxa específica de crescimento (h^{-1})	Tempo de duplicação (h)
0,0151	45,9

3.2 Proteómica Diferencial

A utilização de uma abordagem proteómica diferencial permitiu, no âmbito deste trabalho, a deteção das diferenças ao nível do padrão de expressão das proteínas, durante o metabolismo secundário das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus*, que poderão estar na base das discrepâncias observadas ao nível do metaboloma das referidas estirpes e, por conseguinte, dos seus perfis de bioatividade distintos.

Numa perspetiva diferente, a proteómica diferencial foi também utilizada na análise comparativa dos exoproteomas das estirpes em questão, no sentido de se explorar e perceber diferenças ao nível dos metabolitos de origem proteica excretados por estas bactérias, que podem constituir uma fonte promissora de novos metabolitos bioativos, até à data não explorados.

3.2.1 Proteoma total

Após a otimização do protocolo de preparação da amostra e das condições da eletroforese bidimensional, a análise das imagens dos géis 2D referentes às estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus*, através do software *Melanie 7.0*, permitiu a deteção de 448 *spots* referentes

à estirpe PTM-29 e 380 *spots* relativos à estirpe PTM-129, num intervalo pH 4-7. Note-se que estes valores representam a média de três replicados biológicos e dois replicados técnicos para cada uma das estirpes em questão. Foi possível ainda constatar a existência de uma grande abundância de proteínas de alto peso molecular, maioritariamente encontradas na gama de pH 5 – 6.

Apesar dos perfis 2D das diferentes estirpes em estudo serem bastante semelhantes entre si, com 203 *spots* comuns, dos quais 32 se encontram diferencialmente expressos nas duas estirpes (representados nas figuras 3.2 e 3.3), detetou-se igualmente um grande número de *spots* exclusivos de cada uma das estirpes: 246 *spots* exclusivos da estirpe PTM-29 e 176 *spots* exclusivos da estirpe PTM-129 (exibidos nas figuras 3.4 e 3.5). Note-se que por diferencialmente expresso, entende-se todo o *spot* que apresentou uma razão entre os volumes relativos de *spots* correspondentes exibidos em diferentes classes, superior a 2.

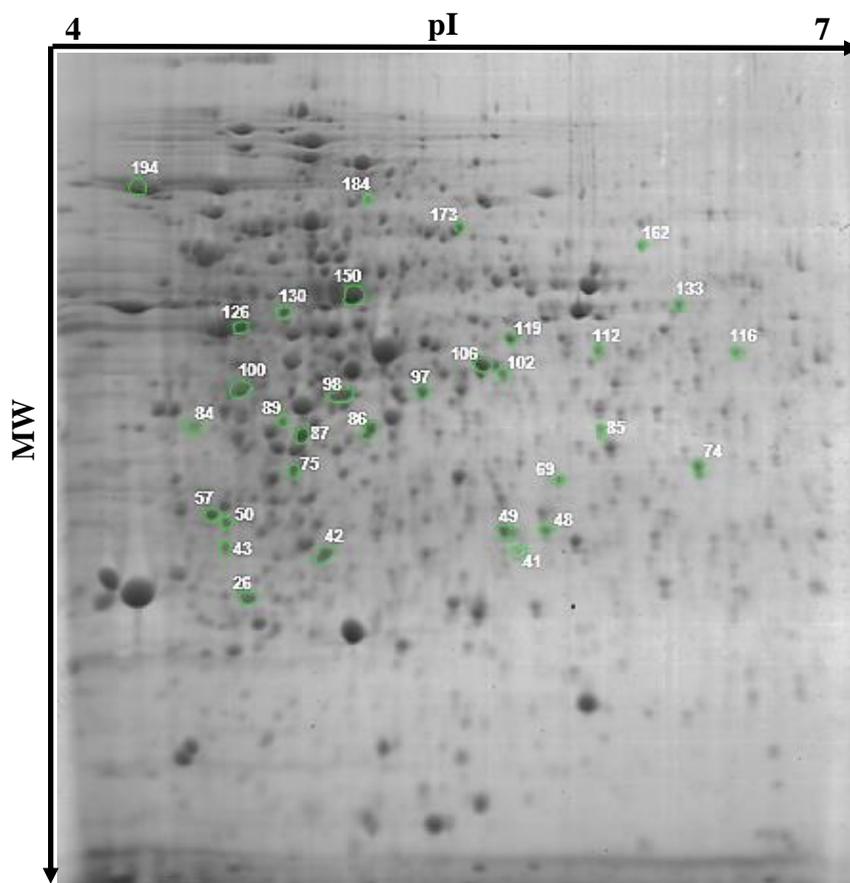


Figura 3.2. Mapa 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-129 de *S. aculeolatus*. As proteínas foram separadas em *strips* de 11 cm de pH 4 – 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados numericamente correspondem aos *spots* de proteínas diferencialmente expressas nas duas estirpes. [imagem obtida no software Melanie 7.0.]

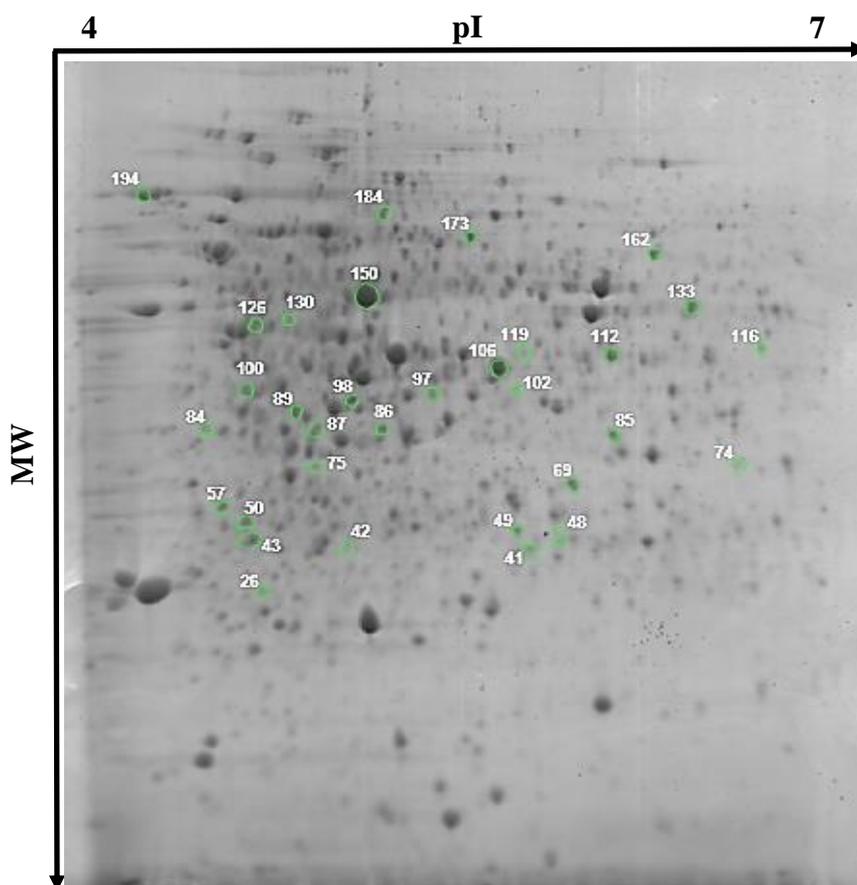


Figura 3.3. Mapa 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-29 de *S. aculeolatus*. As proteínas foram separadas em *strips* de 11 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados numericamente correspondem aos *spots* de proteínas diferencialmente expressas nas duas estirpes. [imagem obtida no software Melanie 7.0.]

A proximidade filogenética das estirpes em estudo, que apesar de pertencerem a diferentes filotipos, partilham 99% de identidade com base sequenciação do gene 16S rRNA, poderá explicar o as semelhanças observadas ao nível dos perfis 2D. Por outro lado, o facto de estas terem sido isoladas a partir de ambientes distintos, a estirpe PTM-29 isolada a partir de sedimentos recolhidos em mar aberto a 728 m de profundidade, enquanto que a estirpe PTM-129 foi isolada a partir de sedimentos recolhidos de areias superficiais na costa rochosa, a 15 m de profundidade, poderá ser a justificação mais plausível para o facto de apresentarem um grande numero de *spots* exclusivos e de alguns dos *spots* comuns entre ambas estarem diferencialmente expressos.

Ou seja, apesar de relacionadas filogeneticamente e de terem identidades muito próximas, a adaptação a diferentes ambientes, com condições extremas de pressão e temperatura, verificadas a altas profundidades, como é o caso da origem da estirpe PTM-29, poderá ter-se refletido ao nível do genoma desta estirpe, refletindo-se nas diferenças observadas nos proteomas destas bactérias e, por consequência, ao nível dos seus exoproteoma e metaboloma, como veremos na secção 3.2.2.

De facto, estas estirpes exibem perfis de bioatividade bastante discrepantes. Segundo os resultados obtidos em trabalhos que decorreram no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos”, a estirpe

PTM-29 está envolvida na síntese de vários compostos pertencentes às famílias napiradiomicinas e marinonas, demonstrando atividades antibacterianas contra MRSA COL (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e VRE EF82 (*vancomycin-resistant enterococci*) e atividade *antifouling* contra bactérias marinhas (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e *Cobetia marina*) e larvas de mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*). Quanto à estirpe PTM-129, embora ainda não se tenha realizado o fracionamento e isolamento dos compostos por HPLC, os testes biológicos realizados ao seu extrato bruto não revelaram qualquer tipo de bioatividade (Amendoeira 2016). Esta informação é bastante interessante, dada a proximidade filogenética das estirpes, tornando a estirpe PTM-129 um “modelo” para estudos proteômicos comparativos, uma vez que do seu metabolismo secundário não resultam, até à data, compostos bioativos. Desta forma a análise diferencial entre estirpes relacionadas em termos de filogenia com a referida estirpe, pode resultar na identificação de prováveis biomarcadores proteicos da síntese de metabolitos bioativos.

Neste contexto assume-se que os *spots* que se encontram sobrexpressos no proteoma da estirpe PTM-29 *Streptomyces aculeolatus*, bem como os spots exclusivos detetados na mesma estirpe PTM-29, exibidos na figura 3.4, representem possíveis biomarcadores envolvidos na síntese de metabolitos bioativos excretados por esta estirpe. Na secção 6.1, tabelas 6.1 e 6.2, são apresentados, de forma mais detalhada, dados relativos à análise diferencial dos proteomas totais das estirpes em estudo.

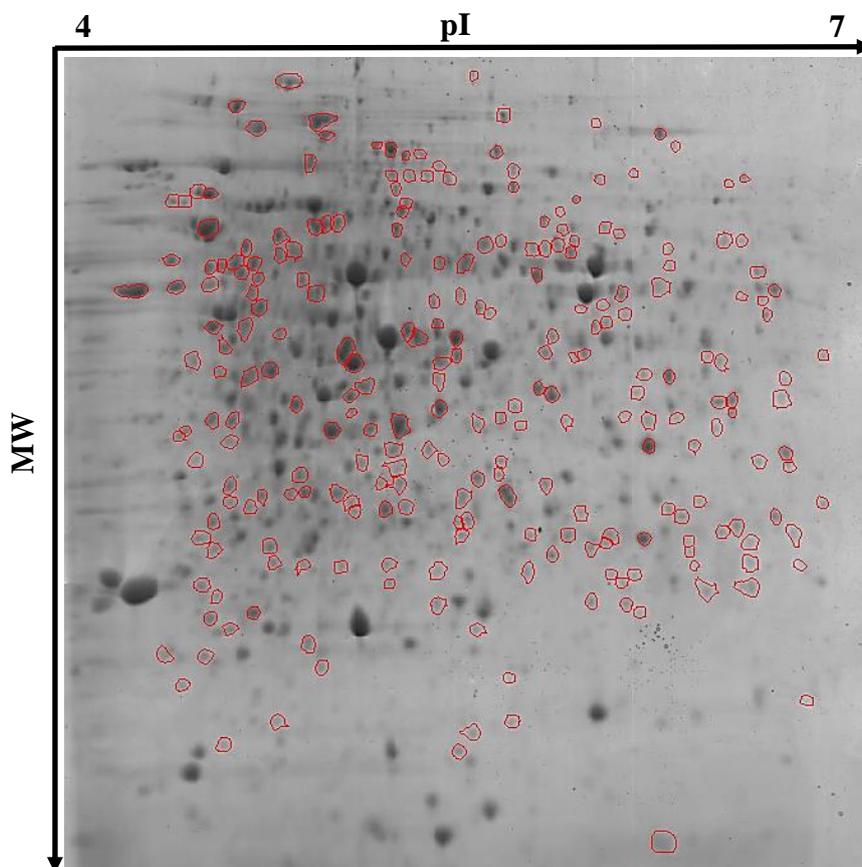


Figura 3.4. Mapa 2D do extrato proteico total das estirpes PTM-29 de *S. aculeolatus*. As proteínas foram separadas em *strips* de 11 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os spots assinalados a vermelho correspondem aos spots exclusivos de proteínas da estirpe PTM-29. [imagem obtida no *software Melanie 7.0.*]

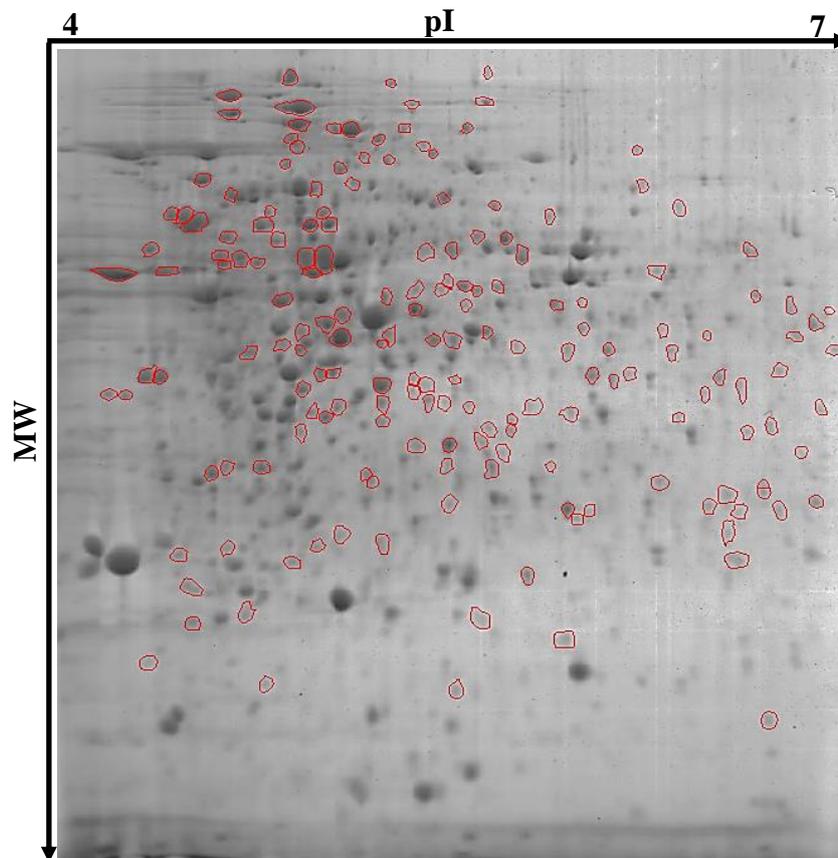


Figura 3.5. Mapa 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-129 de *S. aculeolatus*. As proteínas foram separadas em *strips* de 11 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados a vermelho correspondem aos *spots* exclusivos de proteínas da estirpe PTM-129. [imagem obtida no *software Melanie 7.0.*]

Os spots referidos acima, foram selecionados para identificação através da técnica *peptide mass fingerprint*, uma vez que muito provavelmente, alguns destes corresponderão às proteínas envolvidas na síntese dos metabolitos bioativos encontrados no metaboloma da estirpe PTM-29, nomeadamente napiradiomicinas e marinonas.

A sequenciação recente da estirpe *Streptomyces* sp. CNQ-509, relacionada filogeneticamente com as estirpes em estudo (99% de identidade segundo dados obtidos no *BLAST nucleotide*), poderia, à partida, alargar as oportunidades de investigação da maquinaria biossintética, ao permitir correlacionar as evidências observadas ao nível do metaboloma-exoproteoma/proteoma com dados relativos ao genoma (Rückert et al. 2015). No entanto, com base neste estudo, ficou provado que a percentagem de identidade baseada na sequência do gene *housekeeping* 16S rRNA deve ser encarada apenas como critério taxonómico para estudos de filogenia, uma vez que estas percentagens não são representativas do genoma total das bactérias. Com efeito, tornou-se bem evidente neste estudo que, apesar das estirpes bacterianas em questão partilharem 99% de identidade, exibem grandes diferenças ao nível do seu

proteoma e, conseqüentemente, ao nível do seu metaboloma, o que só poderá resultar de diferenças ao nível genoma destas estirpes.

Assim, a descodificação dos genomas das estirpes em estudo, é de extrema relevância para que em última estância se possam cruzar dados ao nível do metaboloma-exoproteoma/proteoma/genoma, e assim descrever no seu todo, as vias envolvidas na biossíntese destes metabolitos.

3.2.2 Exoproteoma

Os péptidos não ribossomais constituem uma vasta família de produtos naturais, incluídos na classe de metabolitos secundários, com diversas propriedades que podem incluir toxinas, antibióticos, citostáticos, sideróforos, imunossuppressores ou agentes anticancerígenos. Têm uma particularidade que os distingue dos demais péptidos, a sua síntese é independente da maquinaria ribossomal (Wang et al. 2014). Estes metabolitos são sintetizados por enzimas multimodulares que atuam simultaneamente como molde e como sintases (Singh et al. 2000). Os microrganismos marinhos têm emergido como uma fonte promissora deste tipo de compostos com estruturas e propriedades únicas potencialmente úteis para a indústria farmacêutica (Martínez-Núñez & López 2016).

Dadas as potencialidades deste tipo de metabolitos em áreas de interesse económico, realizou-se um estudo preliminar dos exoproteomas das estirpes em estudo com o objetivo de se identificar novos péptidos não ribossomais com atividades biológicas de relevo e em última análise tentar correlacionar as diferenças observadas ao nível exoproteomas com os perfis 2D correspondentes ao proteoma total.

A análise das imagens dos mini géis 2D correspondentes à fração extracelular das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *S. aculeolatus*, revelou a existência de perfis 2D bastante diferentes, tendo-se detetado 79 *spots* na estirpe PTM-129 e 92 *spots* na estirpe PTM-29. Sendo que estes valores são representativos da média de 1 replicado biológico e 3 replicados técnicos realizados para cada estirpe. Além de revelar uma grande abundância de proteínas de baixo peso molecular foi possível, curiosamente, constatar a existência de espécies proteicas com alto peso molecular, encontradas num amplo intervalo de pH dentro da janela de pH analisada (pH 4-7).

A análise estatística permitiu a deteção de 25 *spots* comuns, dos quais 10 estavam diferencialmente expressos nas duas estirpes tal como apresentado nas figuras 3.6 e 3.7. Na secção 6.2, tabelas 6.3 e 6.4, é apresentada informação mais detalhada da análise diferencial relativa aos exoproteomas das estirpes em estudo.

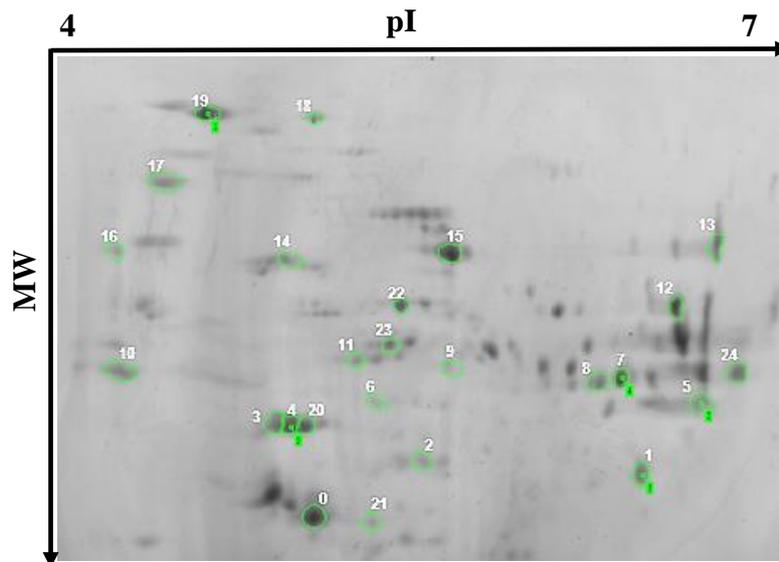


Figura 3.6. Mapa 2D do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29 de *S.aculeolatus*. As proteínas foram separadas em *strips* de 7 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados numericamente correspondem aos *spots* comuns de proteínas, sendo que os *spots* assinalados com os numeros 0, 6, 7, 8, 15, 16, 17, 19, 20 e 21 encontram-se diferencialmente expressos nas duas estirpes. [imagem obtida no *software Melanie 7.0.*]

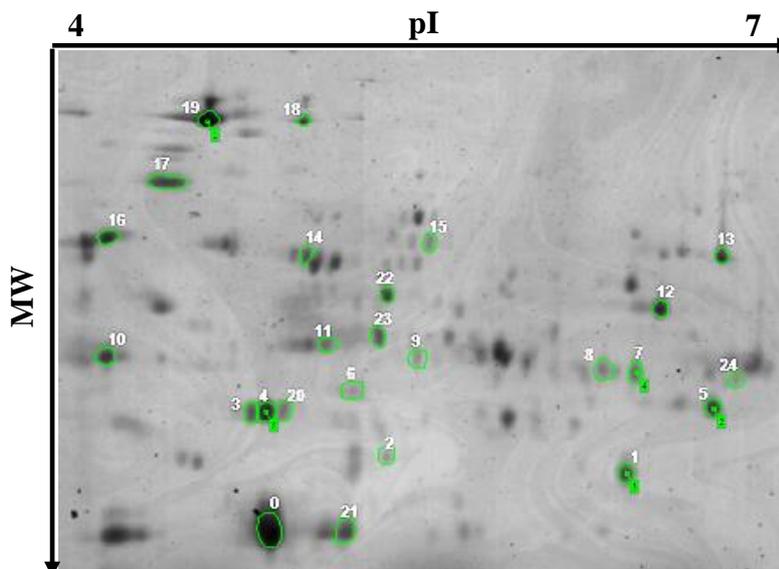


Figura 3.7. Mapa 2D do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129 de *S.aculeolatus*. As proteínas foram separadas em *strips* de 7 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados numericamente correspondem aos *spots* comuns de proteínas, sendo que os *spots* assinalados com os numeros 0, 6, 7, 8, 15, 16, 17, 19, 20 e 21 encontram-se diferencialmente expressos nas duas estirpes. [imagem obtida no *software Melanie 7.0.*]

O numero de *spots* comuns deve apontar para algumas semelhanças ao nível do seu perfil de bioatividade, no que diz respeito ao exoproteoma, até agora não explorado, e o facto de algumas destas proteínas estarem diferencialmente expressas deverá resultar das diferenças relativas aos ambientes de onde foram isoladas as diferentes estirpes.

Embora existam semelhanças, como foi possível constatar anteriormente, os perfis 2D observados são marcadamente distintos, demonstrando uma grande diversidade de espécies proteicas, com 54 *spots* exclusivos da estirpe PTM-129 e 67 *spots* verificados apenas na estirpe PTM-29 (assinalados nas figuras 3.8 e 3.9), que poderão presumivelmente ser novos péptidos não ribossomais, e por isso a investigação dos exoproteomas tanto ao nível da sua bioatividade como ao nível da sua maquinaria biossintética, é de elevado interesse, dado o potencial já demonstrado por este tipo de metabolitos.

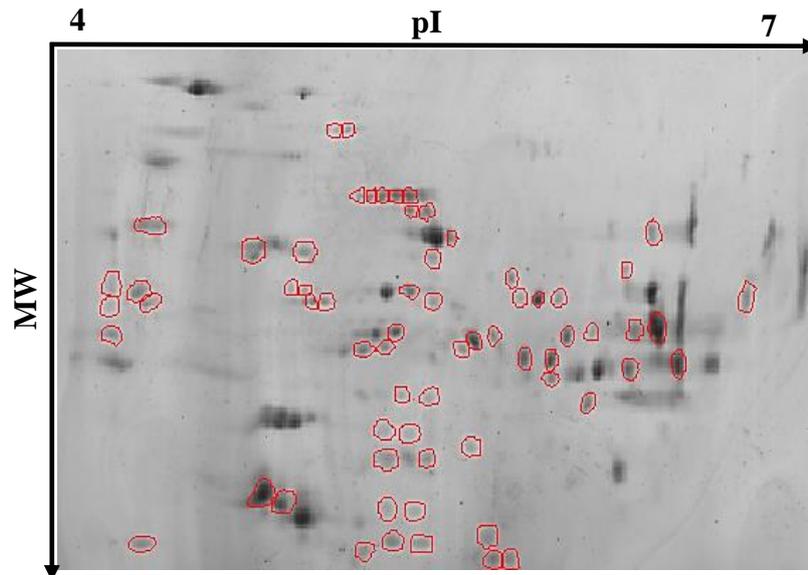


Figura 3.8. Mapa 2D do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29 de *S.aculeolatus*. As proteínas foram separadas em *strips* de 7 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados a vermelho correspondem aos *spots* exclusivos de proteínas desta estirpe. [imagem obtida no *software Melanie 7.0.*]

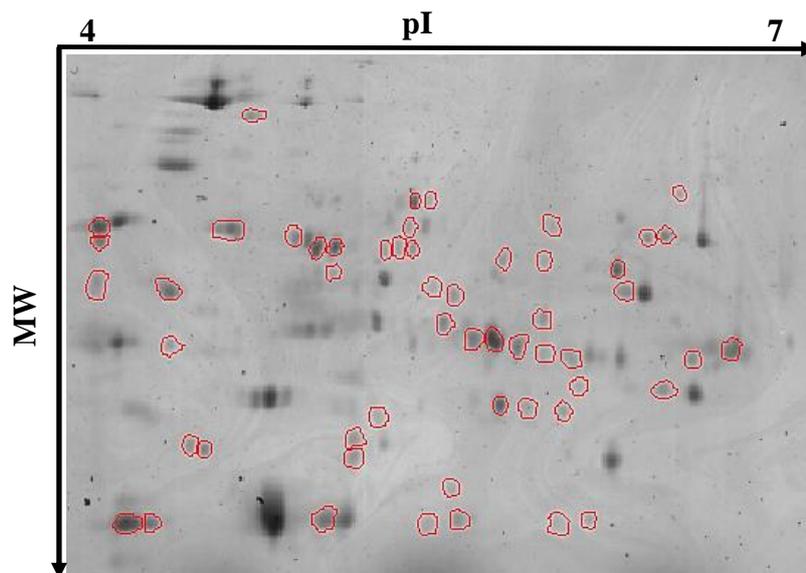


Figura 3.9. Mapa 2D do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129 de *S.aculeolatus*. As proteínas foram separadas em *strips* de 7 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados a vermelho correspondem aos *spots* exclusivos de proteínas encontrados nesta estirpe. [imagem obtida no *software Melanie 7.0.*]

Pela análise dos exoproteomas é possível ainda constatar a existência espécies proteicas aproximadamente com a mesma massa molecular e com diferentes pontos isoelétricos, as quais poderão representar isoformas da mesma proteína e derivadas do mesmo ORF (*open reading frame*). Este fenómeno já foi observado no metabolismo secundário de outros microrganismos, nomeadamente em *Streptomyces coelicolor* e *Amycolatopsis balhimycina*, sendo resultado modificações pós-traducionais, pela ligação covalente específica de pequenos adutos (fosforilação, glicosilação, acetilação) (Gallo et al. 2010; Hesketh et al. 2002).

Prioritariamente, selecionaram-se para identificação, segundo a técnica referida acima, *spots* de proteína de baixos pesos moleculares, uma vez que os péptidos não ribossomais exibem, geralmente, dimensões reduzidas. Por outro lado, a identificação de proteínas com pesos superiores a 200 kDa nos proteomas totais das estirpes, poderá permitir a deteção simultânea das proteínas envolvidas na síntese deste tipo de metabolitos (Chen et al. 2013).

3.3 Ensaio antimicrobianos: exoproteoma

Dada a grande diversidade de entidades proteicas observadas ao nível dos exoproteomas das estirpes em estudo, que poderão, presumivelmente, representar um novo conjunto de péptidos não ribossomais, até à data não explorados, realizou-se um bioensaio preliminar, para o *screening* de espécies proteicas bioativas presentes nestes extratos. Para o efeito, e dado que se tratou de uma nova abordagem no nosso laboratório, teve-se como base de partida o procedimento usado para o *screening* de metabolitos orgânicos bioativos, guiados por bioensaios antimicrobianos de extratos brutos, os quais são obtidos após a extração com solventes orgânicos das culturas celulares.

Neste contexto, procedeu-se à separação das fases orgânica e aquosa dos meios de cultura das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *S. aculeolatus*. Tendo-se descartado, as fases orgânicas e recolhido a fase aquosa para os subseqüentes ensaios.

Neste sentido, primeiramente, procedeu-se à concentração, das alíquotas de fase aquosa através da liofilização, as quais foram posteriormente ressuspensas, em várias soluções tampão.

Com o objetivo de avaliar qual o pH mais adequado para a solubilização dos extratos proteicos, realizaram-se eletroforeses desnaturantes de proteína (1D), as respetivas imagens encontram-se ilustradas na figura 3.10.

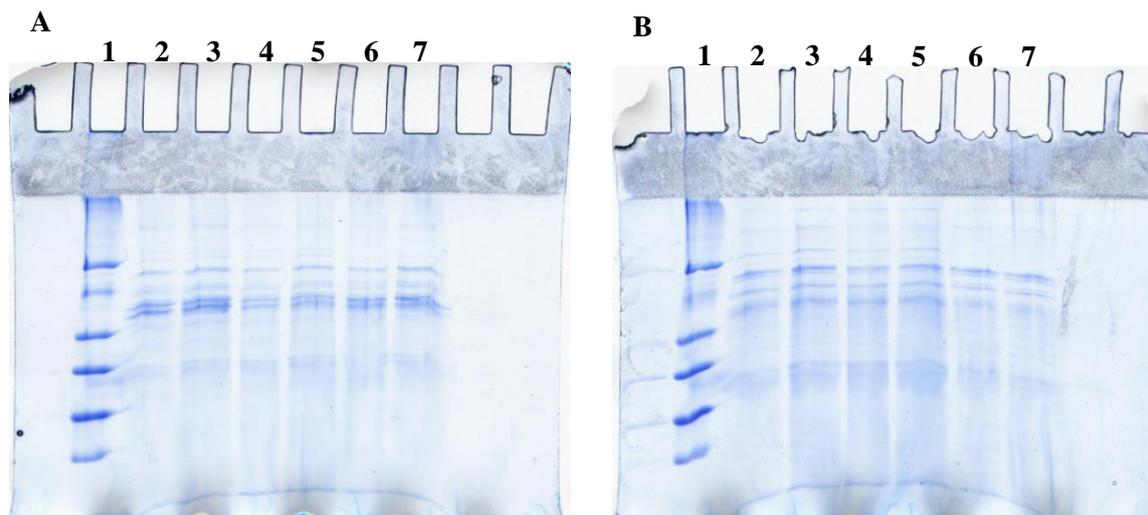


Figura 3.10. SDS-PAGE (1D) dos extratos proteicos extracelulares, das estirpes PTM-29 e PTM-129, após liofilização e ressuspensão nos diferentes tampões. No gel **A** foram aplicadas as amostras do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29: no poço 1 foi adicionado marcador de peso molecular, nos poços 2 e 3 foram aplicados 6 e 10 μ l, respectivamente, de extrato proteico dissolvido em 0,05M tampão MES pH5,5, nos poços 4 e 5 foram aplicados os mesmos volumes, de extrato proteico solubilizados em 0,05M de tampão fosfato pH 7, e por fim nos poços 6 e 7 aplicaram-se os mesmos volumes de extrato proteico mas dissolvidos em 0,05M de tampão Tris-HCl a pH 8,8. No gel **B** aplicaram-se as amostras do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129 seguindo-se exatamente a mesma ordem de volumes e tampões usados.

Pela análise das imagens, é possível constatar, através da observação das várias bandas de proteínas nos géis, que pelo menos uma grande fração das espécies proteicas extracelulares são solúveis na fase aquosa. Tornou-se ainda evidente que o pH não tem uma influência significativa na solubilização dos extratos proteicos uma vez que não se verificam grandes diferenças na intensidade das bandas proteicas correspondentes, entre as amostras solubilizadas nos diferentes tampões.

Posto isto, procedeu-se à quantificação da proteína presente nos extratos proteicos extracelulares das referidas estirpes, solubilizados nas diferentes soluções tampão. Visto que o pH não tem uma influência evidente na solubilização das proteínas destes extratos, escolheram-se os extratos proteicos mais concentrados. Assim sendo, para os testes biológicos contra MRSA COL e VRE EF82, partiu-se de uma concentração de 0,42 μ g/ μ l de proteína do extrato proteico da estirpe PTM-129, solubilizado em 0,05M de tampão fosfato pH 7, e de uma concentração de 0,32 μ g/ μ l de proteína no extrato proteico da estirpe PTM-29, dissolvida em 0,05M de tampão Tris-HCl a pH 8,8.

Os testes biológicos, contra as duas estirpes multirresistentes, MRSA COL e VRE EF82, foram realizados com base no protocolo *standard* estabelecido para os bioensaios de metabolitos orgânicos. Assim, pipetaram-se os volumes apropriados de cada um dos extratos para uma concentração máxima de 250 μ g/mL de extrato proteico em cultura bacteriana, a partir da qual se fizeram diluições seriadas em meio de crescimento apropriado para a propagação das estirpes bacterianas, tendo-se testado várias concentrações, com o objetivo de identificar o valor de MIC (concentração mínima inibitória) de cada um dos extratos proteicos testados contra MRSA COL e VRE EF82. Os gráficos correspondentes aos

ensaios biológicos dos exoproteomas das estirpes PTM-29 e PTM-129 contra as estirpes bacterianas anteriormente referidas, encontram-se ilustrados nas figuras 3.11, 3.12, 3.13 e 3.14.

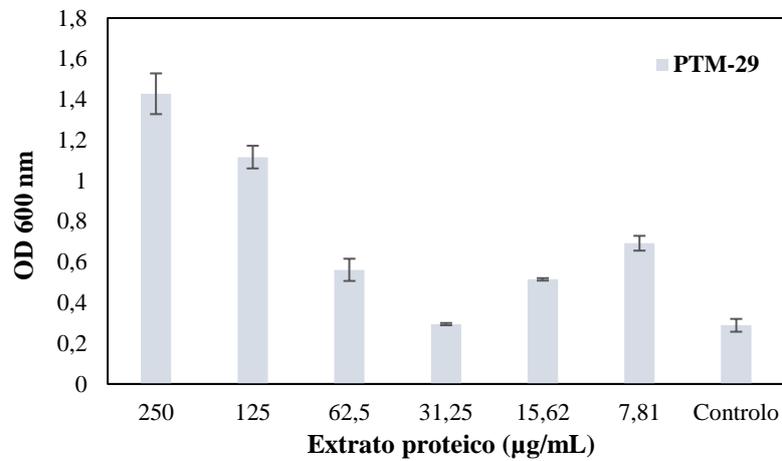


Figura 3.11. Teste biológico do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29, contra VRE EF82 (*vancomycin - resistant enterococci*), como controlo usou-se a cultura bacteriana, VRE, em 0,05M de tampão fosfato a pH 7. Os valores apresentados para cada concentração, bem como para o controlo, correspondem à média de triplicados.

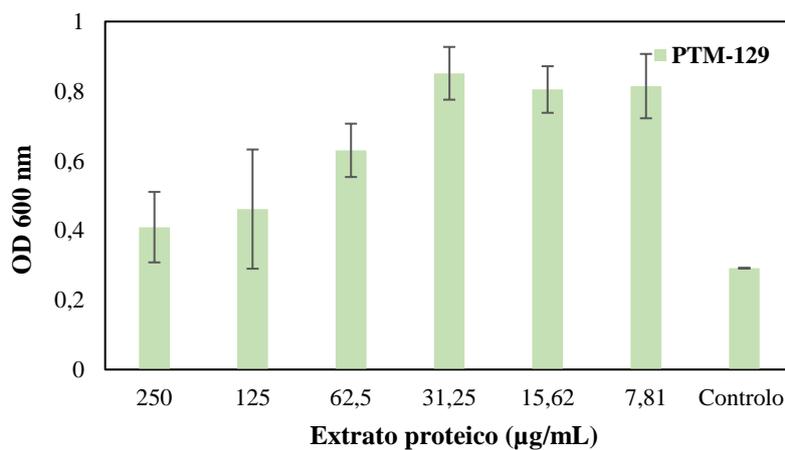


Figura 3.12. Teste biológico do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129, contra VRE EF82 (*vancomycin - resistant enterococci*), como controlo usou-se a cultura bacteriana, VRE, em 0,05M de tampão tris-HCl a pH 8,8. Os valores apresentados para cada concentração, bem como para o controlo, correspondem à média de triplicados.

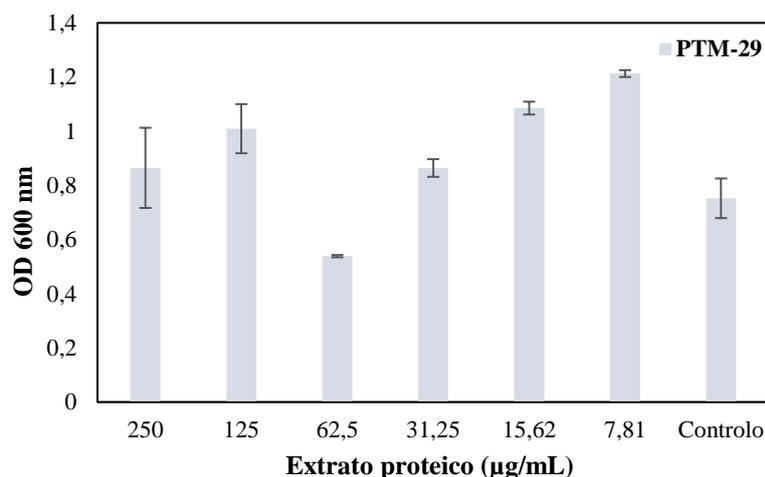


Figura 3.13. Teste biológico do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-29, contra MRSA COL (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), como controlo usou-se a cultura bacteriana, MRSA, em 0,05M de tampão fosfato a pH 7. Os valores apresentados para cada concentração, bem como para o controlo, correspondem à média de triplicados.

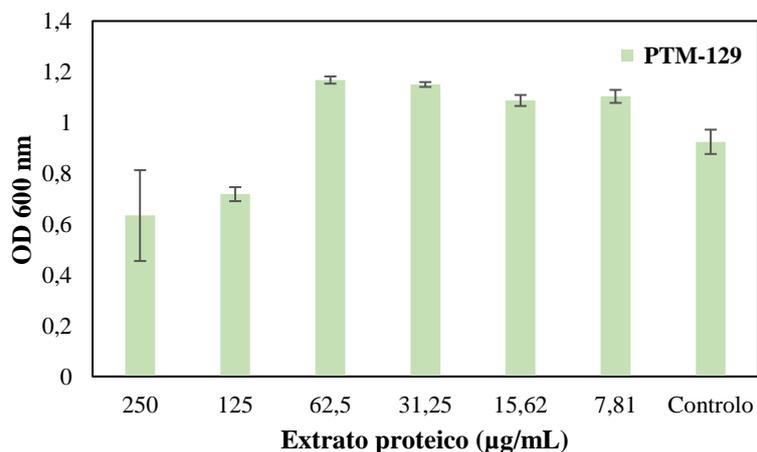


Figura 3.14. Teste biológico do extrato proteico extracelular da estirpe PTM-129, contra MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), como controlo usou-se a cultura bacteriana, MRSA, em 0,05M tris-HCl a pH 8,8. Os valores apresentados para cada concentração, bem como para o controlo, correspondem à média de triplicados

Tal como referido acima, a MIC foi definida como concentração mínima de extrato proteico testada, capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para tal fizeram-se controlos, para cada um dos ensaios, contendo a cultura bacteriana suspensa nos tampões utilizados na solubilização dos extratos proteicos, na mesma proporção usada na preparação da concentração máxima de extrato proteico testada, de forma a reproduzir as mesmas condições de crescimento. Assim, por comparação das densidades óticas obtidas às várias concentrações de extrato proteico testadas com a densidade ótica observada no controlo, é possível, inferir se houve ou não inibição do crescimento bacteriano. Uma vez que no poço controlo a cultura bacteriana crescerá sem qualquer influência, sempre que a OD, obtida às diferentes concentrações de extrato proteico testadas for inferior à OD observada no controlo realizado para cada ensaio, assume-se que houve inibição do crescimento bacteriano.

Assim sendo, à partida, pela análise dos gráficos, é possível deduzir que as estirpes PTM-29 e PTM-129 não apresentam atividade contra VRE EF82, uma vez que às concentrações de extrato testadas a OD (densidade ótica) foi sempre superior à OD verificada no controlo. Relativamente ao ensaio contra MRSA COL, as estirpes PTM-29 e PTM-129 revelaram-se ativas com valores de MIC de 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, respetivamente.

Contudo, tratando-se de um ensaio preliminar, os resultados são meramente indicativos. Dadas as baixas concentrações iniciais de proteína dos extratos proteicos testados, os volumes adicionados para se obter a concentração inicial de 250 µg/mL de extrato proteico em cultura bacteriana, num volume total de 200 µl, foram muito superiores, à percentagem máxima de volume de extrato bruto recomendada para estes bioensaios, a qual não deve ultrapassar 10% do volume total. A turbidez dos inóculos bacterianos em teste, deve ser ajustada para 0,5 da escala de *McFarland* e, devido ao facto de se terem adicionado grandes volumes de extrato proteico ao inóculo, a densidade de células da cultura bacteriana foi muito diluída, não respeitando, por conseguinte, as condições padronizadas estabelecidas pela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para dar início ao ensaio, por esta razão os resultados são de cariz indicativo e carecem de otimização e repetição, em condições padronizadas (Balouiri et al. 2015).

É expectável que ao se usarem concentrações de extrato proteico mais elevadas, novas atividades biológicas possam ser detetadas. No entanto, dada a diferente natureza dos mecanismos de atuação destas entidades proteicas quando comparada com os metabolitos orgânicos bioativos, não é de se excluir a hipótese de os valores de MIC relativos aos primeiros assumirem valores inferiores aos tipicamente registados pelos extratos orgânicos. Por isso, a otimização do ensaio poderá passar por testar novas janelas de concentração de extrato proteico, tendo sempre em consideração as normas estabelecidas pela CLSI.

Capítulo 4. Conclusões e perspectivas futuras

A abordagem proteômica diferencial aplicada à análise dos proteomas totais das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *S. aculeolatus*, permitiu constatar a existência de perfis 2D com padrões de expressão bastante similares. Em particular, detetaram-se 203 *spots* de proteínas comuns, o que já era expetável dada a proximidade filogenética das estirpes em estudo que partilham 99% de identidade, com base na sequência do gene 16S rRNA. Por outro lado, observou-se uma grande diversidade de *spots* exclusivos de proteínas, em cada uma das estirpes em estudo, o que poderá ser resultado da adaptação das bactérias a diferentes ambientes. Com base nos perfis de bioatividade das estirpes bacterianas em estudo, estabeleceu-se a estirpe PTM-129, como estirpe de referência. Uma vez que do seu metabolismo secundário não resultam metabolitos bioativos, a análise diferencial dos proteomas das duas estirpes em questão pode revelar a existência de possíveis biomarcadores da síntese de metabolitos bioativos do metaboloma da PTM-29. Neste contexto, conclui-se que os *spots* diferencialmente expressos nas duas estirpes bem como os *spots* exclusivos do proteoma da estirpe PTM-29, representem possíveis biomarcadores da síntese dos metabolitos secundários sintetizados por esta última, nomeadamente metabolitos da família das napiradiomicinas e marinonas.

Adicionalmente, decidiu-se explorar o exoproteoma destas estirpes, uma vez que as actinobactérias, particularmente, o género *Streptomyces* são microrganismos reconhecidos por sintetizarem péptidos não ribossomais. A análise dos exoproteomas das estirpes em estudo revelou uma grande diversidade de espécies proteicas extracelulares, não só de baixo peso molecular como seria esperado, mas, curiosamente, também de alto peso molecular. Os perfis 2D dos exoproteomas das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *S. aculeolatus* são marcadamente distintos, tendo se observado apenas 25 *spots* de proteínas comuns, e um grande número de *spots* exclusivos de cada uma das estirpes: 54 *spots* exclusivos da estirpe PTM-129 e 67 da estirpe PTM-29. Esta observação poderá revelar, à partida, um perfil de bioatividade diferente ao nível destas frações proteicas.

A identificação das proteínas, por espectrometria de massa, seria o próximo passo deste trabalho. Perante as conclusões obtidas, seria pertinente, como trabalho futuro, a identificação das proteínas sobrexpressas e exclusivas detetadas no proteoma total da estirpe PTM-29, uma vez que estas poderão provavelmente constituir o conjunto de proteínas biossintéticas que estão na base do metaboloma desta estirpe. A identificação das espécies proteicas encontradas nos exoproteomas destas estirpes, particularmente das que exibem baixos pesos moleculares, seria também interessante, uma vez que poderá ser resultar na identificação de novos péptidos não ribossomais. Adotando uma abordagem inversa, a identificação das proteínas com pesos moleculares superiores a 200kDa ao nível dos proteomas totais das referidas estirpes, seria útil para a deteção da síntese de péptidos não ribossomais e, simultaneamente, para conhecimento da maquinaria biossintética, uma vez que estes metabolitos são

sintetizados por enzimas multimodulares, geralmente, por espécies proteicas com pesos moleculares situados acima dos 200 kDa.

A identificação das proteínas, bem como a descodificação total do genoma das estirpes em estudo é fundamental para que se possam estabelecer correlações entre o metaboloma-exoproteoma/proteoma /genoma destas estirpes. O alcance final deste trabalho seria, assim, o entendimento das vias biossintéticas e dos mecanismos de regulação, bem como a identificação dos genes biossintéticos, para que a síntese destes metabolitos possa beneficiar de outras tecnologias como, a biologia sintética, a expressão heteróloga e outras metodologias da engenharia genética, que permitam a produção destes metabolitos em larga escala.

O estudo comparativo destas estirpes com outras estirpes obtidas a partir de sedimentos oceânicos do Arquipélago da Madeira que estão a ser estudadas paralelamente em trabalhos de dissertação de mestrado, será também útil para que se possa, eventualmente, reconhecer padrões de expressão comuns que nos permitam estabelecer relações entre filogenia e função, no que diz respeito à bioatividade.

Dada a diversidade de entidades proteicas encontradas ao nível dos exoproteomas das estirpes em estudo, que poderão representar uma fonte de novos metabolitos bioativos, decidiu-se testar o potencial antimicrobiano destes extratos proteicos, contra duas estirpes multirresistentes: MRSA COL e VRE EF82. Tratando-se de um estudo preliminar, reproduziu-se o procedimento utilizado para os testes antimicrobianos de extratos brutos de metabolitos orgânicos, baseados em bioensaios em placas de 96 poços. No entanto, as concentrações muito baixas de proteína nestes extratos, foram, nas condições testadas, um fator limitante, sendo que os resultados obtidos são de cariz indicativo, uma vez que não foram respeitadas as condições padronizadas estabelecidas para estes bioensaios. O trabalho futuro passará por a otimização das condições do bioensaio, nomeadamente testando-se novas concentrações destes extratos, e a realização de testes de suscetibilidade antimicrobianos, qualitativos, como os testes de difusão em agar através de discos ou poços, para a confirmação dos resultados obtidos.

Capítulo 5. Referências bibliográficas

- Abdelmohsen, U.R. et al., 2015. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology advances*, 33(6), pp.798–811.
- Ahmad, I., Ahmad, F. & Pichtel, J., 2011. *Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications*, pp.1-516
- Almeida, M.G., Rodrigues, C. & Lampreia, J., 2001. Proteomas: a interface entre a biologia molecular e a bioquímica das proteínas, pp.49–56.
- Amendoeira, A., 2016. *Isolamento de metabolitos secundários produzidos por actinobactérias marinhas Streptomyces aculeolatus e avaliação das suas propriedades antimicrobianas*, Faculdade de Ciências e Tecnologias-Universidade Nova de Lisboa
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S., 2015. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, pp.71-79
- Banik, J.J. & Brady, S.F., 2010. Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), pp.603–609.
- Banskota, A.H. et al., 2006. Isolation and Identification of Three New 5-Alkenyl-3,3(2H) -furanones from Two Streptomyces species using a Genomic Screening Approach. *The Journal of Antibiotics*, 59(3), pp.168–176.
- Barka, E.A. et al., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), pp.1–43.
- Bibb, M., 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 43(114), pp.437–458.
- Bull, A.T., Ward, A.C. & Goodfellow, M., 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), pp.573-606
- Bumpus, S.B. et al., 2009. A Proteomics Approach to Discovery of Natural products and Their Biosynthetic Pathways. *Nature biotechnology*, 27(10), pp.951–956.
- Busti, E. et al., 2006. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology*, 152(3), pp.675–683.

Chen, Y. et al., 2013. A Proteomic Survey of Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis in Actinobacteria. *Journal of proteome research*, 11(1), pp.85–94.

Das, M., Royer, T. V. & Leff, L.G., 2007. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), pp.756–767.

Das, S., Lyla, P.S. & Khan, S.A., 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*, 90(10).

Dash, H.R. et al., 2013. Marine bacteria: Potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), pp.561–571.

Eustáquio, A.S. et al., 2009. Biosynthesis of the salinosporamide A polyketide synthase substrate chloroethylmalonyl-coenzyme A from S-adenosyl-L-methionine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), pp.12295–12300.

Fenical, W. & Jensen, P.R., 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology*, 2(12), pp.666–673.

Fischer, M. & Sawers, R.G., 2013. A universally applicable and rapid method for measuring the growth of *Streptomyces* and other filamentous microorganisms by methylene blue adsorption-desorption. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), pp.4499–4502.

Gallagher, K.A. et al., 2013. Phylogenetic and Chemical Diversity of a Hybrid-Isoprenoid-Producing *Streptomyces* Lineage. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), pp.6894–6902.

Gallagher, K.A., Fenical, W. & Jensen, P.R., 2010. Hybrid isoprenoid secondary metabolite production in terrestrial and marine actinomycetes. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(6), pp.794–800.

Gallagher, K.A. & Jensen, P.R., 2015. Genomic insights into the evolution of hybrid isoprenoid biosynthetic gene clusters in the MAR4 marine streptomyces clade. *BMC genomics*, 16(960), pp.1-13.

Gallo, G. et al., 2010. Differential proteomic analysis reveals novel links between primary metabolism and antibiotic production in *Amiclotopsis balhimycina*. *Proteomics*, 10, pp.1336–1358.

Gaudêncio, S.P. & Pereira, F., 2015. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. *Natural Product Reports*, 32(6), pp.779–810.

Gill, S. R. et al., 2005. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-

Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *Journal of Bacteriology*, 187(7), pp.2426–2438.

Gorg, A., 2004. *2-D Electrophoresis. Principles and Methods*, GE Healthcare, pp.1-163

Handelsman, J., 2004. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), pp.669–685.

Hayakawa, M., 2008. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica*, 22(1), pp.12–19.

Hesketh, A.R. et al., 2002. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 46(4), pp.917–932.

Heuer, H. et al., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), pp.3233–3241.

Hoover, C.A., Slattery, M. & Marsh, A.G., 2007. A functional approach to transcriptome profiling: Linking gene expression patterns to metabolites that matter. *Marine Biotechnology*, 9(4), pp.411–419.

Jabbour, R.E. et al., 2006. Comparative Proteomics of Tandem Mass Spectrometry Analyses for Bacterial Strains Identification and Differentiation. In *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles*.

Jensen, P.R. et al., 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. In *Antonie van Leeuwenhoek*. pp. 43–48.

Kennedy, J. et al., 2010. Marine metagenomics: New tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. *Marine Drugs*, 8(3), pp.608–628.

Khanna, M., Solanki, R. & Lal, R., 2011. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 2(3), pp.357–375.

Kodzius, R. & Gojobori, T., 2015. Marine metagenomics as a source for bioprospecting. *Marine Genomics*, 24(1), pp.21–30.

Lacerda, C.M.R. & Reardon, K.F., 2009. Environmental proteomics: Applications of proteome profiling in environmental microbiology and biotechnology. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 8(1), pp.75–87.

Lam, K.S., 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), pp.245–251.

Van Lanen, S.G. & Shen, B., 2006. Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), pp.252–260.

Lautru, S. et al., 2005. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature chemical biology*, 1(5), pp.265–269.

Lima Procópio, R.E. et al., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), pp.466–471.

Lombó, F. et al., 2006. Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. *ChemBioChem*, 7(2), pp.366–376.

Magarvey, N.A. et al., 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), pp.7520–7529.

Maldonado, L.A. et al., 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), pp.1759–1766.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., et al., 2013. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological Research*, 168(6), pp.311–332.

Manivasagan, P. et al., 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 169(4), pp.262–278.

Manivasagan, P., Venkatesan, J. & Kim, S.-K. kim, 2013. Introduction to Marine Actinobacteria. In *Microbiology: bioactive compounds and biotechnological applications*. pp. 1–19.

Manteca, A. & Sanchez, J., 2010. *Streptomyces* developmental cycle and secondary metabolite production. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), pp.560–566.

Maron, P.A. et al., 2007. Metaproteomics: A new approach for studying functional microbial ecology. *Microbial Ecology*, 53(3), pp.486–493.

Martínez-Núñez, M. A. & López, V.E.L., 2016. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes*, 4(13), pp.1-8.

Meena, B. et al., 2013. Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts. *BMC microbiology*, 13(1), pp.1-17.

Mincer, T.J. et al., 2002. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), pp.5005–5011.

Monciardini, P. et al., 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *Microbiology Ecology*, 42, pp.419-429.

Newman, D. & Cragg, G., 2012. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), pp.311–335.

Ongley, S.E. et al., 2013. Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. *Natural product reports*, 30(8), pp.1121–38.

Piel, J. et al., 2000. Cloning, sequencing and analysis of the enterocin biosynthesis gene cluster from the marine isolate “*Streptomyces maritimus*”: Evidence for the derailment of an aromatic polyketide synthase. *Chemistry and Biology*, 7(12), pp.943–955.

Rabilloud, T. & Lelong, C., 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*, 74(10), pp.1829–1841.

Rocha-Martin, J. et al., 2014. Emerging strategies and integrated systems microbiology technologies for biodiscovery of marine bioactive compounds. *Marine Drugs*, 12(6), pp.3516–3559.

Rückert, C. et al., 2015. Complete genome sequence of *Streptomyces* sp. CNQ-509, a prolific producer of meroterpenoid chemistry. *Journal of Biotechnology*, 216, pp.140–141.

Santos, P.M., Teixeira, M.C. & Sá-correia, I., 2004. A Análise Proteómica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. *Boletim de Biotecnologia*, 6, pp.1–17.

Schneider, T. & Riedel, K., 2010. Environmental proteomics: Analysis of structure and function of microbial communities. *Proteomics*, 10(4), pp.785–798.

Sejiny, M.J., 1991. Growth Phases of Some Antibiotics Producing Streptomyces and their Identification. *Journal of King Abdulaziz University*, 3, pp.21–29.

Singh, R.K. et al., 2000. Nonribosomal peptide synthesis in microbes. *Recent Advances in Microbiology*, 1, pp.183–194.

Subramani, R. & Aalbersberg, W., 2012. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167(10), pp.571–580.

Tomasz, A. & Mato, R., 1996. Multiplicity of Genetic Backgrounds among Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* Isolates Recovered from an Outbreak in a New York City Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 2(3).

Trindade, M. et al., 2015. Targeted metagenomics as a tool to tap into marine natural product diversity for the discovery and production of drug candidates. *Frontiers in Microbiology*, 6, pp.1–14.

Valan, A.M. et al., 2012. Characterization and phylogenetic analysis of novel polyene type antimicrobial metabolite producing actinomycetes from marine sediments: Bay of Bengal India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(10), pp.803–810.

Valli, S. et al., 2012. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(6), pp.469–73.

Vasanthabharathi, V., Lakshminarayanan, R. & Jayalakshmi, S., 2011. Melanin production from marine Streptomyces. *African Journal of Biotechnology*, 10(54), pp.11224–11234.

Ventura, M. et al., 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3), pp.495–548.

Wang, H. et al., 2014. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), pp.9259–9264.

Watve, M.G. et al., 2001. How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces? *Archives of Microbiology*, 176(5), pp.386–390.

Wawrik, B. et al., 2005. Identification of Unique Type II Polyketide Synthase Genes in Soil Identification of Unique Type II Polyketide Synthase Genes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), pp.2232–2238.

Van Wezel, G.P. & McDowall, K.J., 2011. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural Product Reports*, 28(7), pp.1311-1333.

Wilkins, M.R. et al., 1996. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, pp.19–50.

Wilkinson, B. & Micklefield, J., 2007. Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nature Chemical Biology*, 3(7), pp.379–386.

Wilmes, P. & Bond, P.L., 2004. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environmental Microbiology*, 6(9), pp.911–920.

Xu, Y. et al., 2010. Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. *Bioresource Technology*, 101(4), pp.1331–1336.

Yebra, D.M., Kiil, S. & Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2), pp.75–104.

Zazopoulos, E. et al., 2003. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nature biotechnology*, 21(2), pp.187–190.

Zotchev, S.B., 2012. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *Journal of Biotechnology*, 158(4), pp.168–175.

Capítulo 6. *Anexos*

Anexo I

Tabela 6.1 Resultados da análise diferencial dos proteomas totais das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus* (nº de spots totais, comuns, diferencialmente expressos e exclusivos).

Análise diferencial: proteoma total					
Spots comuns	Spots diferencialmente expressos	Spots exclusivos		Número total spots	
		PTM-29	PTM-129	PTM-29	PTM-129
203	32	246	176	448	380

Tabela 6.2 Análise dos spots diferencialmente expressos detetados nos proteomas totais das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatu* (*match ID*, volume relativo do spot, *Fold change*, *ANOVA*, *overexpression*).

Match ID	Volume relativo do spot		Fold	ANOVA	Overexpression
	PTM-29	PTM-129			
41	0,0811637	0,0395162	2,05393	1.60406e-5	<i>S. aculeolatus</i> PTM-29
43	0,393398	0,154697	2,54302	0.00411414	
50	0,294775	0,146312	2,01471	0.0136185	
69	0,210869	0,0841155	2,50689	2.682e-5	
85	0,149702	0,0604077	2,4782	2.90168e-7	
89	0,26829	0,127045	2,05305	0.0418204	
106	1,26793	0,567886	2,23272	0.0045682	
112	0,307167	0,0923602	3,32575	5.91524e-5	
133	0,281675	0,129904	2,16833	6.04216e-4	
150	3,65107	1,80652	2,02105	5.1582e-4	
162	0,218543	0,0563633	3,8774	2.34054e-5	
173	0,213106	0,103013	2,06872	0.00626593	
184	0,243768	0,0674526	3,61391	0.00529138	
26	0,0767236	0,230187	3,00021	0.00342782	
42	0,0702112	0,491816	7,0048	9.43521e-8	
48	0,054443	0,119206	2,18773	0.0279975	
49	0,0837538	0,376577	4,49624	1.33504e-7	
57	0,127564	0,388786	3,04777	0.00106659	
74	0,0310088	0,148443	4,78712	9.67547e-4	
75	0,086404	0,290332	3,36017	1.49395e-6	
84	0,0803537	0,173344	2,15727	4.51412e-5	
86	0,172496	0,482579	2,70763	4,92333e-7	
87	0,22104	0,778178	3,51952	1.63454e-5	
97	0,130633	0,292153	2,23644	0.0111657	
98	0,354112	1,31252	3,70652	2.82436e-8	
100	0,21426	0,470311	2,19505	4.01338e-4	
102	0,0298407	0,145135	4,86365	1.23121e-4	
116	0,0265679	0,0630212	2,37208	0.00107442	
119	0,0589622	0,202692	3,43767	1.61973e-5	
126	0,204574	0,823375	4,02482	9.08183e-5	
130	0,0772132	0,209355	2,71138	1.47396e-6	
194	0,569814	1,31563	2,30888	5.89962e-6	

Anexo II

Tabela 6.3 Resultados da análise diferencial dos exoproteomas das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatus* (n° de spots totais, comuns, diferencialmente expressos e exclusivos).

Análise exoproteoma					
Spots comuns	Spots diferencialmente expressos	Spots exclusivos		Número total spots	
		PTM-29	PTM-129	PTM-29	PTM-129
25	10	67	54	92	79

Tabela 6.4. Análise dos spots diferencialmente expressos detetados nos exoproteomas das estirpes PTM-29 e PTM-129 de *Streptomyces aculeolatu* (match ID, volume relativo do spot, Fold change, ANOVA, overexpression).

Match ID	Volume relativo do spot		Fold	ANOVA	Overexpression
	PTM-29	PTM-129			
8	1,31479	0,656353	2,00317	5.60582e-6	<i>S. aculeolatus</i> PTM-29
7	2,04312	0,895222	2,28225	3.9525e-5	
15	5,25309	0,426345	12,3212	6.38701e-6	
0	5,46643	15,398	2,81683	0.00401543	<i>S. aculeolatus</i> PTM-129
6	0,270497	0,5966	2,20557	0.0497171	
16	0,540239	2,03595	3,76861	0.00237708	
17	1,35347	2,7982	2,06743	0.00394773	
19	3,68454	8,49024	2,30429	0.0289712	
20	1,73382	0,615161	2,81849	0.0114047	
21	0,578407	2,62419	4,53692	0.0360875	