

# Análise de bacteriófagos: endolisinas com peptídeo sinal e domínio signal-arrest-release

**Palavras-Chave:** bacteriófagos, endolisinas, antimicrobianos

**Autores(as):**

**Mateus Pereira Teles, IB – UNICAMP**

**Prof. Dr. Marcelo Brocchi, IB - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

Desde a introdução clínica dos antibióticos em meados de 1930, esses compostos têm influenciado positivamente na saúde humana e animal. Por mais de 80 anos, essa classe de medicamentos evitou bilhões de mortes e possibilitou grandes avanços na medicina moderna (PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013). No entanto, a evolução e a seleção natural bacteriana foram inevitáveis devido ao uso excessivo e indiscriminado desses remédios, contribuindo para um aumento global de resistências e multirresistência de diversos patógenos

Fagos ou bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e desempenham papéis importantes na ecologia e evolução das comunidades microbianas (KOSKELLA; MEADEN, 2013; POULLAIN et al., 2008) e com um número estimado de  $10^{31}$  organismos, eles são a entidade biológica mais abundante e diversa do planeta (SUTTLE, 2005). A fagoterapia, técnica que usa vírus bacterianos, apresentou-se no contexto de declínio da eficácia dos antibióticos como uma forma de tratar infecções bacterianas. Convencionalmente, a terapia fágica depende da interação patógeno-hospedeiro (fagos e bactérias, respectivamente), que ocorre durante o ciclo de infecção.

Os fagos normalmente se ligam a receptores específicos na superfície da célula bacteriana e injetam seu material genético na célula hospedeira, que pode se integrar ao genoma bacteriano, constituindo o ciclo lisogênico. E também podem utilizar a maquinaria de replicação para produção de novos vírus, que ao atingir um grande número de novos fagos, ocorrerá a lise da célula bacteriana, através de enzimas que hidrolisam a parede celular peptidoglicana, liberando novos fagos, estabelecendo, assim, o ciclo lítico (LIN; KOSKELLA; AND LIN 2017).

As enzimas líticas fágicas, conhecidas como endolisinas, despertam, dessa maneira, interesse para produção de novos agentes antimicrobianos, visto que sua ação resulta na lise celular bacteriana, ou seja, a sua morte.

Algumas endolisinas contêm domínios *signal-anchor-release* (SAR) na porção N-terminal, descritas pela primeira vez por Xu et al. (2004), que permite ancoramento na membrana. Endolisinas contendo peptídeo sinal clivável (PS), por exemplo, possuem um peptídeo sinal que controla a liberação de endolisinas no periplasma através da maquinaria Sec do hospedeiro (FRIAS; MELOCISTINO; RAMIREZ, 2013; ESCOBEDO et al., 2019). Alguns estudos apontam certa preservação do grau de hidrofobicidade dentro desses domínios, assim como as de peptídeo sinal (PS). Pesquisas recentes demonstraram que algumas dessas endolisinas são capazes de permear a membrana externa de bactérias Gram-negativas (LIM et al., 2014). Dessa forma, endolisinas peptídeo sinal e SAR representam uma fonte promissora de proteínas antimicrobianas que atuam exogenamente em bactérias Gram-

negativas (GONTIJO; JORGE; BROCCHI, 2021; MURRAY et al., 2021). Assim, este estudo tenta expandir o banco de dados de SAR-endolisinas por meio de triagens de genomas completo de fagos.

## **METODOLOGIA:**

### *Base de dados*

O banco de dados de sequências foi construído reunindo genomas de bacteriófagos completamente montados do banco de dados de genoma do NCBI (SAYERS et al., 2019) em julho de 2022, que continham um sequência de proteína endolisina associada. O banco de dados era composto por 3.777 genomas de bacteriófagos e 4826 endolisinas, pois um fago pode produzir mais que uma enzima lítica. Selecionamos sequências representativas usando CD-HIT Suite (HUANG et al., 2010) empregando parâmetros padrão para reduzir o número de genomas para um conjunto final de 1764 endolisinas e seus respectivos genomas.

### *Pesquisa de peptídeo sinal*

As sequências de proteínas foram agrupadas utilizando o CD-HIT Suite (HUANG et al., 2010) com parâmetros padrão. A presença de peptídeos sinal nas endolisinas foi determinada conforme descrito por Oliveira et al. (2013), utilizando as ferramentas SignalP 5.0 (PETERSEN et al., 2011) e PrediSi 1.0 (HILLER et al., 2006). Domínios transmembranares foram identificados através dos softwares SOSUI 1.1 (HIROKAWA; BOON-CHIENG; MITAKU, 1998), TMHMM 2.0 (KROGH et al., 2001) e Phobius 1.01 (KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2004). Endolisinas putativas contendo domínios transmembranares com composição de aminoácidos característica de domínios SAR (40-60% de glicina ou alanina e no máximo dois resíduos básicos) foram anotadas como possuindo um domínio SAR putativo (XU et al., 2004)

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Com o intuito de avaliar o arsenal de endolisinas com ação exógena promissora contra bactérias Gram-negativas, caracterizamos as endolisinas contendo peptídeo sinal. Dentre as 1768 endolisinas anotadas nos genomas analisados, 16,3 % (n = 289) contêm peptídeo sinal (PS) putativos na região N-terminal da proteína. Além disso, 0,9 % (n = 14) contêm peptídeos de sinal do tipo SAR. As SAR-endolisinas contêm domínios transmembranares localizados na região N-terminal, um alto teor de Glicina e/ou Alanina e no máximo dois resíduos básicos (XU et al., 2004).

PS-endolisinas foram codificadas principalmente por fagos de *Escherichia* (n = 56), seguidos por fagos de *Salmonella* (n = 47), *Lactobacillus* (n = 32), *Enterococcus* (n = 24), *Klebsiella* (n = 20), *Lactococcus* (n = 10), *Cronobacter* (n = 9), *Pseudomonas* (n = 9) e *Bacillus* (n = 8) e entre outros (Figura 1). Por outro lado, os bacteriófagos que codificam SAR-endolisina são *Xanthomonas* (n = 5), *Pseudomonas* (n = 2), *Klebsiella* (n = 1), *Streptococcus* (n = 1), *Xylella* (n = 2), *Enterococcus* (n = 1) *Stenotrophomonas* (n = 1) e houve um com informações não disponíveis (Figura 2). A razão pela qual alguns bacteriófagos codificam SAR-endolisinas permanece desconhecida.

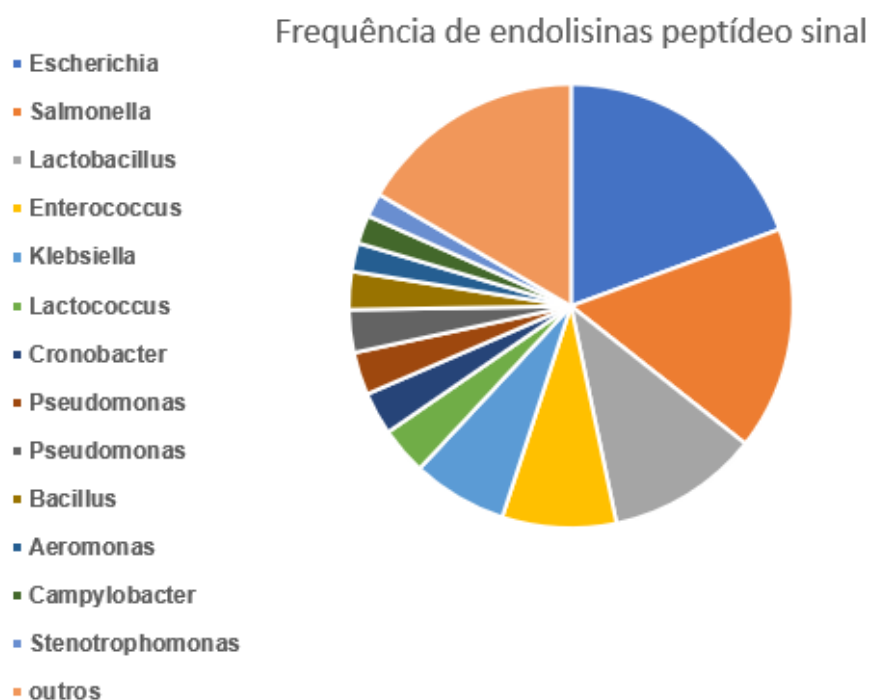


Figura 1: Gráfico de frequência de gêneros bacterianos infectados por fagos produtores de endolisinas peptídeo sinal.

A crescente resistência bacteriana aos antibióticos impulsiona a busca por novas alternativas terapêuticas. A terapia fágica, que utiliza vírus bacteriófagos como agentes antimicrobianos, e as endolisinas, enzimas derivadas desses vírus, surgem como promissoras opções (KAKASIS; PANITSA, 2019). As endolisinas, em particular, apresentam diversas vantagens, como amplo espectro de ação, dose-dependência, atividade em diferentes fases de crescimento bacteriano e ausência de relatos de resistência bacteriana (GONDIL; HARJAI; CHHIBBER, 2020). A caracterização genética de bacteriófagos permite a identificação de novas endolisinas com potencial para combater bactérias Gram-negativas.

A grande diversidade genética observada em bacteriófagos é resultado de um longo processo evolutivo que se estende por cerca de 3 bilhões de anos. A abundância desses vírus em diversos ambientes, tanto naturais quanto artificiais, e a constante interação com bactérias hospedeiras contribuem para essa diversidade. Os bacteriófagos possuem a capacidade de adquirir genes de bactérias ou de outros fagos através de mecanismos de recombinação genética. No entanto, apesar da frequência com que ocorrem eventos de transferência horizontal de genes, não há evidências de que genes de endolisinas tenham sido adquiridos de bactérias (OECHSLIN; MOINEAU, 2020). A hipótese mais aceita é que as endolisinas evoluíram de forma independente, com o objetivo de degradar as estruturas da parede celular bacteriana, facilitando a liberação de novas partículas virais e, conseqüentemente, aumentando a aptidão dos bacteriófagos (CATALÃO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; PIMENTEL, 2014)).

## CONCLUSÕES:

É fundamental aprofundar as pesquisas sobre o potencial antimicrobiano de endolisinas com peptídeos sinal, especialmente as SAR-endolisinas. A presença de domínios transmembrana nessas enzimas sugere uma maior capacidade de penetração na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Os resultados obtidos neste estudo indicam que as SAR-endolisinas identificadas são promissoras candidatas para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Um total de 14 endolisinas foram selecionadas para testes *in vitro* contra bactérias Gram-negativas.

## BIBLIOGRAFIA

- PRIMO, José. **Título do primeiro exemplo de bibliografia.** Cidade, Editora, 20XX
- SEGUNDO, João (Org.), **Título do segundo exemplo de bibliografia.** Cidade, Editora, 19XX
- NOME DA INSTITUIÇÃO. **Título do terceiro exemplo de bibliografia.** Cidade, Editora, 19XX
- TERZIO, Antônio. Título de Artigo usado como exemplo de bibliografia. **Revista/Periódico usado como exemplo,** Cidade, v. XX, p. XX-YY, 20XX (ano de publicação)
- VIERTE, Maria. **Título do quarto exemplo de bibliografia, com mesmo ano do quinto.** Cidade, Editora, 20XXa
- VIERTE, Maria. **Título do quinto exemplo de bibliografia, com mesmo ano do quarto.** Cidade, Editora, 20XXb
- PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy,** v. 11, n. 3, p. 297–308, 2013.
- LIN, D. M.; KOSKELLA, B.; LIN, H. C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics,** v. 8, n. 3, p. 162, 2017.
- SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. **Nature,** v. 437, n. 7057, p. 356–361, set. 2005.
- LIN, D. M.; KOSKELLA, B.; LIN, H. C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics,** v. 8, n. 3, p. 162, 2017.
- XU, M. et al. A Signal-Arrest-Release Sequence Mediates Export and Control of the Phage P1 Endolysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* v. 101, n. 17, p. 6415–6420, 27 abr. 2004
- FRIAS, M. J.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M. Export of the Pneumococcal Phage SV1 Lysin Requires Choline-Containing Teichoic Acids and is HolinIndependent. *Molecular Microbiology,* v. 87, n. 2, p. 430–445, jan. 2013.
- ESCOBEDO, S. et al. Insight into the Lytic Functions of the Lactococcal Prophage TP712. *Viruses,* v. 11, n. 10, p. 881, out. 2019.
- LIM, J.-A. et al. Exogenous Lytic Activity of SPN9CC Endolysin Against Gram-Negative Bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 24, n. 6, p. 803–811, 28 jun. 2014.
- GONTIJO, M. T. P.; JORGE, G. P.; BROCCCHI, M. Current Status of Endolysin-Based Treatments against Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics,** v. 10, n. 10, p. 1143, 22 set. 2021.
- MURRAY, E. et al. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. **Viruses,** v. 13, n. 4, p. 680, 15 abr. 2021
- HUANG, Y. et al. CD-HIT Suite: A Web Server for Clustering and Comparing Biological Sequences. *Bioinformatics,* v. 26, n. 5, p. 680–682, 1 mar. 2010
- OLIVEIRA, H. et al. Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. *Journal of Virology,* v. 87, n. 8, p. 4558–4570, abr. 2013.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions. *Nature Methods,* v. 8, n. 10, p. 785–786, out. 2011.
- HILLER, K. et al. JVirGel 2.0: Computational Prediction of Proteomes Separated Via Two-Dimensional Gel Electrophoresis Under Consideration of Membrane and Secreted Proteins. *Bioinformatics,* v. 22, n. 19, p. 2441–2443, 1 out. 2006

HIROKAWA, T.; BOON-CHIENG, S.; MITAKU, S. SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 14, n. 4, p. 378–379, 1998

KROGH, A. et al. Predicting Transmembrane Protein Topology With a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *Journal of Molecular Biology*, v. 305, n. 3, p. 567–580, 19 jan. 2001.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *Journal of Molecular Biology*, v. 338, n. 5, p. 1027–1036, 14 maio 2004.

KAKASIS, A.; PANITSA, G. Bacteriophage Therapy as an Alternative Treatment for Human Infections. A Comprehensive Review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 53, n. 1, p. 16–21, 1 jan. 2019.

GONDIL, V. S.; CHHIBBER, S. Bacteriophage and Endolysin Encapsulation Systems: A Promising Strategy to Improve Therapeutic Outcomes. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, 2021.

DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage Diversity, Genomics and Phylogeny. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 18, n. 3, p. 125–138, 2020.

CATALÃO, M. J. et al. Diversity in Bacterial Lysis Systems: Bacteriophages Show The Way. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 4, p. 554–571, 2013.