KARINE SOUZA GUIMARÃES

**ANÁLISE DO SISTEMA ATIVO DE CAPTAÇÃO DE
GLUTAMINA de *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2011

KARINE SOUZA GUIMARÃES

**ANÁLISE DO SISTEMA ATIVO DE CAPTAÇÃO DE
GLUTAMINA de *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof^a Dr^a Rita de Cássia
Café Ferreira

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Guimarães, Karine Souza.

Análise do sistema ativo de captação de glutamina de *Streptococcus mutans* / Karine Souza Guimarães. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Rita de Cássia Café Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Genética e fisiologia bacteriana.

Versão do título para o inglês: Analysis of the glutamine active transport system of *Streptococcus mutans*.

Descritores: 1. *Streptococcus mutans* 2. ABC transportador 3. Glutamina 4. Glutamato I. Ferreira, Rita de Cassia Café II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0145/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karine Souza Guimarães.

Título da Dissertação: Análise do sistema ativo de captação de glutamina de *Streptococcus mutans*.

Orientador(a): Rita de Cássia Café Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **63** nas fls. **71** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Rita de Cássia Café Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo do sistema de captação de glutamina (Gln) na fisiologia e patogênese de Streptococcus mutans** do qual participou(aram) o(s) alunos **Karine Souza Guimarães, Roberto Nepomuceno de Souza Lima e o pesquisador Luis Carlos de Souza Fereira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **15.05.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de maio de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

Dedicatória:

A Deus, minha família e amigos.
Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos que me apoiaram nessa caminhada e contribuíram para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira, pela sua orientação e por tantas oportunidades, compreensão e colaboração, desde o tempo de Iniciação Científica me abrindo as portas para o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira pela grande parceria na concretização e elaboração desse trabalho.

Ao grande amigo Roberto Lima, pela sua sempre disponibilidade, paciência e transmissão sem fim de conhecimento. O meu muito obrigado é pouco.

À amiga Daniela Luz, por estender uma mãozinha nos momentos mais difíceis e pela colaboração disponibilizada.

Ao grande amigo Robert Galvez, pelo apoio nos ensaios de captação, os quais foram de grande relevância para a concretização desse trabalho.

A todos os amigos e colegas de laboratório: Aline, Priscila, Débora, Carolina, Rafael, Milene, Rogério, Cariri, Renata, Jaime, Catarina, Juliana, Mariana, Wilson, Raíssa, Denicar, Loren e Eduardo, pela ajuda diária ao longo dessa caminhada.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

Aos meus pais, Angela e João, por terem me dado toda a base de vida o que permitiu que até aqui eu chegasse.

Ao meu marido Pedro, por ser tão companheiro e compreensível mesmo nos momentos mais difíceis e estressantes.

E principalmente a Deus por ter me dado forças para conseguir alcançar mais este objetivo em minha vida.

A todos,
O meu Eterno Obrigado.

“A ciência se compõe de erros, que, por sua vez,
são os passos até a verdade”

(Júlio Verne)

RESUMO

GUIMARÃES, K. S. **Análise do sistema ativo de captação de glutamina de *Streptococcus mutans***. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A glutamina e o glutamato são aminoácidos importantes no metabolismo bacteriano e atuam como fonte de nitrogênio para a síntese de macromoléculas. A captação desses aminoácidos ocorre por meio de transportadores ativos do tipo ABC. No presente estudo avaliamos os sistemas de captação de glutamina em *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), o agente etiológico da cárie dental. Análises *in silico* revelaram a presença de dois óperons que codificam sistemas de transporte de glutamina: o óperon *gln*, composto pelos genes *glnQ*, *H*, *M*, *P* e um segundo óperon putativo composto pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c*. Análises comparativas revelaram que esse possível óperon é conservado entre diferentes espécies do gênero *Streptococcus*, mas não possui função conhecida. Por meio de mutagênese sítio-específica, foi possível obter a deleção do óperon com a inserção de um cassete de resistência à eritromicina. O mutante (linhagem KG1) obtido apresentou redução na captação de glutamina e glutamato. O mesmo ocorreu em relação ao mutante deficiente no óperon *gln* sugerindo uma sobreposição de função para os dois sistemas de transporte. A linhagem KG1 apresentou ligeiro aumento na fase de adaptação em cultivos realizados em meios ricos e definidos. A remoção de glutamina e glutamato impediu o crescimento das linhagens mutantes assim como da linhagem parental. No entanto, o crescimento das três linhagens foi reestabelecido após adição de glutamina ou glutamato ao meio de cultura indicando que a captação de pelo menos um dos aminoácidos é essencial para o *S. mutans*. Esses dados revelam ainda a sobreposição funcional dos dois sistemas de captação estudados. O mutante KG1 apresentou maior capacidade de adesão a superfícies abióticas (poliestireno) sugerindo um aumento na capacidade de formação de biofilme em relação à linhagem parental. O mutante deletado no óperon *gln*, por sua vez, apresentou maior capacidade de ligação ao n-hexadecano, o que indica um perfil

hidrofóbico alterado dos componentes mais externos da célula. Em suma, os resultados obtidos revelam, pela primeira vez que o óperon definido pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* é funcional e está especificamente envolvido com a captação de glutamina e glutamato em *S. mutans*. Além disso, os dados gerados até o momento sugerem que os dois sistemas de transporte possuem papéis distintos na virulência do *S. mutans*.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Glutamina. Glutamato. ABC transportador.

ABSTRACT

GUIMARÃES, K. S. **Analysis of the glutamine active transport system of *Streptococcus mutans***. 2011. 59 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Glutamine and glutamate are important amino acids for the bacterial metabolism, acting as nitrogen source for macromolecule synthesis. The uptake of these amino acids occurs by means of ABC-type active transporter systems. On the present study we evaluate the glutamine transport systems of *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), the etiological agent of dental decay. *In silico* analyses revealed the presence of two polycistronic operons that encode glutamine uptake systems: the *gln* operon, composed of the *glnQ*, *H*, *M*, *P* genes, and a putative operon composed by the *smu.1177c*, *smu.1178c* and *smu.1179c* genes. Comparative analyses indicated that this putative operon is highly conserved among different species of the *Streptococcus* genus but do not have an annotated biological function. A mutant deleted on the *smu.1177c*, *smu.1178c* and *smu.1179c* genes was successfully obtained by site-direct mutagenesis with the replacement of the genes by a gene cassette encoding resistance to erythromycin. The mutant strain (KG1) showed impairment of glutamine and glutamate uptake. Similar results were observed with another mutant deleted in the *gln* operon suggesting an overlap in the function of the two transport systems. The KG1 strain had a slight increase on the adaptation phase during grown on rich or defined media. Removal of both glutamine and glutamate of the medium abolished growth of the mutant strains as well as the parental strain. Nonetheless, growth of the mutant strains was recovered after addition of glutamine or glutamate to the media suggesting that uptake of these amino acids is essential for *S. mutans*. These data showed also that the two uptake system share similar functions regarding uptake of these amino acids. The KG1 strain showed also an enhanced capability to bind abiotic surfaces adhesion (polystyrene plaques), suggesting an increased biofilm formation

with regard to the parental strain. On the other hand, the mutant deleted in the *gln* operon showed higher capacity to binding n-hexadecan suggesting an altered hydrophobic profile of surface-exposed components. The results demonstrated, for the first time, that both operons are involved with the uptake of glutamine and glutamate in *S. mutans*. Furthermore, our data indicate that the two uptake systems may play different roles on the virulence of *S. mutans*.

Key Words: *Streptococcus mutans*. Glutamine. Glutamate. ABC transporter.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC - *ATP - binding cassette*

ATP - *Adenosine Tri-Phosphate* (Tri Fosfato de Adenosina)

BHI - *Brain Heart Infusion* (Infusão de Cérebro e Coração)

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de Busca de Alinhamento Básico Local)

BM - *Biofilm media* (Meio Biofilme)

CTAB - *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*

DO - Densidade Óptica

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Enciclopédia de Kyoto de genes e genomas)

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

ORFs - Open Reading Frame (Fase aberta de leitura)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação da Cadeia da Polimerase)

PECs - Polissacarídeos extracelulares

PUM - *Phosphate/Urea/Magnesium buffer* (Tampão Fosfato/ Uréia/ Magnésio)

SDS - *Sodium Dodecyl Sulphate*

TAE - Tris/Acetato/EDTA

TE - Tris/EDTA

THYE - Todd Hewitt Broth plus Yeast Extract

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática de um transportador ABC em bactéria gram-positiva.....	20
Figura 2: Reação de síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia pela enzima <i>glutamina sintetase</i>	21
Figura 3: Organização do óperon <i>gln</i> em <i>S. mutans</i> UA159.....	34
Figura 4: Análise do óperon <i>gln</i> em diferentes espécies de <i>Streptococcus</i>	35
Figura 5: Organização do óperon constituído pelos genes <i>smu.1177c</i> , <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i> em <i>S. mutans</i> UA159.....	38
Figura 6: Análise do óperon constituído pelos genes <i>smu.1177c</i> , <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i> e seus ortólogos em diferentes espécies de <i>Streptococcus</i>	38
Figura 7: Representação esquemática da mutagênese sítio-dirigida realizado no óperon formado pelos genes <i>smu.1177c</i> , <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i> de <i>S. mutans</i>	40
Figura 8: Amplificação das regiões genômicas que delimitam os genes <i>smu.1177c</i> , <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i> de <i>S. mutans</i>	41
Figura 9: Captação de glutamina (A) e glutamato (B) pelas linhagens UA159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i>	42
Figura 10: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i> em meio BHI.....	43
Figura 11: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i> em meio THYE.....	44
Figura 12: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i> em meio FMC completo.....	44
Figura 13: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i> em meio FMC com glutamato e sem glutamina.....	45
Figura 14: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i> em meio FMC sem glutamato e com glutamina.....	45
Figura 15: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i> em meio FMC sem glutamato e glutamina.....	46

Figura 16: Adesão das linhagens UA159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i> em poliestireno.....	47
Figura 17: Hidrofobicidade de bactérias das linhagens UA159 e mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. mutans</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de linhagens e plasmídeos utilizados.....	28
Tabela 2 - Lista de oligonucleotídeos utilizados.....	29
Tabela 3 - Massas moleculares preditas das proteínas do sistema Gln e análise de identidade dentre os ortólogos de <i>Streptococcus</i>	36
Tabela 4 - Análise de identidade compartilhada entre as proteínas codificadas pelo óperon <i>gln</i> em relação às proteínas codificadas pelos genes <i>smu. 1177c</i> , <i>smu. 1178c</i> e <i>1179c</i> de <i>S. mutans</i> UA159.....	37
Tabela 5 - Massas moleculares preditas das proteínas codificadas pelos genes do óperon <i>smu.1177c</i> , <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i> e análise de identidade dentre os ortólogos de <i>Streptococcus</i>	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 <i>Streptococcus mutans</i>.....	18
1.2 Transportadores do tipo ABC.....	19
1.3 Transportadores ABC de glutamina/glutamato em bactérias...	20
2 OBJETIVOS.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Identificação e análise computacional.....	25
3.1.1 BLAST.....	25
3.1.2 ProtParam.....	26
3.2 Meios de culturas e soluções.....	26
3.3 Linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos.....	28
3.4 Isolamento do DNA genômico de <i>S. mutans</i>.....	29
3.5 Obtenção do mutante deletado no óperon constituído pelos genes <i>smu.1177c</i>, <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i>.....	30
3.5.1 Transformação de <i>S. mutans</i>	30
3.6 Caracterização dos mutantes KG1 e SmuGLT de <i>S. Mutans</i>....	31
3.6.1 Internalização de glutamina/glutamato radioativos (³ H).....	31
3.6.2 Curvas de crescimento em meios ricos.....	31
3.6.3 Curvas de crescimento em meio definido na presença ou ausência de glutamina e/ou glutamato.....	32
3.6.4 Capacidade de adesão/produção de biofilme a superfícies abióticas.....	32
3.6.5 Teste de hidrofobicidade.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Caracterização <i>in silico</i> dos componentes do transportador Gln e o possível transportador definido pelos genes <i>smu.1177c</i>, <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i> de <i>S. mutans</i>.....	34

4.1.1 O óperon <i>gln</i> de <i>S. mutans</i>	34
4.1.2 O óperon constituído pelos genes <i>smu.1177c</i> , <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i> de <i>S. mutans</i>	37
4.2 Obtenção de um mutante deletado no óperon constituído pelos genes <i>smu.1177c</i>, <i>smu.1178c</i> e <i>smu.1179c</i> de <i>S. mutans</i>....	39
4.3 Determinação da funcionalidade do transportador em relação à captação de glutamina/glutamato e crescimento celular.....	41
4.3.1 Internalização de glutamina/glutamato radioativos (^3H).....	41
4.3.2 Crescimento das linhagens parental UA159 e mutantes KG1 e Smu GLT de <i>S. mutans</i> em meios ricos e definidos.....	43
4.4 Papel do sistema de transporte identificado na expressão de características envolvidas com a patogenicidade do <i>S. mutans</i>...	46
4.4.1 Capacidade de adesão/produção de biofilme a superfícies abióticas	46
4.4.2 Ensaio de hidrofobicidade.....	47
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus mutans*

A bactéria *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) é uma eubactéria, firmicute, imóvel, anaeróbia facultativa que se apresenta na forma de cocos pertencentes à microbiota autóctone da cavidade oral (HAMADA; SLADE, 1980). O *S. mutans* é um dos colonizadores primários do biofilme supragengival e, em conjunto com algumas espécies de *Lactobacillus*, representa o principal agente infeccioso associado à cárie dental, a patologia infecciosa mais prevalente em humanos (HARDIE, 1992; HOUTE, 1994).

Inúmeros estudos demonstram que essa bactéria possui vários fatores de virulência importantes para sua patogenicidade como sua habilidade de aderir firmemente à superfície dental, a produção de ácidos a partir de um grande número de carboidratos provenientes da dieta do hospedeiro (acidogenicidade) e a capacidade de sobreviver e replicar em ambientes ácidos (aciduricidade) (MICHALEK et al., 1981; HAMADA; KOGA; OOSHIMA, 1984). A capacidade de aderência/produção de biofilme é destacada por se tratar do passo inicial e essencial para o desenvolvimento da cárie dental, além de permitir o contato direto da bactéria - e por conseguinte de seus produtos metabólicos - à superfície dental. O biofilme também dificulta o acesso da saliva à superfície do dente, impedindo a promoção de sua ação tamponante na presença do ácido láctico produzido por *S. mutans* (HAMADA; SLADE, 1980). Por outro lado, a habilidade de metabolizar carboidratos da dieta do hospedeiro e gerar metabólitos ácidos provoca a desmineralização da estrutura dental e, por conseguinte, a formação de lesões de cárie (HAMILTON; BUCKLEY, 1991). Os níveis de pH da cavidade oral caem rapidamente após o metabolismo de açúcares para valores abaixo de 4,0 que são considerados letais para a maioria das espécies de microorganismos. Entretanto o *S. mutans* dado a sua capacidade acidúrica, consegue tolerar esses ambientes ácidos (KAJFASZ et al., 2009).

Em 2002 o genoma da linhagem UA 159 de *S. mutans* foi sequenciado na universidade de Oklahoma e disponibilizado no GenBank (NC 004350). Foram encontrados cerca de 280 genes (15% do total de ORFs) codificadores de sistemas de transporte (AJDÍC et al., 2002). Os sistemas de transporte ativos da família ABC

são os mais abundantes com mais de 60 transportadores, ou seja, 10% do número total de ORFs, da espécie.

1.2 Transportadores do tipo ABC

A captação de substâncias através de membranas celulares, em particular, de bactérias, é realizada por diferentes processos como: a difusão passiva/facilitada, ou ainda, por mecanismos de transporte ativo. Sistemas de transporte de nutrientes em bactérias podem ser divididos em dois grupos: os sistemas primários, sensíveis ao choque osmótico cuja fonte de energia vem diretamente da hidrólise de ATP, e os sistemas secundários, insensíveis ao choque osmótico, que utilizam o gradiente eletroquímico da membrana para extrair a energia necessária para o seu funcionamento (BERGER, 1973). Entre os sistemas primários de transporte destacam-se os sistemas do tipo ABC (*ATP Binding Cassete*). Esses sistemas estão presentes nos três grandes reinos biológicos e são empregados por arqueias, eubactérias e eucariotos, sendo utilizados tanto para captar, como para exportar diferentes substâncias (HIGGINS, 1992, 2001). Os sistemas importadores do tipo ABC são restritos às bactérias e arqueias e dependem de proteínas ligadoras específicas que vão reconhecer o substrato e levá-lo a um poro, delimitado por proteínas de membrana citoplasmática e responsável pela passagem do substrato para o interior da célula. Em bactérias gram-positivas esses ligantes são lipoproteínas ancoradas à membrana citoplasmática (LINTON; HIGGINS, 1998).

Genes que codificam para transportadores ABC perfazem, em média, 5 % dos genomas bacterianos e refletem tanto o estilo de vida do microorganismo como podem influenciar na expressão de fatores associados à virulência em espécies patogênicas ao homem (HIGGINS, 1992, 2001). A constituição desses sistemas se dá por três componentes funcionais e estruturais (Figura 1), sendo que dois componentes apresentam-se associados à membrana citoplasmática enquanto o terceiro e, último, mostra-se solúvel, nas bactérias gram-negativas, ou associadas à membrana citoplasmática, nas bactérias gram-positivas (MOUTRAN et al., 2003). Os componentes associados à membrana interna são responsáveis pela formação de um poro por onde a substância será transportada. Esses componentes são, em geral, formados por duas proteínas hidrofóbicas que atravessam a membrana

citoplasmática, e por isso, são denominados de domínios integrais de membrana (DIM) (MOUREZ; HOUFNUNG; DASSA, 1997). O segundo componente do sistema ABC de transporte em bactérias é representado por dois domínios geradores de energia, proteínas associadas à face interna da membrana citoplasmática que ligam ATP e são chamados de domínios de ligação de nucleotídeos (DLN) (YOUNG; HOLLAND, 1999).

Nos sistemas de transporte ABC que estão envolvidos na captação de nutrientes em bactérias, um terceiro e último componente se encontra envolvido com a ligação ao substrato, denominado ligador de substrato (LS), sendo responsável pela especificidade e afinidade do sistema que em bactérias gram-negativas se encontra solúvel no periplasma, enquanto que em bactérias gram-positivas são encontrados na forma de lipoproteínas ancoradas por meio de uma acil-gliceril-cisteína N-terminal à face externa da membrana citoplasmática (DASSA, 2000).

Figura 1: Representação esquemática de um transportador ABC em uma bactéria gram-positiva.

1.3 Transportadores ABC de glutamina/glutamato em bactérias

Sistemas ABC de transporte são responsáveis pela secreção de toxinas e outros componentes celulares, assim como a captação de nutrientes como aminoácidos, fosfato, oligopeptídeos, poliaminas, açúcares, nitrato, sulfato, ferro, molibdato e outros. Dentre esses sistemas podemos destacar àquele responsável pela captação de glutamina, devido ao papel essencial e a inter-relação bioquímica que esse aminoácido possui, em conjunto com o glutamato (Figura 2). Esses

aminoácidos são importantes como fonte de nitrogênio e necessários para o crescimento em condições limitantes de amônia. Consequentemente são importantes para síntese de outros aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcares aminados e muitas outras moléculas biologicamente importantes (SMITH, 1990). A glutamina é a amida do ácido glutâmico (glutamato) e representa um verdadeiro sensor de disponibilidade de nitrogênio extracelular, já que sua concentração diminui na limitação desse, além de modular a taxa de replicação celular. Por outro lado, a concentração intracelular de glutamato responde a variações de osmolaridade do meio e representa o principal grupamento aniônico responsável pela manutenção dos níveis de K^+ no interior das células. O glutamato é o ânion livre mais abundante em *Escherichia coli* (YAN, 2007). Outro exemplo claro da importância desses aminoácidos se dá pela observação da constituição da camada de peptidoglicano, parte essencial para a sobrevivência de grande parte das eubactérias, no qual observamos a presença do aminoácido D-ácido glutâmico como parte da cadeia lateral polipeptídica (KIM et al., 2007).

Figura 2: Reação de síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia pela enzima *glutamina sintetase*.

Em *E. coli* K12, a captação de glutamato envolve um sistema ativo do tipo ABC, o sistema Glt, formado pelos genes *gltB*, *gltD* e *gltF* (CASTAÑO; BASTARRACHEA; COVARRUBIAS, 1988). Além do sistema específico de captação de glutamato, observamos em *E. coli* a presença de um segundo óperon associado com o transporte de glutamina, o sistema Gln, que se constitui num dos mais estudados sistemas de transporte dependentes de proteína ligadora, pertencente a família ABC de transportadores ativos e constituído por uma proteína ligadora de glutamina (GlnBP) e duas proteínas associadas à membrana citoplasmática (SHEN et al., 1989).

Em bactérias gram-positivas, especificamente as do gênero *Streptococcus* não observamos a presença de dois transportadores ativos específicos (um para glutamato e um para glutamina). De fato, apenas um transportador ativo é responsável pela captação de ambos os aminoácidos, como observado em *S. lactis*

e o *S. cremoris* (POOLMAN; SMID; KONINGS, 1987). Em outro gênero da mesma espécie, o *S. bovis*, verifica-se a ausência do transporte ou utilização do glutamato como fonte de nitrogênio, havendo incorporação de glutamina por mecanismos de transporte ativo (CHEN; RUSSEL, 1989). Além do papel observado na captação dos aminoácidos, foi verificado em estreptococos do grupo B causadores de sepse e meningite em neonatais, que o sistema de captação de glutamina está diretamente relacionado à patogenicidade bacteriana, como representado pelo requerimento do gene *glnQ* na aderência às células epiteliais mediada pela fibronectina (TAMURA; NITTAYAJAR; SCHOENTAG, 2002).

Em relação ao *S. mutans*, estudos dos transportadores ABC restringem-se a transportadores de açúcar, metais, oligopeptídeos e aminoácidos (TAO et al., 1993; FRANCESCA et al., 2004; NEPOMUCENO et al., 2007; DASHPER; RILEY; REYNOLDS, 1995). Em particular, a captação de glutamina nessa espécie está diretamente relacionada ao valor de pH intracelular e é estimulada pela presença de íons potássio (NOJI et al., 1988; SATO et al., 1989; DASHPER; RILEY; REYNOLDS, 1995). Estudo recente que buscou esclarecer os aspectos moleculares do transporte desse aminoácido em *S. mutans* e seu papel na fisiologia bacteriana, focou na análise do sistema codificado pelo óperon *gln*, predito como o transportador responsável pela captação de glutamina (ADÍJIC et al., 2002; KRASTEL et al., 2010). Os dados obtidos demonstraram que, diferentemente da predição *in silico*, esse óperon codifica um sistema de transporte ativo específico para captação de glutamato. Outro ponto abordado no trabalho demonstrou a correlação entre o sistema Gln e a resposta de tolerância ao ácido, reforçando a importância global desses aminoácidos aromáticos na fisiologia bacteriana.

Esse trabalho teve como principal objetivo caracterizar sistemas transportadores do tipo ABC envolvidos com a captação de glutamina em *S. mutans*. Como exposto anteriormente, as análises *in silico* indicavam o sistema Gln como responsável por esse transporte. Para tal objetivo, experimentos voltados para a geração de mutantes deficientes no óperon *gln* representariam a principal abordagem experimental a ser empregada. No entanto, com a publicação do trabalho de Krastel et al. (2010), essa prioridade foi modificada e passamos a buscar outros possíveis transportadores que desempenhassem a função de captação de glutamina por esta linhagem. A busca por parálogos aos genes constituintes do óperon *gln* indicou a presença de um segundo óperon, formado pelos genes *smu*.

1177c, *smu. 1178c* e *smu.1179c*. Para tal obtivemos um mutante deficiente nos genes supracitados de forma a demonstrar seu envolvimento na captação de glutamina e expressão de características relacionadas à virulência em *S. mutans*.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivo o estudo de sistemas ativos de transporte na linhagem UA159 de *S. mutans* codificados pelos óperons *gln* e por um segundo óperon formado pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c*. O trabalho envolveu os seguintes objetivos específicos:

- I. Caracterização *in silico* dos componentes dos transportadores Gln e o possível transportador definido pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* de *S. mutans*;
- II. Obtenção de um mutante de *S. mutans* deletado no óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c*, *smu.1179c* de *S. mutans*;
- III. Determinação da funcionalidade do transportador estudado quanto à captação de glutamina/glutamato e crescimento celular;
- IV. Avaliação de um possível envolvimento entre o sistema de transporte estudado e a expressão de características envolvidas com a patogenicidade do *S. mutans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação e análise computacional

As sequências gênicas e proteicas do sistema formado pelas proteínas SMU.1177c, SMU.1178c e SMU.1179c e do sistema Gln foram obtidas após busca no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e do KEGG (www.genome.ad.jp/kegg). Utilizando o programa BLAST/P foi feita a identificação de parálogos e ortólogos das proteínas codificadas pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* e dos produtos codificados pelos genes do óperon *gln* em bactérias do gênero *Streptococcus* com os maiores graus de identidades, medidos pelos seus respectivos *e-values* (ALTUSCHUL, 1997). As características de todos os componentes de ambos os sistemas de captação estudados, bem como de seus ortólogos, foram obtidas pelas análises no programa *ProtParam* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Segue a lista de programas utilizados em diferentes etapas do trabalho *in silico*.

3.1.1 BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Utilizamos o programa BLAST-P (<http://blast.genome.d.jp/>) para a comparação de sequências de aminoácidos das diferentes proteínas que compõem o sistema Gln e o sistema codificado pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c*, bem como seus ortólogos encontrados em diferentes bactérias gram-positivas, focando nas pertencentes ao gênero *Streptococcus*. A sequência incógnita (*query*) e a sequência do GenBank (*subject*) apresentam suas porcentagens de aminoácidos idênticos ou similares obtidas.

3.1.2 ProtParam (*Protein Identification and Analysis Tool*)

O programa ProtParam fornece as características bioquímicas proteicas a partir das sequências de aminoácidos das proteínas pesquisadas, como o peso molecular, o número de aminoácidos, entre outros.

3.2 Meios de cultura e soluções

Meio Berman's (NOJI et al., 1988)

2% (m/v) peptona, 0,1% (m/v) extrato de levedura, 25mM (m/v) fosfato de potássio, 34mM (m/v) NaCl, 0,05% (m/v) tioglicolato de sódio, 1mM (m/v) MgSO₄, 1% (m/v) glicose, pH 7,0.

Meio BHI (Sigma)

Meio comercial de cultura, contém; 12,5% (m/v) infusão de cérebro de borrego, 5% (m/v) infusão de coração de boi, 10% (m/v) peptona, 5% (m/v) cloreto de sódio, 2% (m/v) D-Glicose, 2,5% (m/v) dehidrofosfato de sódio. Para meio sólido foi adicionado 2,5% (m/v) de ágar.

Meio BM (LOO; CORLISS; GACESHKUMAR, 2000)

10% (m/v) KH₂PO₄, 2% (m/v) K₂HPO₄, 1,3% (m/v) (NH₄)₂SO₄, 2% (m/v) NaCl, 0,02% (m/v) MnCl₂.4H₂O, 0.001% (m/v) FeCl₃.6H₂O, 2% (m/v) casoaminoácidos, 0,025% (m/v) MgSO₄.7H₂O, 0,007% (m/v) CaCl₂.2H₂O, 1,2% (m/v) piridoxina-HCl, 0,23% (m/v) ácido nicotínico, 0,12% (m/v) ácido pantotênico, 0,02% (m/v) riboflavina, 0,005% (m/v) tiamina-HCl, 0,0006% (m/v) D-biotina, 0,025% (m/v) L-glutamato, 0,01% (m/v) L-arginina-HCl, 0,01% (m/v) L-cisteína-HCl, 0,001% (m/v) L-triptofano, 0,18% (m/v) glicose ou 0,17% (m/v) sacarose; pH7,4.

Meio LB (MILLER, 1992)

1% (m/v) extrato de triptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) NaCl; pH 7,4; Para meio sólido foi utilizado 2,5% (m/v) de ágar.

Meio FMC (TERLECKYJ ; WILLET ; SHOCKMAN, 1975)

44,2% (m/v) KH_2PO_4 , 30,5% (m/v) K_2HPO_4 , 60% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30% (m/v) L-ácido glutâmico*, 10% (m/v) L-treonina, 20% (m/v) L-arginina, 20% (m/v) L-histidina, 20% (m/v) L-triptofano, 10% (m/v) L-valina, 11% (m/v) L-lisina, 10% (m/v) L-ácido aspártico, 10% (m/v) L-fenilalanina, 10% (m/v) L-serina, 20% (m/v) L-prolina, 20% (m/v) L-hidroxiprolina, 20% (m/v) glicina, 10% (m/v) L-isoileucina, 10% (m/v) L-metionina, 20% (m/v) L-cisteína, 20% (m/v) L-tirosina, 10% (m/v) L-leucina, 20% (m/v) DL-alanina, 0,5% (m/v) L-glutamina*, 3,5% (m/v) adenina, 2,7% (m/v) guanina, 3% (m/v) uracil, 20% (m/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% (m/v) NaCl, 1% (m/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% (m/v) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02% (m/v) riboflavina, 0,005% (m/v) biotina, 0,005% (m/v) ácido fólico, 0,04% (m/v) piridoxamina, 0,04% (m/v) ácido pantotênico, 0,004% (m/v) ácido para-aminobenzóico, 0,02% (m/v) tiamina-HCl, 0,1% (m/v) nicotinamina, 1,8% (m/v) glicose; pH 7,0.

*Quando indicado, um ou ambos os componentes não foram adicionados ao meio.

Meio THYE + 0,3 % de Extrato de levedura

3% (m/v) THB, 0,3% (m/v) extrato de levedura. Para meio sólido foi utilizado 2,5% (m/v) de ágar.

Tampão Citrato-Glicose

2,29% (m/v) citrato de sódio, 2% (m/v) glicose; pH 7,0. Quando necessário foi adicionado 500mM KH_2PO_4 .

Tampão de lavagem

50mM KPO_4 e 10mM MgSO_4 , pH 7.2.

Tampão PUM

16,94% (m/v) K_2HPO_4 , 7,26% (m/v) KH_2PO_4 , 1,8% (m/v) uréia, 0,2% $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,1.

Tampão TAE (Corridas DNA)

242% (m/v) Tris, 57,1% (m/v) ácido acético, 100mL EDTA (0,5M pH8,0).

Tampão de ressuspensão

50mM KPO₄, 10mM MgSO₄ e 1% de glicose, pH 7.2.

Quando necessário, antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações: cloranfenicol (Cm) 100µg/mL e eritromicina (Erm) 10µg/mL

3.3 Linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos

As linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 1. Os oligonucleotídeos na Tabela 2.

Tabela 1 - Lista de linhagens e plasmídeos utilizados.

Linhagens ou Plasmídeos	Descrição	Fonte
Linhagens <i>S.mutans</i>		
UA159	Linhagem sequenciada na universidade de Oklahoma	Adíjc, 2002
SmuGLT	Δ <i>smu.1519-1522</i> :ERM ^r	Krastel, 2010
KG1	Δ <i>smu.1177c-1179c</i> :ERM ^r	Este Trabalho
Plasmídeos		
pUC18Erm	Cassete gênico para resistência à eritromicina	Ahn; Wen; Burne, 2006

Tabela 2 - Lista de oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')
5'arm1 KG1	GTTAGGTTATGATGAACGCT
3'arm1 KG1	TTCTGAA AGCTT *AGACATACTTGCTCC
5'arm2 KG1	TGATTTTCAGATAG AATTC *GTTGGC
3'arm2 KG1	GGCATTATTGCATTCTG
Fwseq KG1	ATTCGCTTGTTGAAGG
Rvseq KG1	CAGACTATGAACAGCTCC

*sítios de restrição: *HindIII* e *EcoRI*, respectivamente.

3.4 Isolamento do DNA genômico de *S. mutans*

O isolamento do DNA genômico foi feito seguindo metodologia descrita por Burne et al. (1987). Foram incubados 20 mL de cultura de *S. mutans*, crescida por 16 horas a 37 °C e 5% CO₂. A cultura foi centrifugada a 4.500g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado suspenso em 5 mL de TBS (0,121% Tris) e centrifugado a 11.000g por 5 minutos a 4 °C. Foram adicionados 545 µL de TE (50:10) (3,72% Tris, 6,07% EDTA) e lisozima (10 mg/mL), a preparação foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após esse período adicionou-se 50 µL de SDS 20% e incubou-se a 65 °C por 15 minutos. Após leve resfriamento da suspensão foi aplicado 2 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubado a 37 °C por 30 minutos. Adicionou-se 100 µL de NaCl (5M) e 80 µL de CTAB+NaCl (10% - 0,7M) e a amostra foi mantida a 65 °C por 20 minutos. A fase aquosa foi extraída da porção superior após adição de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugação a 15.500g por 5 minutos. Nova extração da fase aquosa superior foi realizada após adição de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugação nas mesmas condições. Adicionou-se isopropanol absoluto gelado a fase aquosa seguido de centrifugação a 13.000g por 30 minutos (para precipitação do DNA). O DNA precipitado foi limpo adicionando etanol 70% e centrifugando a 11.000g por 10 minutos. O precipitado final foi ressuspenso em TE (10:1) (37,2 g Tris, 121 g EDTA

por litro), tratado com 2 µL de RNase (10 mg/mL) por 15 minutos a 37 °C e estocada a -20 °C até o momento de uso.

3.5 Obtenção do mutante deletado no óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c*

A metodologia empregada na construção do mutante KG1 seguiu normas estabelecidas na literatura, baseadas na inserção de fragmento linear construído *in vitro* substituindo os genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* (LEMOS; BROWN; BURNE, 2004). As sequências dos iniciadores foram originadas a partir da sequência dos genes e adjacências obtidas no site KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>). Os iniciadores 5' arm1 KG1 e 3' arm1 KG1 foram utilizados para amplificar um fragmento de 955pb à montante do óperon em questão. Os iniciadores 5'arm2 KG1 e 3'arm2 KG1 foram utilizados para amplificar um fragmento de 1.164pb à jusante do óperon. Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, respectivamente, e ligados ao cassete de eritromicina, oriundo do plasmídeo puc18Erm, após digestão com as mesmas endonucleases. A mistura de ligação foi inserida em *S. mutans* UA159 por transformação natural.

3.5.1 Transformação de *S. mutans*

A construção *in vitro* realizada para a deleção do óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c*, foi inserida na bactéria por transformação, valendo-se das condições de competência natural desse gênero bacteriano (PERRY; WONDRACK; KURAMITSU, 1983). Foi inoculada uma colônia isolada de *S. mutans* UA159 em 5 mL BHI por 16 horas a 37 °C e 5% CO₂. Uma diluição de 1:20 foi realizada em meio BHI fresco pré-aquecido. Após 2 horas de crescimento o conteúdo do produto de ligação foi adicionado e incubado por 3 horas nas mesmas condições. Os transformantes foram semeados em placas de BHI com eritromicina (10 µg/mL) e incubados por 48 horas a 37 °C e 5% CO₂. Transformantes

positivos foram confirmados por sequenciamento e por análise dos fragmentos amplificados pelos iniciadores externos (5'arm1 KG1 e 3'arm2 KG1).

3.6 Caracterização dos mutantes KG1 e SmuGLT de *S. mutans*

3.6.1 Internalização de glutamina/glutamato radioativos (^3H)

Colônias isoladas das linhagens UA159, KG1 ou SmuGLT de *S. mutans* foram inoculadas em 5 mL de meio Berman's contendo 1% de glicose, por 16 horas a 37 °C e 5% CO₂. Após crescimento, novo inóculo foi realizado com uma diluição 1:10 em 5 mL de meio Berman's pré-aquecido a 37 °C contendo 0,1% de glicose e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ até uma DO_{600nm} 0,5. Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 4.500g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em tampão de lavagem (50mM KPO₄, pH 7.2 e 10mM MgSO₄), por duas vezes. Por fim cada linhagem foi ressuspensa, no mesmo tampão acrescido de 1% de glicose, até uma DO_{600nm} 0,4. Alíquotas de 750 µL da cultura foram acrescidas de 743 µL de tampão de lavagem com 1% de glicose e 100 µg/mL de cloranfenicol. Para os testes de captação de glutamina, foram adicionados 1 µCi de [H3⁺]-glutamina e 0,1mM de glutamina não marcada. Para os testes de captação de glutamato, foram adicionados 1 µCi de [H3⁺]-glutamato e 0,1mM de glutamato não marcado. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos (0, 2, 10 e 30 minutos), alíquotas de 100 µL foram coletadas e filtradas com a presença de 4 mL de tampão de lavagem com 1% de glicose em membranas de nitrocelulose (MilliporeTM Billerica, Massachusetts, USA). As membranas foram posteriormente imersas em vesse/s contendo 1 mL de líquido de cintilação. A radiação foi contabilizada em cintilador. Alíquotas da cultura, após lavagem e ressuspensão em DO_{600nm} 0,4 foram plaqueadas em meio BHI para quantificação bacteriana.

3.6.2 Curvas de crescimento em meios ricos

Colônias isoladas das linhagens UA159, KG1 ou SmuGLT de *S. mutans* foram inoculadas em meio BHI por 16 horas a 37 °C e 5% CO₂. Uma diluição de

1:25 foi realizada em 4 mL de meio de cultura (BHI ou THYE) pré-aquecido por 15 minutos nas mesmas condições de cultivo. A bactéria foi incubada em condições idênticas e a medida de absorbância a 600nm foi realizada no tempo zero, após 3 horas de crescimento e a cada intervalo de duas horas. Cada experimento foi feito em triplicatas.

3.6.3 Curvas de crescimento em meios definidos na presença ou ausência de glutamina e/ou glutamato

Colônias isoladas das linhagens UA159, KG1 ou SmuGLT de *S. mutans* foram inoculadas em meio BHI por 16 horas a 37 °C e 5% CO₂. Após crescimento, as culturas foram lavadas duas vezes em tampão citrato-glicose e ressuspensas em tampão PBS (1X) a uma DO_{600nm} 0,4. Novos inóculos a uma diluição de 1:25 foram realizadas em meio FMC incompleto (sem glutamato/glutamina), pré-aquecido por 15 minutos a 37 °C e 5% CO₂. Quando indicado, ao meio foi adicionado 300 µg/mL de glutamato e/ou 5 µg/mL de glutamina. A medida de absorbância a 600nm foi realizada no tempo zero, após 8 horas de crescimento e a cada intervalo de uma hora. Cada experimento foi feito em triplicatas.

3.6.4 Capacidade de adesão/produção de biofilme a superfícies abióticas

Colônias isoladas das linhagens UA159, KG1 ou SmuGLT de *S. mutans* foram inoculadas em meio BHI por 16 horas a 37 °C e 5% CO₂. Posteriormente, uma diluição de 1:100 foi realizada em meio BHI fresco, seguido por incubação nas mesmas condições até a cultura atingir DO_{600nm} 0,5. As culturas foram diluídas 1:100 em meio BM fresco, seguida de incubação de alíquotas de 200 µL dispostas em poços de microplacas de polipropileno previamente incubadas com saliva clarificada (96-well optical bottom platesTM, Nunc, Rochester, NY USA), por 48 horas a 37 °C e 5% CO₂. Poços contendo apenas o meio de cultura foram utilizados como controle negativo. Posteriormente, o meio de cultura em conjunto com as bactérias não aderidas, foram retirados por lavagem cuidadosa, por submersão, com salina e secagem do excesso de líquido, por inversão, em toalhas de papel. Após secagem

do excesso de líquido, o biofilme foi corado com 100 µL de cristal violeta a 0,1% por 15 minutos em temperatura ambiente. O processo de lavagem com salina foi realizado por mais duas vezes. Por fim, o biofilme corado foi ressuspenso com 200 µL de ácido acético (33%) por poço e a absorbância foi mensurada a 600nm em um leitor de placas de microtitulação (Multiskan EXTM, LabThermosystem). Análise estatística por teste *T-student* foi empregada com uso do programa Prism 5, versão 5.01.

3.6.5 Teste de hidrofobicidade

As culturas bacterianas das linhagens UA159, KG1 e SmuGLT foram incubadas em meio BHI por 16 horas a 37 °C e 5% CO₂ e tiveram sua DO_{600nm} aferidas até que as células atingissem duas fases distintas de crescimento celular: logarítmica e estacionária. As culturas foram lavadas três vezes com o tampão PUM, e uma DO_{500nm} 0,85 foi ajustada. Alíquotas de 3mL das suspensões bacterianas foram transferidas para tubos de vidro e tiveram suas DO_{550nm} mensuradas. Em seguida, 400 µL de n-hexadecano (Sigma Aldrich IncTM, São Paulo, São Paulo, Brasil), foram adicionados, as suspensões foram incubadas a 30 °C por 10 minutos e posteriormente homogenizadas em agitador de tubos por dois períodos de 30 segundos, com intervalo de 5 segundos de repouso entre eles. Após a separação das fases (30 minutos) a DO_{550nm} da fase aquosa foi determinada. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores de hidrofobicidade expressos em porcentagens da redução na DO_{500nm} da suspensão comparada ao valor inicial, o que representa a porcentagem de células aderidas ao n-hexadecano (GIBBONS; ETHERDEN, 1983). Análise estatística por teste *T-student* foi empregada com uso do programa Prism 5, versão 5.01.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização *in silico* dos componentes do transportador Gln e o possível transportador definido pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* de *S. mutans*

4.1.1 O óperon *gln* de *S. mutans*

Esse trabalho foi centrado em dois sistemas de transporte codificados no genoma da linhagem UA159 de *S. mutans*. O primeiro deles (Gln) foi caracterizado experimentalmente como envolvido principalmente na captação de glutamato (KRASTEL et al., 2010). Esse sistema de transporte é codificado por quatro genes estruturais (*glnQ*, *glnH*, *glnM* e *glnP*), organizados como um óperon policistrônico que codificam componentes do sistema Gln (Figura 3). O primeiro cístron, *glnQ*, codifica para ATPase. O segundo gene que se segue no óperon, *glnH*, codifica para a proteína ligadora do sistema. Os demais componentes são codificados pelos genes, *glnM* e *glnP*, cujos produtos definem o poro transmembrânico ou permease para o(s) substrato(s) transportado(s) (Figura 3).

Figura 3: Organização do óperon *gln* em *S. mutans* UA159. A organização sequencial dos cístrons e o número de nucleotídeos constituintes estão indicados na figura.

Análises comparativas com genomas de outras espécies de *Streptococcus* disponíveis no GenBank mostraram uma conservação na organização genética do óperon *gln*, em relação aos quatro cístrons, com exceção de *S. pneumoniae* D39

que apesar de apresentar os quatro cístrons, o último é definido como um pseudogene e o *S. pyogenes* MGAS315 que apresenta três cístrons (Figura 4). A análise da sequência de aminoácidos dos ortólogos da proteína GlnQ, que codifica a ATPase, sendo esse o componente mais conservado do possível sistema transportador, revelaram que essa proteína de *S. mutans* UA159 tem uma relação mais próxima ao seus ortólogos encontrados em *S. sanguinis* SK36 (84%), seguido do *S. pneumoniae* TIGR4 (82%), quando comparado com as demais proteínas expressas por outras espécies patogênicas de *Streptococcus* (Tabela 3).

Figura 4: Análise do óperon *gln* constituído pelos genes *glnQ* (codifica para a ATPase), *glnH* (codifica para a proteína ligadora), *glnM* e *glnP* (codificam para as permeases) e seus ortólogos em diferentes espécies de *Streptococcus*.

Tabela 3 - Massas moleculares preditas das proteínas do sistema Gln e análise de identidade dentre os ortólogos de *Streptococcus*.

Organismos	Número de aminoácidos (kDa)/ valores de identidade			
	GlnQ	GlnH	GlnM	GlnP
<i>S. mutans</i> UA159	260aa 28,9kDa	270aa 29,9kDa	234aa 25,9kDa	216aa 24,2kDa
<i>S. agalactiae</i> 2603 V/R	251aa 28,1kDa 82%	266a 30,2kDa 69%	231 ^a 25,2kDa 82%	216aa 24,3kDa 80%
<i>S. agalactiae</i> A909	311aa 24,6kDa 82%	266a 30,2kDa 69%	231aa 25,2kDa 81%	216aa 24,3kDa 80%
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	252aa 28,1kDa 82%	254aa 28,2kDa 52%	225aa 25,0kDa 68%	219aa 24,4kDa 76%
<i>S. pneumoniae</i> D39	129aa 14,3kDa 80% *	264aa 29,4kDa 52%	225aa 25,0kDa 68%	219aa 24,4kDa 76%
<i>S. pyogenes</i> MGAS315	209aa 23,0kDa 44%	278aa 31,7kDa 24%	-	213aa kDa %
<i>S. sanguinis</i> SK36	240aa 26,6kDa 84%	270aa 29,8kDa 57%	226aa 25,1kDa 71%	219aa 24,5kDa 80%
<i>S. thermophilus</i> LMD9	255aa 28,0kDa 79%	277aa 30,9kDa 64%	232aa 25,4kDa 81%	216aa 24,3kDa 81%

*Pseudogene em *S. pneumoniae* D39

4.1.2 O óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* de *S. mutans*

A busca por transportadores ativos da família ABC responsáveis pela captação de glutamina em *S. mutans*, revelou, além do óperon *gln* estudado por Krastel et al. (2010), a presença de um segundo óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c*. Como indicado na tabela 4, esse possível transportador compartilha identidade com componentes codificados pelo óperon *gln*. A predição de função para os componentes, segundo anotação do genoma, verificou que consiste inicialmente de uma proteína transmembrânica, responsável por definir o poro na membrana citoplasmática para passagem do nutriente, codificada pelo primeiro cístron (*smu.1179c*); posteriormente se tem uma proteína, com função de ATPase, responsável por gerar a energia necessária ao transporte do nutriente, o produto codificado pelo segundo cístron (*smu.1178c*); e, por fim uma proteína ligadora com função de reconhecimento do substrato para o produto codificado pelo terceiro cístron (*smu.1177c*) (Figura 5).

Tabela 4 - Análise de identidade compartilhada entre as proteínas codificadas pelo óperon *gln* em relação às proteínas codificadas pelos genes *smu. 1177c*, *smu. 1178c* e *1179c* de *S. mutans* UA159.

PROTEÍNAS	IDENTIDADE DE AMINOÁCIDOS	PROTEÍNAS
GlnH	26%	SMU. 1177c
GlnQ	45%	SMU. 1178c
GlnM	34%	SMU. 1179c
GlnP	34%	SMU. 1179c

Figura 5: Organização do óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* em *S. mutans* UA159. A organização sequencial dos cístrons e o número de nucleotídeos constituintes estão indicados na figura.

A análise comparativa com os genomas de outras espécies de *Streptococcus* disponíveis no GenBank mostrou a presença de ortólogos com a mesma organização genética em outras espécies bacterianas analisadas (Figura 6). A análise de identidade entre as sequências de aminoácidos codificadas por ortólogos desses genes em outras espécies de *Streptococcus* revelou valores que variaram entre 100% para *S. agalactiae* 2603 V/R e A909 e 71% para *S. pneumoniae* TIGR4 e D39, em relação ao gene *smu.1178c*, que codifica para a ATPase. (Tabela 5).

Figura 6: Análise do óperon constituído pelos genes *smu.1177c* (codifica para a proteína ligadora), *smu.1178c* (codifica para a ATPase) e *smu.1179c* (codifica para a permease) e seus ortólogos em diferentes espécies de *Streptococcus*.

Tabela 5 - Massas moleculares preditas das proteínas codificadas pelos genes do óperon *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* e análise de identidade dentre os ortólogos de *Streptococcus*.

Organismos	Número de aminoácidos (kDa)/ valores de identidade		
	Smu. 1177c	Smu. 1178c	Smu. 1179c
<i>S. mutans</i> UA159	277aa 31,3kDa	209aa 23,4kDa	213aa 23,79kDa
<i>S. agalactiae</i> 2603 V/R	276aa 31,7kDa 69%	209aa 23,1kDa 100%	213aa 24,1kDa 85%
<i>S. agalactiae</i> A909	277aa 31,8kDa 69%	209aa 23,1kDa 74%	213aa 24,1kDa 85%
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	278aa 31,0kDa 66%	209aa 23,1kDa 71%	213aa 23,9kDa 78%
<i>S. pneumoniae</i> D39	278aa 31,0kDa 66%	209aa 23,1kDa 71%	213aa 23,9kDa 78%
<i>S. thermophilus</i> LMD9	283aa 31,8kDa 67%	209aa 23,3kDa 79%	213aa 23,7kDa 87%

A busca por ortólogos do sistema formado pelas proteínas SMU.1177c, SMU.1178c e SMU.1179c no genoma de *S. sanguinis* SK36 e *S. pyogenes* MGA315 apontou a ausência desses.

4.2 Obtenção de um mutante deletado no óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* de *S. mutans*

Com o objetivo de avaliarmos o papel do sistema formado pelas proteínas SMU.1177c, SMU.1178c e SMU.1179c na fisiologia e patogenicidade de *S. mutans*,

construímos um derivado da linhagem UA159 com deleção nos três genes que compõem esse possível sistema transportador. Foram analisados alguns clones obtidos após o processo de mutagênese sítio-dirigida com o intuito de obter um mutante, o qual foi selecionado e denominado KG1. Essa linhagem mutante (KG1) contém uma deleção no óperon com a concomitante inserção de um cassete de resistência à eritromicina (Figura 7). A natureza da deleção foi confirmada por sequenciamento e pela amplificação de um fragmento de menor peso molecular, na linhagem KG1, por meio dos iniciadores Fwseq e Rvseq que pareiam com sequências que flanqueiam o óperon em questão, quando comparado ao fragmento obtido após amplificação com DNA genômico da linhagem parental. Na Figura 8 apresentamos os produtos de amplificação a partir do DNA total extraído das linhagens UA159 e KG1, confirmando a deleção dos 3 cistrons.

Figura 7: Representação esquemática da mutagênese sítio-dirigida realizado no óperon formado pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* de *S. mutans*. **A:** Representação esquemática da organização genética original do óperon constituído pelos genes *smu. 1177c*, *smu. 1178c* e *smu. 1179c*. **B:** Localização das sequências Arm 1 e Arm 2 flanqueadoras geradas para deleção do óperon. **C:** Fragmento de DNA gerado após a ligação de Arm 1 e Arm 2 ao cassete codificador de resistência à eritromicina. **D:** Representação esquemática do genoma de *S. mutans* UA159 após evento de dupla recombinação para a deleção do óperon formado pelos genes *smu. 1177c*, *smu. 1178c* e *smu. 1179c*.

Figura 8: Amplificação das regiões genômicas que delimitam os genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* de *S. mutans*. Amostras: 1- Marcador de peso molecular (1kb ladder O'Gene Ruler™- Fermentas®); 2- Amplificação do fragmento na linhagem de *S. mutans* UA159 (Arm1), 3- Amplificação do fragmento na linhagem de *S. mutans* UA159 (Arm2), 4- Cassete de eritromicina, 5- Fragmento da linhagem KG1 amplificado com os iniciadores Fwseq e Rvseq, 6- Fragmento da linhagem parental UA159 amplificado com os iniciadores Fwseq e Rvseq.

4.3 Determinação da funcionalidade do transportador em relação à captação de glutamina/glutamato e crescimento celular

4.3.1 Internalização de glutamina/glutamato radioativos (^3H)

Com o objetivo de avaliar o transporte de glutamina e glutamato nas linhagens parental UA159 e no mutante KG1 foram padronizados ensaios de captação desses aminoácidos utilizando compostos tritiados. Foi empregado também o mutante SmuGLT, descrito por Krastel et al. (2010), deletado no óperon *gln* envolvido na captação de glutamato. Os resultados obtidos confirmam a capacidade da linhagem parental em captar glutamato e a redução de sua incorporação pelo mutante SmuGLT (aproximadamente 85%) e demonstram a diminuição na internalização desse aminoácido pelo mutante KG1 (aproximadamente 65%). Em relação à captação de glutamina, foi possível demonstrar a captação desse aminoácido pela linhagem parental UA159 e uma diminuição de aproximadamente 80% da capacidade de incorporação de glutamina pelo mutante KG1 em relação à linhagem parental. O mutante SmuGLT apresentou

um comprometimento também na captação de glutamina (aproximadamente 50%) (Figura 9 A e B).

Figura 9: Captação de glutamina **(A)** e glutamato **(B)** pelas linhagens UA159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S. mutans*. Culturas foram feitas em meio Berman's e tiveram suas D.O.s_{600nm} ajustadas em 0.4, previamente ao ensaio. Os resultados apresentados são réplicas de três ensaios independentes.

4.3.2 Crescimento das linhagens parental UA159 e mutantes KG1 e Smu GLT de *S. mutans* em meios ricos e definidos

Visando caracterizar a relevância dos óperons formados pelos genes *smu.1177c-1179c* e *gln* no crescimento *in vitro* do *S. mutans*, determinamos as curvas de crescimento dos mutantes KG1 e SmuGLT em meios de cultura ricos e definidos. Em relação aos meios ricos, como observado na figura 10, o crescimento do mutante SmuGLT foi reduzido em relação à linhagem parental nas primeiras horas de cultivo, mas após 10-11 horas de cultivo as densidades das culturas atingiram valores semelhantes. Resultados similares, mas com diferenças ainda mais sutis, foram observados em relação à linhagem KG1. Tal comportamento reflete um prologamento da fase de adaptação das linhagens mutantes, particularmente no mutante SmuGLT, em relação à linhagem parental. (Figuras 10 e 11).

Figura 10: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S. mutans* em meio BHI. Os gráficos representam três experimentos independentes cada um com três repetições.

Figura 11: Crescimento das linhagens parentais UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S. mutans* em meio THYE. Os gráficos representam três experimentos independentes cada um com três repetições.

Em meio definido FMC completo, as duas linhagens mutantes apresentaram comportamento semelhante ao observado em meios ricos e taxas de crescimento próximas na fase logarítmica, porém inferiores ao observado na linhagem parental (Figura 12).

Figura 12: Crescimento das linhagens parentais UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S. mutans* em meio FMC completo. Os gráficos representam três experimentos independentes cada um com três repetições.

A não adição de glutamina ou glutamato no meio definido FMC não impediu o crescimento das linhagens mutantes em relação à linhagem parental (Figuras 13 e 14). Outro fator importante é de que a absorbância máxima alcançada pelas linhagens foram sempre menores, em comparação com os meios ricos ou FMC

completo, quando da ausência de um dos aminoácidos no meio definido, indicando que, apesar de presente, o metabolismo envolvido na síntese de glutamina à partir de glutamato, ou vice-versa, não foi suficiente para permitir o crescimento ótimo.

Figura 13: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S.mutans* em meio FMC com glutamato e sem glutamina. Os gráficos representam três experimentos independentes cada um com três repetições.

Figura 14: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S.mutans* em meio FMC sem glutamato e com glutamina. Os gráficos representam três experimentos independentes cada um com três repetições.

No entanto, quando a glutamina e o glutamato não foram acrescidos ao meio FMC todas as linhagens não foram capazes de aumentar a densidade celular, indicando ausência de crescimento celular (Figura 15). Esse resultado demonstra que a presença desses aminoácidos é essencial para a viabilidade da linhagem UA159 de *S. mutans*. Além disso, nossos resultados indicam, pela primeira vez, que os dois transportadores estudados possuem uma clara sobreposição de função em *S. mutans* UA159.

Figura 15: Crescimento das linhagens parental UA 159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S. mutans* em meio FMC sem glutamato e glutamina. Os gráficos representam três experimentos independentes cada um com três repetições.

4.4 Papel do sistema de transporte identificado na expressão de características envolvidas com a patogenicidade do *S. mutans*

4.4.1 Capacidade de adesão/produção de biofilme a superfícies abióticas

A capacidade de adesão a superfícies abióticas e a produção de biofilme representam características associadas à virulência do *S. mutans*. Com o intuito de avaliar o impacto das deleções dos óperons *gln* e *smu.1177c-1179c* na capacidade do *S. mutans* em aderir a superfícies abióticas, comparamos a adesão das linhagens UA159 e dos mutantes KG1 e SmuGLT em placas de poliestireno. Para tal finalidade

as linhagens foram cultivadas em meio BHI com adição de glicose ou sacarose. Como demonstrado na Figura 16, a inativação do óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu. 1178c* e *1179c* aumentou a capacidade de aderência/produção de biofilme, em especial no meio com sacarose como fonte de carbono, da linhagem KG1 quando comparado com a linhagem parental e o mutante SmuGLT. Coletivamente esses dados indicam que a ausência das proteínas codificadas por esse sistema de transporte interfere na capacidade de adesão a superfícies abióticas e, conseqüentemente, da formação de biofilme pelo *S. mutans* UA159.

Figura 16: Adesão das linhagens UA159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S. mutans* em poliestireno. Os ensaios foram feitos em placas de poliestireno com bactérias cultivadas em meio BM acrescido com glicose ou sacarose. As barras brancas indicam dados obtidos com a linhagem UA159, as barras cinzas com o mutante KG1 e as barras pretas com a mutante SmuGLT. Os valores representam médias e desvios padrão de três experimentos independentes.

4.4.2 Ensaio de Hidrofobicidade

Visto que o mutante KG1 de *S. mutans* apresentou alteração na capacidade de aderência, verificamos se a hidrofobicidade da superfície de células do mutante

KG1 poderia estar alterada em relação à linhagem parental. Como indicado na figura 14, células da linhagem KG1 não mostraram diferenças em relação à linhagem parental. No entanto, células da linhagem SmuGLT apresentaram-se mais hidrofóbicas do que células da linhagem parental e mutante KG1. Resultados semelhantes foram obtidos com células colhidas em fase logarítmica de crescimento assim como células em fase estacionária (Figura 17).

Figura 17: Hidrofobicidade de bactérias das linhagens UA159 e mutantes KG1 e SmuGLT de *S. mutans*. As células foram analisadas na fase logarítmica (barras brancas) e estacionária (barras cinzas) de crescimento. As amostras foram cultivadas em meio BHI a 37 °C com 5% de CO₂. As barras representam a média de três experimentos independentes, expressos como porcentagem de células aderidas ao n-hexadecano. * significância estatística ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho caracterizamos, pela primeira vez, a funcionalidade de um sistema ABC de transporte para glutamina/glutamato na linhagem UA159 de *S. mutans*. Esse sistema foi localizado após comparação com as sequências de componentes de um sistema de captação de glutamato recentemente descrito nessa espécie de bactéria. O novo sistema é principalmente dedicado à captação de glutamina, mas participa de modo significativo na captação de glutamato. Outro aspecto relevante foi a demonstração de uma possível relação entre esses sistemas de transporte e a expressão de características relacionadas à virulência, como a aderência/produção de biofilme, em *S. mutans*.

Com o intuito de buscar parálogos do sistema de captação Gln, que em trabalho anterior de Krastel et al. (2010) foi descrito como principal responsável pela captação de glutamato em *S. mutans*, o genoma da linhagem UA159 de *S. mutans* foi analisado revelando a presença de um óperon policistrônico composto por três genes, *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c*, descrito como um sistema putativo de captação ativa de glutamina (ADJÍC et al., 2002). A presença de sistemas diferentes para a captação de glutamina e glutamato já foi observada em enterobactérias e bactérias do gênero *Bacillus* (PLATE et al., 1979; RAUNSER et al., 2006; YERNOOL et al., 2003). No genoma de *S. pneumoniae* D39, foram observados a presença de seis sistemas putativos de captação de glutamina, que foram submetidas a análises comparativas de sequência com 12 linhagens de *Streptococcus*, incluindo *S. mutans* UA159, demonstrando a presença do óperon estudado, *smu.1177c-1179c* (HÄRTEL et al., 2011). No entanto, até o presente momento, não há relato na literatura que explore o papel do sistema codificado pelos genes *smu.1177c-1179c* ou seus ortólogos. Esse óperon apresenta uma grande conservação em sua organização, bem como na sequência das proteínas ortólogas codificadas por seus genes, o que indica a importância desse sistema para a fisiologia de diferentes espécies de *Streptococcus*.

Um ponto interessante da análise foi a observação de que a conservação das sequências dos óperons formados pelos genes *smu.1177c-1179c* nas espécies de *Streptococcus* não se limita aos componentes ATPásicos e às permeases, usualmente mais conservados entre sistemas ABC de transporte ortólogos. Nesse caso específico, também observamos uma conservação significativa entre os

componentes ligadores, o que sugere uma conservação na especificidade/afinidade do sistema em relação ao substrato transportado. Além disso, a presença de ortólogos desse sistema em espécies que, assim como *S. mutans*, são habitantes da microbiota oral sugere que a captação de glutamina/glutamato possa ter um papel significativo na adaptação dessas bactérias nesse ambiente. No entanto, o fato de não encontrarmos esse sistema de transporte em duas espécies de *Streptococcus* indica que tal generalização ainda é prematura e que outras estratégias de captação desses substratos devem existir em espécies desse gênero.

Para analisarmos o papel dos genes *smu.1177c-1179c* na fisiologia de *S. mutans* UA159 priorizamos a obtenção de um mutante com deleção desses genes. Em *S. mutans* três principais estratégias de mutagenese são comumente empregados: (i) o uso de transposons, (ii) deleção por recombinação homóloga com vetores que carregam alelos mutados e (iii) deleção com o emprego de fragmentos lineares de DNA. O uso de transposons para deleção gênica traz como desvantagem o fato da inserção aleatória em diferentes pontos do genoma de *S. mutans*, necessitando de uma exaustiva e trabalhosa seleção de candidatos a mutantes com utilização de testes moleculares e fenotípicos para sua validação (PROCINO et al., 1988). No caso específico desse óperon, uma característica essencial que desencorajou a utilização dessa técnica foi o fato de não haver função associada ao óperon alvo, limitando a seleção de mutantes.

O emprego de mutagenese sítio dirigida com vetores que transportam alelos mutados traz como vantagem a especificidade, direcionando a deleção ao óperon de escolha. No entanto, o uso desse sistema leva à necessidade de clonagem gênica e de passos posteriores para a escolha de mutantes que apresentem a inserção do alelo mutado e a excisão do plasmídeo do genoma (BISWAS et al., 1993). Partindo do princípio que *S. mutans* apresenta competência natural, foi possível utilizar fragmentos lineares para a transformação da linhagem parental. Desse modo, podemos aplicar com precisão a técnica de mutagenese sítio-dirigida. A presença de extremidades homólogas às regiões adjacentes à deleção no alelo mutado permitiu que o mutante procurado fosse obtido sem a necessidade de etapas de clonagem, otimizando um processo que, em geral, é árduo e trabalhoso (KAJFASZ et al., 2009). Dessa forma, um mutante com a deleção dos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c* foi obtido com sucesso após substituição por um cassete de resistência à eritromicina.

Após a obtenção do mutante no possível transportador de glutamina, partimos para a realização de ensaios de captação com o intuito de avaliar a capacidade de incorporação de glutamina e glutamato tritiados por essa linhagem e valendo-se das linhagens parental UA159 e mutante SmuGLT como controles. Como observado em trabalho anterior de Krastel et al. (2010) a linhagem UA 159 foi capaz de captar glutamato, enquanto que a linhagem SmuGLT apresentou uma drástica redução (90%) na incorporação desse aminoácido. Em relação à captação de glutamina, pela primeira vez, demonstramos que a mesma linhagem parental é capaz de captar esse aminoácido. Além disso, constatamos que o parálogo do óperon *gln* de *S. mutans* UA159 é o principal responsável pela captação de glutamina, dado que o mutante gerado apresentou uma redução na ordem de 80% da capacidade de incorporação desse aminoácido. Vale destacar que esse estudo representa o primeiro relato sobre o papel desse óperon na captação de nutrientes pelo *S. mutans* e, possivelmente, em outras espécies do gênero.

Outro aspecto interessante foi a observação de que a deleção desse óperon no mutante KG1, também levou a uma redução na capacidade de internalizar glutamato, porém não tão expressiva como aquela apresentada pelo mutante SmuGLT. Do mesmo modo, o mutante SmuGLT apresentou uma redução na capacidade de incorporação de glutamina, porém aquém ao observado com o mutante KG1. Essa sobreposição funcional em relação aos dois aminoácidos testados não foi explorada no trabalho de Krastel et al. (2010). Esses autores descreveram que a deleção do óperon *gln* não reduziu de forma significativa a incorporação de glutamina, por ensaios de competição com glutamato tritiado.

Para esclarecer tais evidências analisamos o crescimento das linhagens KG1 e SmuGLT em diferentes meios de cultura. Dentre as condições testadas, as linhagens mutadas apresentaram um prologamento da fase de adaptação, em relação à linhagem parental em meios ricos, sugerindo que as deleções gênicas levaram a um aumento no período de síntese de macromoléculas, provavelmente devido a deficiência na internalização dos aminoácidos provocada pela ausência desses sistemas de transporte. Já na fase de crescimento estacionária esse comportamento não foi observado e as duas linhagens mutantes atingem densidades celulares semelhantes àquela obtida com a linhagem parental. Além disso, ao observarmos o perfil de crescimento das linhagens mutantes em meio FMC com ausência de glutamina ou glutamato a diferença no perfil de replicação

celular não foi significativa em relação à linhagem parental. Esses resultados sugerem que a presença de pelo menos um dos dois sistemas de transporte é suficiente para garantir as necessidades de glutamina/glutamato do *S. mutans* e que o sistema de transporte codificado pelos genes *1177c*, *smu.1178c* e *smu.1179c*, assim como pelo óperon *gln* estão envolvidos na captação de glutamina e glutamato.

Comprovado o papel dos genes *smu.1177c-1179c* na capacidade de captação de glutamina, voltamos nossa atenção para a possível associação desse sistema com a virulência de *S. mutans*. Relatos anteriores indicam que o sistema de glutamina está envolvido com a patogênese de diferentes espécies bacterianas. Em *Salmonella typhimurium* a deleção do sistema de alta afinidade de captação de glutamina levou à redução na patogenicidade em modelo murino (KLOSE; MEKALANOS, 1997). Na busca por genes associados à capacidade de estreptococos do grupo B aderir à fibronectina, foi demonstrado, em uma biblioteca de mutantes, que a deleção em um gene associado ao sistema de captação de glutamina reduziu em mais de 90% essa característica (TAMURA; NITTAYAJAR; SCHOENTAG, 2002). Estudos realizados com dois sistemas de transporte de glutamina em *S. pneumoniae* D39 demonstraram que a capacidade de captar esse aminoácido do ambiente externo contribui na patogênese dessa bactéria em camundongos, possivelmente pela importância que a disponibilidade de glutamina externa representa para a linhagem bacteriana poder resistir ao estresse oxidativo, dado que a deleção desses sistemas diminuiu a viabilidade intracelular da bactéria (HÄRTEL et al., 2011). Nossos resultados indicam que o sistema de transporte de glutamina estudado interfere na adesão de *S. mutans* na superfície abióticas.

O principal fator associado à virulência de *S. mutans* se encontra na sua capacidade de aderir firmemente a superfícies abióticas e produzir biofilme, permitindo sua fixação na superfície dental e sua proteção contra agentes mecânicos e defesa imunológica presentes na cavidade oral (HUANG et al., 2008). O processo de formação de biofilme por essa bactéria envolve a presença de sacarose e a produção de polímeros de açúcar, chamados de polissacarídeos extracelulares. Esse processo ocorre tanto na célula bacteriana quanto em seu microambiente, pela ação das enzimas glicosiltransferases secretadas (CHIA; YANG; CHEN, 1998). O mutante KG1 apresentou um aumento na capacidade de aderência/produção de biofilme nas condições testadas, demonstrando que o sistema de captação de glutamina interfere neste aspecto essencial da patogênese

de *S. mutans*. Podemos teorizar um papel indireto dessa mutação, na qual a redução da capacidade de captação de glutamina poderia estar funcionando como um sinal para a bactéria sobre a escassez desse nutriente em seu microambiente, o que poderia levar ao aumento da necessidade de produção de polissacarídeos extra-celulares. Tais hipóteses estão de acordo com observações anteriores baseadas em dados obtidos na deleção do sistema de captação de ferro da mesma bactéria (FRANCESCA et al., 2004).

Em estudo realizado por Gibbons e Etherden. (1983), a análise do perfil da capacidade de interação entre bactérias orais e o componente hidrofóbico n-hexadecano demonstrou uma correlação positiva entre a capacidade de adesão à saliva e ao n-hexadecano, indicando que, em conjunto com interações complementares, quanto mais hidrofóbico a superfície de uma bactéria, maior sua ligação à película adquirida de elementos dentais. Na nossa avaliação, o mutante SmuGLT mostrou maior taxa de partição ao n-hexadecano com relação à linhagem parental, enquanto que a linhagem KG1 não apresentou diferença. A maior capacidade de interação entre SmuGLT e n-hexadecano é um indício de que a eliminação do sistema Gln levou a uma alteração no perfil hidrofóbico de sua superfície. Não há, até o momento na literatura, descrição sobre a deleção de um sistema ABC de transporte e a alteração do perfil hidrofóbico de superfície bacteriano, porém é possível que a diminuição da incorporação de um nutriente essencial como a glutamina altere a expressão de genes e, conseqüentemente, o perfil proteico de sua superfície. No entanto, a correlação entre hidrofobicidade de superfície bacteriana e a capacidade de adesão a superfícies abióticas necessita de análises experimentais mais detalhadas.

Esse trabalho descreve, pela primeira vez, a funcionalidade de um sistema de captação de glutamina em *S. mutans*. Além disso, demonstramos sua conservação entre diferentes espécies do gênero *Streptococcus* e seu papel na capacidade de aderência/produção de biofilme. Esses resultados indicam, portanto, que o óperon constituído pelos genes *smu.1177c*, *smu.1178c* e *smu.1177c* apresenta papel importante na fisiologia de *S. mutans*.

6 CONCLUSÕES

Esse trabalho descreve a presença e a funcionalidade de um óperon relacionado diretamente na captação de glutamina/glutamato em *S. mutans*, bem como sua alta conservação organizacional e de sequência em espécies do gênero *Streptococcus*. Além disso, nossos estudos revelaram que o sistema de transporte identificado pode estar relacionado com a capacidade de aderência e formação de biofilme pela linhagem UA159 de *S. mutans*.

REFERÊNCIAS*

- AJDÍĆ D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVIC, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; J. I. A. H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B. A.; FERRETI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, n. 22, p. 14494-14439, 2002.
- AHN, S. J.; WEN, Z. T.; BURNE, R. A. Multilevel control of competence development and stress tolerance on *Streptococcus mutans* UA159. **Infection and Immunity**, n. 74, p. 1631-1642, 2006.
- ALTUSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- BERGER, E. A. Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 5, p. 1514-1518, 1973.
- BISWAS, I.; GRUSS, A.; EHRLICH, S. D.; MAGUIN, E. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 11, p. 3628-3635, 1993.
- BURNE, R. A.; SCHILLING, K.; BOWEN, W. H.; YASBIN, R. E. Expression, purification, and characterization of an exo- β -D-fructosidase of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 10, p. 4507-4517, 1987.
- CASTAÑO, I.; BASTARRACHEA, F.; COVARRUBIAS A. A. gltBDF operon of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, n. 170, p. 821-827, 1988.
- CHEN, G.; RUSSEL, J. B. Transport of glutamine by *Streptococcus bovis* and conversion of glutamine to pyroglutamic acid and ammonia. **Journal of Bacteriology**, n. 171, p. 2981-2985, 1989.
- CHIA, S-J.; YANG, C-S.; CHEN, Y-J. Functional analyses of a conserved region in glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 10, p. 4797-4803, 1998.
- DASHPER, S. G.; RILEY, P. F.; REYNOLDS, E. C. Characterization of glutamine transport in *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology Immunology**, n. 10, p. 183-187. 1995.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS: **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DASSA, E. ABC transport. In: LEDDENBERG, J. **Encyclopedia of Microbiology**, v. 1, p. 1-12, 2000.

FRANCESCA, B.; AJELLO, M.; BOSSO, P.; MOREA, C.; PETRUCCA, A.; ANTONINI, G.; VALENTI, P. Both lactoferrin and iron aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **BioMetals**, v. 17, n. 3, p. 271-278, 2004.

GIBBONS, R. J.; ETHERDEN, I. Comparative hydrophobicities of oral bacterial and their adherence to salivary pellicles. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1190-1196, 1983.

HAMADA, S.; SLADE H. D. Biology, immunology and carcinogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Review**, v. 44, n. 2, p. 331-384, 1980.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 63, n. 3, p. 407-411, 1984.

HAMILTON, I. R.; BUCKLEY, N. D. Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. **Oral Microbiology Immunology**, n. 6, p. 65-71, 1991.

HARDIE, J. M. Oral Microbiology: Current Concepts in the microbiology of dental carie and periodontal disease. **Brazillian Dental Journal**, v. 172, n. 7, p. 271-278, 1992.

HARTEL, T.; KLEIN, M.; KOEDEL, U; ROHDE, M.; PETRUSCHKA, L.; HAMMERSCHMIDT, S. Impact of glutamine transporters on Pneumococcal fitness under infection-related conditions. **Infection and Immunity**, v.79, n. 1, p. 44-58, 2011.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 67-113, 1992.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: phisiology, structure and mechanism – an overview. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 205-210, 2001.

HOUTE, J. V. Roule of micro-organisms in caries etiology. **Journal Dental Research**, v. 73, p. 672-681, 1994.

HUANG, M.; MENG, L. Y.; FAN, M. W.; HU, P.; BIAN, Z. Effect of biofilm formation on virulence factor secretion via the general secretory pathway in *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, n. 53, p. 1179-1185, 2008.

KAJFASZ, J. K.; MARTINEZ, A. R.; RIVIERA-RAMOS, I.; ABRANCHES, J.; KOO, H.; QUIVEY, R.G.; LEMOS, J.A. Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2060-2068, 2009.

KIM, K. H.; BONG, Y. J.; PARK, J. K.; SHIN, K. J.; HWANG, K. Y.; KIM, E. E. Structural Basis for glutamate racemase inhibition. **Journal of Molecular Biology**, n. 372, p. 434-443, 2007.

KLOSE, K. E.; MEKALANOS, J. J. Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates *Salmonella typhimurium* virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 587-596, 1997.

KRASTEL, K.; DILANI, B. S.; MAIR, R.; DOWNEY, J. S.; GOODMAN, S. D.; CVITKOVITCH, D. G. Characterization of a glutamate transporter operon. *glnQHMP*, in *Streptococcus mutans* and its role in Acid Tolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 4, p. 984-993, 2010.

LEMOS, J. A.; BROWN Jr, T. A.; BURNE, R. A. Effectd of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p.1431-1440, 2004.

LINTON, K. J.; HIGGINS, C. F. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 5-13, 1998.

LOO, C. Y.; CORLISS, D. A.; GACESHKUMAR, N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. **Journal Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1374-1382, 2000.

MICHALEK, S. M.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H.; OCHIAI, K.; MCGHEE, J. R. Oral Ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. **Infection and Immunity**, v. 33, n. 3, p. 690-696, 1981.

MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics**: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Nova York: Cold Spring Harbor, 1992.

MOUREZ, M.; HOUFNUNG, J.; DASSA, E. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmatic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. **EMBO Journal**, v. 4, n. 11, p. 2287-2293, 1997.

MOUTRAN, A.; QUAGGIO, R. B.; BALAN, A.; FERREIRA, L.C.S.; FERREIRA, R.C.C. The oligopeptide (Opp) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri*. **Current Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 354-359, 2003.

NEPOMUCENO, R. S. L.; TAVARES, M. B.; LEMOS, J. A.; GRISWOLD, A. R.; RIBEIRO, J. L.; BALAN, A.; GUIMARÃES, K. S.; CAI, S.; BURNE R. A.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. The oligopeptide (*opp*) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence and characterization. **Oral Microbiology Immunology**, v. 22, n. 4, p. 277-284, 2007.

NOJI, S.; SATO, Y.; SUZUKI, R.; TANIGUCHI, S.; Effect of intracellular pH and potassium ions a primary transport system for a glutamate/aspartate in *Streptococcus mutans*. **European Journal Biochemistry**, n. 175, p. 491-495, 1988.

PERRY, D.; WONDRACK, L. M.; KURAMITSU, H. K. Genetic transformation of putative cariogenic properties in *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 722-727, 1983.

PLATE, C. A. Requirement for membrane potential in active transport of glutamine by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 137, n. 1, p. 221-225, 1979.

POOLMAN B.; SMID, E. J.; KONINGS, W. N. Kinetic properties of a phosphate-bond-driven glutamate-glutamine transport system in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus Cremoris*. **Journal of Bacteriology**, n. 169, p. 2755-2761, 1987.

PROCINO, J. K.; MARRI, L.; SHOCKMAN, G. D.; DANEO-MOORE, L. Tn916 insertional inactivation of multiple genes on the chromosome of *Streptococcus mutans* GS-5. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 11, p. 2866-2870, 1988.

RAUNSER, S.; APPEL, M.; GANEA, C.; GELDMACHER-KAUFER, U.; FENDLER, K.; KUHLBRANT, W. Structure and function of prokaryotic glutamate transporters from *Escherichia coli* and *Pyrococcus horikoshi*. **Biochemistry**, n. 45, p. 12796-12805, 2006.

SATO, Y.; NOJI, S.; SUZUKI, R.; TANIGUCHI, S. Dual mechanism for stimulation of glutamate transport by potassium ions in *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, n. 171, p. 4963-4966, 1989.

SHEN, Q.; SIMPLACEANU, V.; COTTAM, P. F.; HO, C. Proton nuclear magnetic resonance studies on glutamine-binding protein from *Escherichia coli*: formation of intermolecular and intramolecular hydrogen bonds upon ligand binding. **Journal of Molecular Biology**, n. 210, p. 849-857, 1989.

SHEN, Q.; SIMPLACEANU, V.; COTTAM, P. F.; WU, J.-L.; HONG, J.-S.; HO, C. Molecular genetic, biochemical and nuclear magnetic resonance studies on the role of the tryptophan residues of glutamine-binding protein from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, n. 210, p. 859-86, 1989.

SMITH, R. J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, n. 14, p. 40S-44S, 1990.

TAMURA, G. S.; NITTAYAJAR A.; SCHOENTAG, D. L. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of Group B streptococci. **Infection and Immunity**, n. 70, p. 2877-2885, 2002.

TAO, L.; SUTCLIFFE, I. C.; RUSSELL, R. R. B.; FERRETI, J. J. Transport of sugars, including sucrose, by the msm transport system of *Streptococcus mutans*. **Journal of Dental Researchs**, n. 72, p. 1386-1390, 1993.

TERLECKYJ, B.; WILLETT, N. P.; SHOCKMAN, G. D. Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. **Infection Immunity**, v. 11, n. 4, p. 649-655, 1975.

YAN, D. Protection of the glutamate pool concentration in enteric bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 104, p. 9475-9480, 2007.

YERNOOL, D.; BOUDKER, O.; FOLTA-STOGNIEW, E.; GOUAUX, E. Trimeric subunit stoichiometry of the glutamate transporters from *Bacillus caldotenax* and *Bacillus stearothermophilus*. **Biochemistry**, n. 42, p. 12981-12988, 2003.

YOUNG, J.; HOLLAND, I. B. ABC transporters: Bacterial exporters-revisited five years on. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1461, n. 1, p. 177-200, 1999.