LARISSA ANTELO DE SÁ

**Determinação do papel estrutural que proteínas auxiliares
exercem para ativação das glicosiltransferases na biossíntese de
antibióticos macrolídeos**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius
Bertacine Dias

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

SÁ, L. A. **Determinação do papel estrutural que proteínas auxiliares exercem para ativação das glicosiltransferases na biossíntese de antibióticos macrolídeos.** 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Produtos naturais constituem uma das principais fontes de moléculas bioativas que possuem diversas aplicabilidades. Dentre os produtos naturais, policetídeos representam uma ampla classe de compostos estruturalmente diversos cuja atividade biológica, muitas vezes está relacionada com os grupos funcionais que estão ligados ao seu esqueleto central (aglicona). Os macrolídeos representam uma classe de antibiótico amplamente utilizado e são um exemplo de policetídeos cuja atividade é dependente de moléculas de açúcares. As enzimas que realizam a glicosilação de policetídeos são as glicosiltransferases, as quais apresentam uma especificidade estrita para 6-desoxiaçúcares, porém uma especificidade relaxada para açúcares não usuais e substratos aceptores. Estudar essa flexibilidade catalítica das glicosiltransferases de produtos naturais pode contribuir para a geração de novos compostos através de glicodiversificação. Esses novos compostos podem apresentar novas atividades biológicas e propriedades farmacocinéticas melhoradas. Além da especificidade relaxada, existe um pequeno grupo de glicosiltransferases que possui um comportamento peculiar no qual uma proteína auxiliar é necessária para sua atividade catalítica, por exemplo o par TylM2/TylM3 envolvidos na biossíntese do antibiótico macrolídeo tilosina em *Streptomyces fradiae*. Estudar a interação e as mudanças conformacionais que ocorrem durante a formação do complexo glicosiltransferase-proteína auxiliar é fundamental para entender a influência que essas proteínas auxiliares exercem sobre as glicosiltransferases, e com isso gerar informações que possam ser úteis na aplicação de glicodiversificação. Neste trabalho foi realizado a subclonagem de genes sintéticos que codificam a glicosiltransferase TylM2 e a proteína auxiliar TylM3 e as proteínas recombinantes foram produzidas e purificadas. Além disso foram realizadas técnicas de caracterização estrutural para proteína TylM2 no qual essa glicosiltransferase parece formar um tetrâmero em solução na ausência de sua proteína auxiliar. Ensaio de cristalização com TylM2 rendeu cristais que difratam a uma resolução abaixo de 3,0Å, mesmo após tentativas de otimização, que dificultam a determinação de sua estrutura. A criação de modelos teóricos por modelagem comparativa para TylM2 e TylM3 permitiu uma investigação sobre possíveis diferenças entre a TylM2 e suas homólogas.

Palavras-chave: Produtos naturais. Macrolídeos. Glicosiltransferase. Proteína auxiliar.

ABSTRACT

SÁ, L. A. **Determining the structural role that auxiliary proteins have upon activation of glycosyltransferase in the biosynthesis of macrolide antibiotics.** 2017. 77 f. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Natural products compose one of the main sources of bioactive molecules that have several applications. Amongst natural products, polyketides represent a broad class of structurally diverse compounds whose biological activity is often related to the functional groups that are linked to their central skeleton (aglycone). Macrolides represent a class of widely used antibiotic and are an example of polyketides whose activity is dependent on sugar molecules. The enzymes that perform the glycosylation of polyketides are glycosyltransferases, which have a strict specificity for 6-deoxy sugars, but a relaxed specificity for unusual sugars and acceptor substrates. Studying this catalytic flexibility of glycosyltransferases of natural products may contribute to the generation of novel compounds through glycodiversification. These novel compounds may exhibit new biological activities and improved pharmacokinetic properties. In addition to the relaxed specificity, there is a small group of glycosyltransferases who have a peculiar behavior in which an auxiliary protein is required for its catalytic activity, an example of such is the TylM2 / TylM3 pair involved in the biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin in *Streptomyces fradiae*. Studying the interaction and conformational changes that occur during the formation of the glycosyltransferase-auxiliary protein complex is critical to understanding the influence that these auxiliary proteins have on glycosyltransferases, and thereby generate information that may be useful in the application of glycodiversification. In this work, synthetic genes coding the glycosyltransferase TylM2 and the auxiliary protein TylM3 was sub cloned into pET28a vectors and the recombinant proteins were produced and purified. In addition, structural characterization techniques were performed with TylM2 which appears to form a tetramer in solution in the absence of its auxiliary protein. Crystallization assays of TylM2 yielded crystals that diffracted bellow 3.0Å and presented pathologies which prevented determining of its structure, even after attempts of optimization. The creation of theoretical models by homology modelling for TylM2 and TylM3 allowed for an investigation into possible differences that make TylM2 possess a more stringent flexibility toward acceptor substrates when compared to other homologues.

Keywords: Natural products. Macrolides. Glycosyltransferase. auxiliary protein.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

Produtos naturais, também denominados de metabólitos secundários, constituem uma das principais fontes de moléculas bioativas com propriedades terapêuticas que podem ser utilizadas na área clínica humana e veterinária. Os policetídeos representam uma das classes de metabólitos secundários que apresentam uma grande diversidade estrutural, sendo produzidos por plantas, fungos e bactérias. Além disso, apresentam uma ampla variedade de propriedades terapêuticas tais como: atividades antibióticas, antifúngicas, antitumorais, antivirais, antiparasitárias e imunossupressoras (MÉNDEZ; SALAS, 2001). A Figura 1 mostra a diversidade estrutural de alguns policetídeos e suas propriedades terapêuticas.

Figura 1- Exemplos da diversidade estrutural de policetídeos encontrados na natureza e suas propriedades terapêuticas. Modificado de: Staunton, Weissman (2001).

1.2 Biossíntese de Policetídeos

A biossíntese de policetídeos, denominada PKS, envolve uma série de reações de condensação e modificação a partir de metabólitos primários (geralmente são derivados de propionil-CoA, acetil-CoA, malonil-CoA, propianato-CoA e metilmalonil-CoA) resultando na formação de uma estrutura central denominada aglicona (HEIA et al., 2011). As reações de condensação e modificação são catalisadas pelas policetídeo sintases (PKSs do inglês *PolyKetide synthase*). A síntese de policetídeos em bactérias é dividida em três grupos, baseado no arranjo das policetídeo sintases: O PKS tipo I é constituído por uma ou mais proteínas compostas por unidades, que compõem os módulos (Figura 2). Cada módulo possui os três domínios principais que são necessários para catalisar as reações de extensão, sendo eles os domínios KS (cetossintase), AT (aciltransferase) e ACP (proteína carreadora de acila). Além desses três, outros domínios que catalisam reações de modificações do grupo ceto (aglicona) são encontrados, tais como os domínios KR (cetoreductase), DR (dehidratase) e ER (enoil reductase). O PKS tipo II, como a PKS tipo I, é composta por várias proteínas, porém cada uma apresenta apenas um domínio (CHAN et al., 2009). O PKS tipo III difere dos tipos I e II por não utilizar um domínio ACP (proteína carreadora de acila) e se assemelham à PKS de plantas por apresentarem domínios relacionados à família de policetídeos CHS (calcona sintase) e STS (estilbena sintase) (STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

A grande variedade funcional e estrutural dos policetídeos está relacionada aos seguintes fatores: diversidade de unidades iniciadoras e de extensão; tamanho da cadeia formada, que é determinado pelo número de ciclos de extensão; grau de oxidação dos grupos ceto e a forma pela qual a síntese do policetídeo é terminada, podendo ser por ciclização ou hidrólise (MOORE; HERTWECK, 2002). Além disso, ocorrem outras modificações pós-síntese do policetídeo que aumenta ainda mais sua variabilidade, tais como: oxidação, no qual os grupos hidroxila e carbonila são adicionadas ao aglicona; metilação dos átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio e glicosilação, onde ocorre a decoração do aglicona com uma ou mais moléculas de açúcares-NDP (STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

Figura 2- Exemplo do policetídeo sintase (PKS) modular do tipo I mais conhecido na literatura: a biossíntese do policetídeo 6-desoxieritronalida B que dará origem ao antibiótico macrolídeo eritromicina A. Modificado de: Cane (2010).

No grupo PKS do tipo I encontramos alguns policetídeos que apresentam aplicabilidade terapêutica por possuírem ação antibacteriana, tais como tilosina, eritromicina, monensina A, rifamicina, cervimicina entre outros (STAUNTON; WEISSMAN, 2001). Esses policetídeos são compostos glicosilados, ou seja, possuem em sua estrutura um ou mais moléculas de açúcares os quais foram adicionados à aglicona por reações de glicosilação, que consiste na transferência de uma molécula de açúcar a partir de uma molécula doadora (açúcar ativado) para outra aceptora (aglicona) por meio de enzimas denominadas glicosiltransferases. Os açúcares transferidos geralmente são hexoses e muitas vezes a sua presença nos produtos naturais é essencial para que o composto apresente atividade biológica (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2008). Na Figura 2, a reação de glicosilação é realizada pelas enzimas EryBV e pelo par EryCIII/EryCII, as quais adicionam L-micarose e D-desosamina, respectivamente ao aglicona 6-desoxieritronalida B.

1.3 Açúcares NDP

Galactose e os intermediários da glicólise (glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato) são as principais fontes de carbono e energia utilizadas pelos seres vivos e além disso são moléculas precursoras utilizadas na glicosilação de metabólitos secundários, porém precisam ser ativados à açúcar-NMP (nucleotídeo monofosfato) ou açúcar-NDP (nucleotídeo difosfato).

Nessa forma ativada do açúcar, o grupo fosfonucleotídeo serve como elemento de reconhecimento para enzimas biossintéticas durante a reação de transferência do açúcar, além de fornecer a energia necessária para a reação (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2008). A Figura 3 mostra a base biossintética dos açúcares-NDP mais encontrados. Na qual a frutose-6-fosfato é convertida em manose-6-fosfato por ação da enzima fosfo-mano-isomerase durante a biossíntese de açúcares-GDP, e em glicosamina-6-fosfato pela glicosamina-6-fosfato-sintase na síntese de açúcares-UDP. A glicose-6-fosfato é também um precursor biossintético de açúcares-UDP, porém é mais comum que seja utilizado para a biossíntese de açúcares-TDP e -CDP. Outra forma de se obter açúcares-UDP é pelo catabolismo da galactose pela via de Leloir. Em todos os casos, o açúcar-6-fosfato é convertido a açúcar-1-fosfato por fosfohexose mutases antes de ocorrer a nucleotidilação, que consiste na transferência do grupo fosfonucleotídeo às moléculas de açúcar realizado pelas nucleotidil transferases. (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2008).

Figura 3- A síntese de açúcares-NDP a partir de intermediários da glicólise (frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato) e galactose. Esses monossacarídeos-6-fosfatos precisam ser convertidos a monossacarídeos-1-fosfato para serem ativados pelos nucleotidiltransferases (uridilil, guanidilil, timidilil, citidilil para formarem açúcares-UDP,-GDP, -TDP e -CDP, respectivamente).

Modificado de: Thibodeaux, Melaçon, Liu (2008) .

Elshahawi et al. (2015) relatam a existência de 15.940 produtos naturais de origem bacteriana sendo que destes, 12.514 representam produtos naturais não glicosilados e 3426 representam aqueles glicosilados. Ademais, foram contabilizados 344 tipos de moléculas de açúcares não usuais encontrados em produtos naturais bacterianos (ELSHAHAWI et al., 2015). Essa grande variedade de açúcares doadores está atribuída aos diferentes substituintes e a estereoquímica dos átomos de carbonos 2-5. Além disso, podem ocorrer mais reações de desoxigenações, transaminações e metilações nos átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio na molécula do açúcar doador, dando origem a desoxi, amino e metoxi-açúcares (MÉNDEZ; SALAS, 2001).

Os açúcares-TDP compõem a classe mais estruturalmente diversificada que é encontrada na natureza, sendo o açúcar doador mais usual para a biossíntese de produtos naturais glicosilados (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2008). A maioria dos açúcares TDP são desoxiaçúcares sendo desoxigenados no carbono 2, 3 ou 4 do anel piranose. A biossíntese de açúcares TDP ocorre a partir de uma molécula de glicose-1-fosfato, que é convertida em TDP-D-glicose pela enzima timidililtransferase e posteriormente convertido a TDP-4-ceto-6-desoxi-D-glicose pela enzima TDP-D-glicose 4,6 desidratase. A conformação D ou L dos açúcares é resultado da 5- ou 3,5-epimerase (MÉNDEZ; SALAS, 2001). Os principais D- e L-desoxihexoses podem ser vistos na figura 4 abaixo. Como TDP-4-ceto-6-desoxi-D-glicose é um intermediário chave na biossíntese de desoxi-açúcares em bactérias, a maioria dos clusters biossintéticos de produtos naturais possuem genes que codificam as enzimas timidililtransferase e 4,6-desidratase (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2008).

Figura 4- Exemplos de alguns D- e L-desoxihexoses encontrados em produtos naturais glicosilados.
Fonte: Méndez, Salas (2001).

1.4 Glicosiltransferases

As glicosiltransferases pertencem a um grupo de enzimas cuja função é catalisar a transferência de uma molécula de açúcar a partir de uma molécula doadora à uma molécula aceptora. O sítio ativo da glicosiltransferase fornece um microambiente para as moléculas doadoras e aceptoras se ligarem e para que ocorra a reação de glicosilação (LIANG et al., 2015). De acordo com o banco de dados de enzimas de carboidrato ativo (CAZy – disponível em: <http://www.cazy.org>) existem 236.104 glicosiltransferases, conhecidas ou preditas, classificadas em 98 famílias de acordo com similaridade na sequência de aminoácidos. Glicosiltransferases podem ser ainda classificadas de acordo com o mecanismo de glicosilação e com o enovelamento (WILLIAMS; THORSON, 2009). Apesar da grande diversidade na sequência de aminoácidos devido a processos de evolução, não há uma grande diversidade quanto ao mecanismo de glicosilação. Desta maneira são encontrados apenas dois

mecanismos principais: retenção e inversão; Por outro lado quanto aos tipos de enovelamento, são encontrados cinco famílias de glicosiltransferases: GT-A, GT-B, GT-C, GT-D e GT-E (LIANG et al., 2015).

Para a maioria das glicosiltransferases caracterizadas, o substrato doador é um açúcar-NDP ativado, entretanto, -NMP e poliproprenil difosfato também podem servir como açúcares doadores para determinadas glicosiltransferases (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2008). O substrato aceptor para as glicosiltransferases relacionadas com a biossíntese de produtos naturais são estruturalmente diversificados e inclui várias classes de compostos que são: peptídeos não ribossomais, por exemplo a vancomicina e teicoplanina; aminocoumarinas como novobiocina e couremicina; enedienos como caliqueamicina; macrolactonas como vicenistatina; policetídeos aromáticos como antraciclinas e macrolídeos como eritromicina e tilosina (WILLIAMS; THORSON, 2009).

A reação de glicosilação constitui no deslocamento de um substituinte anomérico do açúcar doador por um grupo funcional nucleofílico da molécula aceptor, que pode ser a aglicona ou até mesmo outros açúcares, formando assim uma ligação glicosídica (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2008). A ligação glicosídica mais comum é aquela realizada entre o substituinte anomérico do açúcar doador com o oxigênio nucleofílico de uma hidroxila da molécula aceptor, formando uma ligação O-glicosídica. Porém a ligação pode envolver átomos de nitrogênio, formando ligações N-glicosídicas; enxofre, formando a ligações S-glicosídicas e carbono, formando ligações C-glicosídicas (LAIRSON et al., 2008). Quando se trata de produtos naturais glicosilados, a ligação glicosídica mais comum é as O-glicosídicas (LIANG et al., 2015).

Como já citado acima, existem dois mecanismos de glicosilação, os quais estão relacionados com a estereoquímica da ligação glicosídica formada (Figura 5). No mecanismo de inversão, as glicosiltransferases catalisam a transferência da molécula de açúcar e a ligação glicosídica é formada com a inversão da configuração do carbono anomérico do açúcar enquanto que no mecanismo de retenção, a ligação glicosídica é formada e a configuração do carbono anomérico é mantida (WILLIAMS; THORSON, 2009).

Figura 5- Os dois mecanismos de glicosilação. À esquerda o mecanismo de retenção no qual a configuração do carbono anomérico após a formação da ligação glicosídica entre o açúcar e a molécula aceptora (aglicona) é mantida, e à direita, o mecanismo de inversão mostrando a mudança da configuração do carbono anomérico.

Na classificação baseada no enovelamento de glicosiltransferases, cinco enovelamentos típicos compõem as famílias GT-A, GT-B, GT-C, GT-D e GT-E. A família GT-A (Figura 6a) é caracterizada por um único domínio com a topologia α, β, α que se assemelha a um enovelamento do tipo *Rossmann* (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2008). A folha β central composta por 7 fitas β é flanqueada por α hélices e outra folha β antiparalela menor. Na associação entre as duas folhas β , região onde o açúcar-NDP se liga, é encontrado o motivo conservado DXD (Asp-X-Asp) no qual um íon metal bivalente irá se ligar, comumente Mn^{2+} ou Mg^{2+} , servindo como ponto de ancoragem para um grupo difosfato do açúcar NDP (LIANG et al., 2015).

Representantes da família GT-B (Figura 6b) apresentam dois domínios separados, unidos entre si por um *linker*. Cada domínio também se assemelha ao enovelamento tipo *Rossmann* sendo composto por folhas β paralelas ligada à α hélices. Entre os dois domínios ocorre a formação de uma fenda profunda, que é o local onde as moléculas aceptoras e doadoras se ligam (LAIRSON et al., 2008). Glicosiltransferases que pertencem a essa família geralmente não dependem de íons de metais bivalentes e não apresentam um motivo conservado. A ligação da molécula aceptora e o açúcar doador ocorrem no domínio N- e C-terminal, respectivamente, sendo que o domínio C-terminal é mais conservado no qual uma região rica em resíduos de glicina é encontrada (LIANG et al., 2015), enquanto que o domínio N-terminal é menos conservado, apresentando algumas variações nos loops e α -hélices próximos ao sítio ativo. Essas variações podem ser fruto da evolução para que estas enzimas pudessem se ligar a diferentes substratos. Acredita-se que a maioria das glicosiltransferases relacionadas com a biossíntese de produtos naturais bacterianos pertence à família GT-B (BRETON; et al., 2006).

A família GT-C (Figura 6c) possui um domínio N-terminal que é um domínio trans membrana e o domínio C-terminal, composto por um conjunto de α hélices que apresenta

atividade de glicosiltransferase (LIANG et al., 2015). Representantes desse grupo utilizam açúcares ligados a lipídeos como moléculas doadores e a glicosilação é dependente de um cátion bivalente (GLOSTER, 2014).

Recentemente a estrutura de uma enzima de função desconhecida denominada DUF1792 foi determinada, evidenciando que esse composto era uma glicosiltransferase envolvida na biossíntese de O-glicanos em bactérias. Por apresentar um enovelamento diferente das famílias GT-A, GT-B e GT-C, foi designado como a nova família GT-D (Figura 6d). Nessa família há um motivo altamente conservado DxE (Asp-X-Glu) (ZHANG et al., 2014). Os representantes da família GT-51 são chamadas de “tipo lisozima”, pois suas estruturas secundárias são bastante semelhantes à lisozima de bacteriófagos λ , apesar de não possuir nenhuma homologia sequencial (Figura 6e) (LIANG et al., 2015).

Figura 6- Estruturas secundárias de glicosiltransferases que representam os diferentes tipos de enovelamento. (a) GT-A: SpsA (PDB: 1QGS) da família GT2 de *Bacillus subtilis*; (b) GT-B: SpnG (PDB: 3TSA) da família GT1 de *Saccharopolyspora spinosa*; (c) GT-C: PglB (PDB: 3RCE) da família GT66 de *Campylobacter lari*; (d) GT-D: DUF1792 (PDB: 4PFX) da família GT101 de *Streptococci parasanguini* e (e) GT-tipo lisozima: PGT (PDB: 2OQO) da família GT51 de *Aquifex aeolicus*. As regiões em azul representam regiões envolvidas na glicosilação, α hélices estão em vermelho, folhas β em amarelo e loops em verde.

1.5 Antibióticos Macrolídeos

Dentre os antibióticos que apresentam sua atividade dependente de moléculas de açúcares temos os macrolídeos, que constituem uma das primeiras classes de agentes antimicrobianos descoberta (BURGIE; HOLDEN, 2008; GOLDMAN; SCAGLIONE, 2004).

A palavra macrolídeo foi inicialmente proposta por Robert Woodward em 1954 para descrever produtos naturais que continham um anel lactona macrocíclica composto por 12 a 16 átomos de carbono ligados a uma ou mais moléculas de açúcar. Porém, atualmente o termo macrolídeo abrange compostos que possuem um anel de até 62 átomos e também os semissintéticos que possuem átomos de nitrogênio no anel (figura 7). Mais de 2000 macrolídeos produzidos por bactérias, fungos, líquens, algas, plantas, invertebrados e vertebrados foram descritos, sendo que aproximadamente 40% são produzidos unicamente pela classe actinomicetos, sobretudo pelo gênero *Streptomyces* (OMURA, 2002).

Figura 7- Exemplos de macrolídeos com anel macrocíclico composto por 14 membros: (A) eritromicina, 15 membros: (B) azitromicina e 16 membros: (C) tilosina.

Fonte: Dinos; Michelinaki; Kalpaxis (2001).

Os antibióticos macrolídeos apresentam um mecanismo de ação no qual o alvo é a tradução proteica (BORISOVA et al., 2006). Estudos estruturais realizados por Harms et al. (2001) e Hansen et al. (2002) revelaram informações estruturais sobre a interação de macrolídeos de 14 átomos com a subunidade ribossomal 50S de *Deinococcus radiodurans*, e de macrolídeos de 15 e 16 átomos em complexo com a subunidade ribossomal 50s de *Haloarcula marismortui*, respectivamente. Esses estudos revelaram que os macrolídeos se ligam ao túnel de saída da cadeia polipeptídica em crescimento na subunidade 50S, predominantemente através do contato com rRNA 23S. Além disso, é através das moléculas de açúcar que é realizado o contato do antibiótico com o alvo (HANSEN et al., 2002). Essa interação com a subunidade ribossomal maior é o que torna essa classe de antibiótico altamente seletivo e, portanto muito utilizado na terapia clínica. Geralmente os macrolídeos

são ativos principalmente contra bactérias gram-positivas, embora apresentem uma limitada ação contra bactérias gram-negativas (OMURA, 2002).

Geralmente, os macrolídeos são utilizados para o tratamento de infecções causadas por *Mycoplasma pneumoniae*, doença dos legionários, infecções por clamídia, difteria, coqueluche, infecções estreptocócicas, infecções estafilocócicas, infecções por diversas bactérias, incluindo *Campylobacter*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* entre outras (BRUNTON; LAZO; PARK, 2010). Interessantemente alguns macrolídeos como a azitromicina também apresenta efeitos anti-inflamatórios, inibindo a produção de algumas interleucinas e assim, reduzindo a inflamação neutrofílica pulmonar, e portanto, podem ser utilizados no tratamento de doenças inflamatórias, tais como fibrose cística, bronquiolite obliterante, asma e bronquiolite aguda (LUISI et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que dois compostos macrolídeos de 36 átomos produzidos pelo micro-organismo marinho *Streptomyces caniferus* apresenta ação citotóxica contra células humanas de carcinoma de pulmão, adenocarcinoma da mama e carcinoma colorretal, juntamente com uma ação antifúngica fraca contra *Candida albicans* (PÉREZ et al., 2015).

Por outro lado, existem duas classes de resistência à antibióticos, a resistência intrínseca e a resistência adquirida. A resistência intrínseca está relacionada com características inerentes do microrganismo e faz com que o antibiótico não possua atividade enquanto que a resistência adquirida pode surgir a partir de mutações em determinados genes ou ser adquirido por plasmídeos ou transposons que podem ser transferidos horizontalmente de uma bactéria à outra. Além disso, o uso contínuo e indiscriminado de antibióticos gera uma pressão seletiva fazendo com que resistência a antibióticos seja adquirida (OMURA, 2002).

Vários mecanismos de resistência têm sido observados para essa classe de antibiótico, sendo eles: 1) a bomba de efluxo mediado pelos genes *msr*, *mef* e *mre*; 2) modificações no alvo do antibiótico mediado pelo gene *erm*, e 3) a inativação do antibiótico mediado pelo genes: *ere* codificando a eritromicina esterase, o gene *vgb* que codifica estreptogramina B hidrolase, macrolídeo fosfotransferase codificada pelo gene *mph* e lincosamina nucleotidiltransferase codificado pelo gene *lin* (OMURA, 2002). A resistência intrínseca encontrada em todos procariotos é a bomba de efluxo, uma maquinaria dependente de energia utilizada para transportar moléculas estranhas e tóxicas do interior da célula para o meio externo sendo impedidos de atingir níveis intracelulares suficientes para ter a ação esperada

(WALSH, 2000). Bombas de efluxo podem ser específicas para apenas um tipo de substrato ou podem ser capazes de reconhecer compostos estruturalmente diversos. Em procariotos são encontrados cinco tipos de bombas associadas com resistência à antibióticos e todos utilizam a força próton motrix como fonte energética, com exceção de transportadores ABC, (WEBBER; PIDDOCK, 2003). Na modificação do alvo, pode ocorrer a metilação de um resíduo de adenina, A2058 na unidade 23S realizada pela metiltransferase Erm utilizando S-adenosilmetionina (SAM) como co-fator (WALSH, 2000). A inativação do macrolídeo pode ocorrer através de modificações enzimáticas, por exemplo algumas cepas de *Escherichia coli* patogênicas produzem enzimas que clivam o anel macrocíclico. Ainda, foi detectada atividade de glicosiltransferase em organismos não produtores de macrolídeos que demonstraram ser capazes de inativar o antibiótico macrolídeo através da glicosilação do antibiótico, tornando-o inativo (CUNDLIFFE, 1992).

1.6 Glicodiversificação

Devido à necessidade e a importância do desenvolvimento de novos derivados de antibióticos, várias abordagens são utilizadas com o objetivo de modificar antibióticos a partir de fontes naturais visando alterar suas especificidades ou diminuir sua toxicidade. A glicodiversificação é uma técnica utilizada para se obter diferentes derivados de antibióticos através da adição ou eliminação de açúcares no esqueleto central do antibiótico (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2007). Podem-se utilizar duas estratégias para a glicodiversificação. A primeira é geração de novas estruturas não usuais através de modificações químicas de grupos funcionais de um açúcar precursor e a segunda é a produção de diferentes glicoformas pela alteração da adição de diferentes açúcares a uma molécula aceptora.

Com o uso das glicosiltransferases, utilizam-se técnicas *in vivo*, na qual se emprega a recombinação gênica para deletar, substituir, ativar ou acrescentar genes em uma determinada espécie produtora de antibiótico, como já realizado com sucesso para os antibióticos macrolídeos eritromicina e pikromicina (JUNG et al., 2007; THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2007; WU et al., 2016); e técnicas *in vitro*, que consiste na incubação da aglicona com diferentes doadores utilizando a enzima glicosiltransferase purificada, como realizado por Borisova et al. (2006) para investigar a especificidade do par DesVII/DesVIII. Existem ainda as técnicas na qual os aminoácidos do sítio ativo são mutados (THIBODEAUX; MELANÇON; LIU, 2007) ou a troca de domínios funcionais entre diferentes

glicosiltransferases, gerando proteínas quimeras que podem aceitar tanto aceptores quanto doadores diferentes (TRUMAN et al., 2009). Várias pesquisas revelam que, as glicosiltransferases apresentam uma alta especificidade para 6-desoxi açúcares porém uma especificidade relaxada tanto para as moléculas doadoras, quanto para os aceptores. Portanto, explorando a flexibilidade catalítica dessas enzimas é possível encontrar alternativas para a criação de novos derivados de macrolídeos (BORISOVA et al., 2008). Xue et al. (1998) sugerem, por exemplo, que a glicosiltransferase codificada pelo gene *desVII*, é capaz de catalisar a glicosilação tanto de macrolactonas de 12 quanto de 14 átomos.

Liang et al. (2015) relatam que atualmente são conhecidas onze glicosiltransferases que requerem a presença de proteínas auxiliares para glicosilação de produtos naturais: DesVII/DesVIII relacionadas com a biossíntese de pikromicina/metimicina em *Streptomyces venezuelae*; EryCIII/EryCII relacionada com a síntese de eritromicina em *Saccharopolyspora erythrea*; TylM2/TylM3 relacionadas com a síntese de tilosina em *Streptomyces fradiae*; MycB/MydC, relacionadas com a síntese de micinamicina em *Micromonospora griseorubida*; MegCIII/MegCII e MegDI/MegDVI relacionadas com a síntese de megalosamina em *Micromonospora megalomicea*; AngMII/AngMIII relacionadas com a síntese de angolamicina em *Streptomyces eurythermus*; Srm5/Srm6 e Srm29/Srm28 relacionadas com a síntese de spiramicina em *Streptomyces ambofaciens*; PnxGT1/PnxO5 relacionado com a síntese de FD-594 em *Streptomyces* sp. TA-0256 e AknS/AknT relacionados com a síntese de aclacinomicina A em *Streptomyces galilaeus* (LIANG et al., 2015). Apesar da alta homologia sequencial com o citocromo P450, as proteínas auxiliares não possuem o resíduo de cisteína altamente conservado em citocromos P450 que está relacionado com a ligação do grupo heme. Além disso, as proteínas auxiliares apresentam uma longa α -hélice no amino terminal da proteína que parece ter um papel importante na ativação de suas respectivas glicosiltransferases (ISIORHO et al., 2014).

A dependência de glicosiltransferase por uma proteína auxiliar foi primeiro demonstrada *in vitro* para a glicosiltransferase DesVII, que catalisa a ligação do TDP-D-desosamina ao 10-desoximetilônida ou narbonolida na biossíntese de metimicina, neometimicina, narbomicina e pikromicina em *Streptomyces venezuelae* (BORISOVA et al., 2004; BORISOVA; LIU, 2010). A caracterização de metabólitos produzidos por mutantes de *Streptomyces venezuelae* com deleção do gene *desVIII* mostrou que seu produto, uma proteína auxiliar, é importante para a biossíntese de macrolídeos glicosilados, aumentando

significativamente a reação de glicosilação da aglicona pela glicosiltransferase DesVII (BORISOVA; LIU, 2010). Estudos de complementação interespecie mostraram que DesVII consegue utilizar açúcares exógenos para glicosilar as agliconas nativas 10-desoximetinolida e narbonolida (BORISOVA et al., 2006; HONG et al., 2005) e Jung et al. (2007) mostraram que DesVII/DesVIII é capaz de glicosilar agliconas não nativas, como a tilactona de 16 membros. Além disso, quando realizado a troca da proteína auxiliar (DesVIII) da glicosiltransferase DesVII com a proteína auxiliar (TylM3) da glicosiltransferase TylM2, o par DesVII/TylM3 não conseguiu glicosilar agliconas de 12, 14 e 16 membros (10-desoximetilolida, naronolida e tilactona, respectivamente), o que foi também observado para o par TylM2/DesVIII. Porém, trocando o par DesVII/DesVIII por TylM2/TylM3, somente a tilactona foi glicosilada, sugerindo que a glicosiltransferase TylM2 apresenta uma especificidade ao substrato aceptor (aglicona) muito mais rígida quando comparada à DesVII. (JUNG et al., 2007).

Um estudo mais recente realizado por WU et al. (2016) visou investigar *in vivo* essa flexibilidade do par DesVII/DesVIII em *Saccharopolyspora erythraea*. Esses estudos sugerem que EryCII possivelmente ativa a glicosiltransferase DesVII *in vivo* formando o complexo heterólogo DesVII/EryCII, entretanto este apresenta uma atividade catalítica baixa quando comparado com os pares nativos. Possivelmente os pares nativos possuem uma maior afinidade um ao outro e acredita-se que há a formação de um complexo estável *in vivo* (WU et al., 2016), como mostrado na estrutura tridimensional obtido pelo complexo EryCII/EryCIII (Figura 8) (MONCRIEFFE et al., 2012). A função da proteína auxiliar assemelha-se a de uma chaperona que permite o correto enovelamento da glicosiltransferase, atuando como um ativador alostérico (MONCRIEFFE et al., 2012; YUAN et al., 2005). Porém não é claro se o complexo, uma vez formado é mantido durante a glicosilação com a formação de um trímero de heterodímero para DesVII e DesVIII (BORISOVA; LIU, 2010); ou se após remoção da proteína auxiliar, a glicosiltransferase ainda se mantém “ativada”, como demonstrado com EryCIII e EryCII por Yuan et al. (2005).

Figura 8- Estrutura da enzima EryCIII em complexo com EryCII evidenciando a formação de um hetero tetrâmero, formado por dois hetero dímeros.
 Fonte: Moncrieffe et al. (2012).

Através dos dados estruturais, Moncrieffe et al. (2012) pôde inferir que a proteína acessória EryCII, que apresenta alta similaridade com o citocromo P450, liga-se quase que exclusivamente no domínio N-terminal da glicosiltransferase EryCIII apesar de não apresentar interações diretas. Embora a estrutura obtida do complexo mostre a interface de interação entre estas duas proteínas, poucos detalhes puderam ser obtidos em relação ao sítio ativo, devido à baixa resolução. Deste modo, o melhor entendimento desta classe de glicosiltransferase só poderá ser obtido com a determinação da estrutura de outras glicosiltransferases similares a partir de uma resolução com maiores detalhes estruturais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora não tenha sido possível obter e determinar uma estrutura cristalográfica da glicosiltransferase TylM2 *apo* e/ou em complexo com a proteína auxiliar TylM3, estudos realizados com as homólogas DesVII e DesVIII por Borisova et al. (2008) sugerem que o papel da proteína auxiliar é estabilizar o complexo com a glicosiltransferase. A TylM3 realiza uma mudança conformacional que facilita a reação de glicosilação, já foi demonstrado que na ausência da proteína auxiliar, a glicosiltransferase não apresenta atividade catalítica. A dificuldade em se produzir as proteínas recombinantes pode estar relacionada à ausência do respectivo par das proteínas durante a expressão.

A expressão de proteínas em biorreator se mostrou um método viável, apesar da quantidade de contaminantes produzidos. Cristais da glicosiltransferase foram obtidos na mesma condição de cristalização de ambos os métodos de produção da proteína. Contudo, o grupo espacial em ambos os casos se mostraram diferente. Tanto os cristais obtidos pelo biorreator quanto em *shaker* apresentaram uma predição de 40 moléculas na unidade assimétrica, o que impossibilitou a determinação da estrutura.

O espalhamento de luz dinâmico evidenciou uma polidispersividade da amostra, pois aproximadamente 80% apresentou uma massa molecular referente a um possível tetrâmero. Um resultado semelhante foi obtido a partir do espalhamento de raios-X a baixos ângulos, corroborando com o resultado obtido anteriormente. Apesar do resultado do gel nativo não ser preciso, a presença da banda referente à glicosiltransferase se encontra abaixo de 242 KDa, o que também sugere um estado tetramérico da proteína *in vitro* na ausência da proteína auxiliar.

A modelagem comparativa permitiu gerar um modelo confiável para a proteína TylM2, no qual foi possível obter informações a respeito do sítio ativo. Esse modelo final não representa o estado conformacional no qual a proteína se encontra em complexo com a proteína auxiliar, pois devido às interações intermoleculares é possível que a glicosiltransferase apresente modificações conformacionais diferente da proteína modelada.

REFERÊNCIAS*

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- BAILEY, S. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. **Acta Crystallographica Section D**. v. 50, n. 4, p. 760–763, 1994.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997.
- BERNARD, A; PAYTON, M. Fermentation and growth of Escherichia coli for optimal protein production. **Current protocols in protein science**, Unit5.3, 5.3.1-5.3.18, 2001.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics**. USA: Dover Publication, 2000, 384 p.
- BORISOVA, S. A et al. Characterization of the glycosyltransferase activity of desVII: analysis of and implications for the biosynthesis of macrolide antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 21, p. 6534–6535, 2004.
- BORISOVA, S. A et al. Glycosylation of acyclic and cyclic aglycone substrates by macrolide glycosyltransferase DesVII/DesVIII: analysis and implications. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 9, n. 10, p. 1554–1558, 2008.
- BORISOVA, S. A. et al. Substrate specificity of the macrolide-glycosylating enzyme pair DesVII/DesVIII: Opportunities, limitations, and mechanistic hypotheses. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 17, p. 2748–2753, 2006.
- BORISOVA, S. A; LIU, H.-W. Characterization of glycosyltransferase DesVII and its auxiliary partner protein DesVIII in the methymycin/picromycin biosynthetic pathway. **Biochemistry**, v. 49, n. 37, p. 8071–8084, 2010.
- BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. **Science**, v. 253, n. 58, p. 164–170, 1990.
- BRETON, C. et al. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 16, n. 2, p. 29–37, 2006.
- BRUNTON, L; LAZO, J; PARKER K. **Goodman & Gilman: Farmacological Basis of Therapeutics**. 11 ed. USA: McGraw-Hill education, 2010. 1808 p.

* De acordo com:

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

BURGIE, E. S.; HOLDEN, H. M. Three-Dimensional Structure of DesVI from *Streptomyces venezuelae*: A Suagar N,N-Dimethyltransferase Required for dTDP-Desosamine Biosynthesis. **Biochemistry**, v.47, p.3982-3988, 2008.

CANE, D. E. Programming of erythromycin biosynthesis by a modular polyketide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27517–27523, 2010.

CASALI, N. Escherichia coli Host Strains. In: **Methods in Molecular Biology**. v. 235, Totwana, NJ: Humana Press, 2003. 316 p.

CHAN, Y. A et al. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. **Natural product reports**, v. 26, n. 1, p. 90–114, 2009.

CUNDLIFFE, E. Glycosylation of Macrolide Antibiotics in Extracts of *Streptomyces lividans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. V. 36, p. 348-352, 1992.

DINOS, G. P.; MICHELINAKI, M.; KALPAXIS, D. L. Insights into the mechanism of azithromycin interaction with an Escherichia coli functional ribosomal complex. **Molecular pharmacology**, v. 59, n. 6, p. 1441–1445, 2001.

ELSHAHAWI, S. I. et al. A comprehensive review of glycosylated bacterial natural products. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 21, p. 7591–7697, 2015.

EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution ? **Acta Crystallographica Section D**. v. 69, p. 1204–1214, 2013.

FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 101–109, 2010.

GLOSTER, T. M. Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 28, p. 131-141, 2014.

GOLDMAN, R. C., SCAGLIONE, F. The Macrolide-Bacterium Interaction and its Biological Basis. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**, v. 4, n.3, p.241-260, 2004.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006.

HANSEN, J. L. et al. The Structures of Four Macrolide Antibiotics Bound to the Large Ribosomal Subunit. **Molecular Cell**, v. 10, p. 117–128, 2002.

HARMS, È. et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, v. 413, n.6858, p. 814-821, 2001.

HEIA, S. et al. Initiation of polyene macrolide biosynthesis: Interplay between polyketide synthase domains and modules as revealed via domain swapping, mutagenesis, and heterologous complementation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6982–6990, 2011.

HÖLTJE, H. D. et al. **Molecular modeling Basic Principles and Applications**. 3. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2008, 228 p.

HONG, J. S. J. et al. The Role of a Second Protein (DesVIII) in Glycosylation for the Biosynthesis of Hybrid Macrolide Antibiotics in *Streptomyces venezuelae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 640–645, 2005.

ISIORHO, E. A. et al. Structural studies of the spinosyn forosaminyltransferase, SpnP. **Biochemistry**, v. 53, n. 26, p. 4292–4301, 2014.

JUNG, W. S. et al. Bioconversion of 12-, 14-, and 16-membered ring aglycones to glycosylated macrolides in an engineered strain of *Streptomyces venezuelae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 6, p. 1373–1381, 2007.

KABSCH, W. Integration , scaling , space-group assignment and post-refinement **Acta Crystallographica Section D**. v. 66, p. 133–144, 2010.

KANTARDJIEFF, K. A.; RUPP, B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. **Protein Science**, v. 12, n. 9, p. 1865–1871, 2003.

KHLEBNIKOV, A.; KEASLING, J. D. Effect of lacY expression on homogeneity of induction from the Ptac and Ptrc promoters by natural and synthetic inducers. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, p. 672–674, 2002.

KONAREV, P. V et al. PRIMUS: a Windows PC-based system for small- angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, p. 1277–1282, 2003.

LAIRSON, L. L. et al. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 521–555, 2008.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LAWRENCE, A.-M.; BESIR, H. Staining of Proteins in Gels with Coomassie G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid. **Journal of Visualized Experiments**, n. 30, p. 2–4, 2009.

LEE, H. Y. et al. Reconstitution and characterization of a new desosaminyl transferase, EryCIII, from the erythromycin biosynthetic pathway. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 32, p. 9924–9925, 2004.

LIANG, D.-M. et al. Glycosyltransferases: mechanisms and applications in natural product development. **Chemical Society reviews**, v. 44, n. 22, p. 8350–8374, 2015.

LUISI, F. et al. Efeito anti-inflamatório dos macrolídeos em doenças pulmonares da infância. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 6, p. 786–796, 2012.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.

MARQUES, M. V. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. 348 p.

MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.

MCPHERSON, A.; CUDNEY, B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. **Acta Crystallographica Section F**, v. 70, p. 1445–1467, 2014.

MCPHERSON, A.; GAVIRA, J. A. Introduction to protein crystallization. **Acta Crystallographica Section F**, v. 70, n. 1, p. 2–20, 2014.

MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. **Trends in biotechnology**, v. 19, n. 11, p. 449–456, 2001.

MONCRIEFFE, M. C. et al. Structure of the glycosyltransferase EryCIII in complex with its activating P450 homologue EryCII. **Journal of Molecular Biology**, v. 415, n. 1, p. 92–101, 2012.

MOORE, B. S.; HERTWECK, C. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 1, p. 70–99, 2002.

OMURA, S. **Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice**. 2. ed. USA: Academic Press, 2002. p. 365.

PÉREZ, M. et al. PM100117 and PM100118, new antitumor macrolides produced by a marine *Streptomyces caniferus* GUA-06-05-006A. **The Journal of Antibiotics**, n. 69, p. 388–394, 2015.

PETOUKHOV, M. V et al. ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported Small-Angle Scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**. v. 40, p. 223–228, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344. p.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. MODELAGEM DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

SIPPL, M. J. Recognition of Errors in 3-Dimensional Structures of Proteins. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 17, n. 4, p. 355–362, 1993.

SIVASHANMUGAM, A. et al. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli. **Protein Science**, v. 18, n. 5, p. 936–948, 2009.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 380–416, 2001.

THIBODEAUX, C. J.; MELANÇON, C. E.; LIU, H. Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1008–1016, 2007.

THIBODEAUX, C. J.; MELANÇON, C. E.; LIU, H. Natural-product sugar biosynthesis and enzymatic glycodiversification. **Angewandte Chemie** (International ed. in English), v. 47, n. 51, p. 9814–9859, 2008.

TRUMAN, A. W. et al. Chimeric Glycosyltransferases for the Generation of Hybrid Glycopeptides. **Chemistry and Biology**, v. 16, n. 6, p. 676–685, 2009.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 1022–1025, 1997.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775–781, 2000.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**. Unit5.6, 5.6.1-5.6.32, 2014.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9–11, 2003.

WEICHENBERGER, C. X. et al. The solvent component of macromolecular crystals. **Acta Crystallographica Section D**, v. 71, p. 1023–1038, 2015.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n.2, p. 407–410, 2007.

WILLIAMS, G. J.; THORSON, J. S. Natural Product Glycosyltransferases: Properties and Applications. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 76, p. 55–120, 2009.

WITTIG, I.; BRAUN, H.-P.; SCHÄGGER, H. Blue native PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 418–428, 2006.

WU, H. et al. In vivo investigation to the macrolide-glycosylating enzyme pair DesVII/DesVIII in *Saccharopolyspora erythraea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2257–2266, 2016.

XUE, Y. et al. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 21, p. 12111–12116, 1998.

YUAN, Y. et al. In vitro reconstitution of EryCIII activity for the preparation of unnatural macrolides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 41, p. 14128–14129, 2005.

ZHANG, H. et al. The highly conserved domain of unknown function 1792 has a distinct glycosyltransferase fold. **Nature communications**, v. 5, n. 4339, p. 1-12, 2014.

ZWART, P. H. et al. Surprises and pitfalls arising from (pseudo)symmetry. **Acta Crystallographica Section D**, v. 64, n. 1, p. 99–107, 2007.