

**CAMILO ADOLFO CONTRERAS HERNÁNDEZ**

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES BIOSINTÉTICOS DO ANTITUMORAL  
COSMOMICINA D**

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.

São Paulo  
2013

**CAMILO ADOLFO CONTRERAS HERNÁNDEZ**

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES BIOSINTÉTICOS DO ANTITUMORAL  
COSMOMICINA D**

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: Dr. Gabriel Padilla Maldonado

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo  
2013

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

© reprodução total

Contreras Hernández, Camilo Adolfo.  
Caracterização de genes biossintéticos do antitumoral cosmomicina  
D / Camilo Adolfo Contreras Hernández. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado.

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

Versão do título para o inglês: Characterization of the biosynthetic  
genes of the antitumor cosmomycin D.

1. Antibióticos 2. Streptomyces 3. Genética Bacteriana  
4. Genes 5. Reação em cadeia por polimerase 6. Clonagem I.  
Maldonado, Prof. Dr. Gabriel Padilla II. Universidade de São Paulo.  
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB051/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Camilo Adolfo Contreras Hernández.

Título da Dissertação: Caracterização de genes biossintéticos do antitumoral cosmomicina D.

Orientador(a): Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado.

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

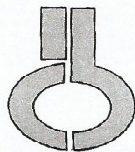
**Aprovado(a)**

**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) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 425/10 referente ao projeto intitulado: "*Caracterização de genes biossintéticos do antitumoral cosmomicina D*" sob a responsabilidade de Camilo Adolfo Contreras Hernández, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de outubro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

A mis papas y mis hermanos  
por darme la fuerza y motivación  
para seguir siempre adelante  
Gracias!

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma muy especial a mi familia que me dio todo el apoyo para aventurarme en tierras brasileñas y poder estudiar en este maravilloso país. Gracias a mi mamá hermosa: Blanca Cecilia, mi papá Jorge Enrique, mis hermanos Ernesto, Karla, Lucy y Marilyn por darme ánimo, llenarme de alegría y energía positiva para continuar y terminar. Al amor de mi vida Angie Carolina, que siempre me acompaña, me cuida, me escucha, me aguanta y lo más lindo de todo me ama mucho. Gracias cielo!!!

Al Profesor Gabriel Padilla por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por sus consejos que me ayudaron a sobrellevar situaciones adversas y a las entidades de fomento Centro Nacional de Desenvolvimento Científico y Tecnológico CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP por el apoyo financiero en mis estudios y el desarrollo del trabajo. A mis compañeros de trabajo Juan Diego, Leandro, Fernanda, Renata, Carlinha, Zita, Alejandra, Bety, Thami, Felipe, Ruth y Roger por su amistad y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Un agradecimiento especial a mi amiga Yasmin Valero, una persona con gran talento que me colaboro con todos los análisis químicos, me brindo su amistad y me apoyo en momentos cruciales del proyecto y en mi estadía en São Paulo. A mis amigas Diana Chica; Marcela y Lina Pérez; los científicos, técnicos y personas del Instituto de Ciencias Biomédicas ICB II, siempre atentos y dispuestos a colaborar con los experimentos: Diana Tusso, Tais, Felipe, Cecilia, Amanda, Bianca, Nicolás, Luis, Jennifer, Aline, Almir, Nadia, Flávio, Thiago, Leandro y a los profesores René, Gregorio, Welington, Massuo, Lydia, Ana Clara, Elizabete, Benny, Marilis y la profesora Irma.

“En los momentos de crisis, sólo la imaginación es más importante que el conocimiento”.

Albert Einstein



## RESUMO

CONTRERAS HERNÁNDEZ C. A. **Caracterização de genes biossintéticos do antitumoral cosmomicina D**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A cosmomicina D é um policetídeo aromático da família das antraciclinas com propriedades antitumorais e antimicrobianas produzida por *Streptomyces olindensis*. A elucidação de genes responsáveis pela síntese desta molécula foi abordada neste trabalho com as técnicas de LDGW-PCR e PCR que permitiram amplificar fragmentos gênicos envolvidos na formação da aglicona. O *cluster* gênico completo foi caracterizado numa região de 43,1 kb produto do seqüenciamento do genoma, onde se agruparam funcionalmente 40 ORF's em varias categorias: síntese de aglicona, reguladores, glicosiltransferases, deoxiaçúcares, resistência e com função desconhecida. Visando obter mutantes nulos para os genes *cosS* e *cosY* foram construídos os plasmídeos pCCSII e pCCYII onde a transformação da cepa selvagem com pCCSII resulto na cepa mutante SoΔS, deficiente em produção de cosmomicina. As análises dos produtos obtidos da expressão de ambos os genes mostrou um efeito na redução de cosmomicina e supressão de intermediários do complexo antitumoral.

Palavras-chave: *Streptomyces*. Antibióticos. Genética Bacteriana. Genes. Reação Em Cadeia Da Polimerase. Clonagem.

## ABSTRACT

CONTRERAS, C. A. **Characterization of biosynthetic genes of the antitumor cosmomycin D**. 2013. 105 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Cosmomycin D produced by *Streptomyces olindensis* is an aromatic polyketide of the anthracycline family with antitumor and antimicrobial properties. The amplification of genes responsible for the molecule synthesis were approached in this study by LDGW-PCR and PCR techniques, the obtained fragments showed high similarities with genes involved in aglycone core assembly. The complete gene cluster was characterized in a genome region of 43.1 kb product of genome sequencing, containing 40 ORFs grouped functionally into different categories: aglycone synthesis, regulators, glycosyltransferases, deoxisugars, resistance and unknown function. In order to obtain null mutants for *cosS* and *cosY* genes, the plasmids pCCSII pCCYII were constructed, the transformation of the wild strain with pCCSII result in  $\Delta$ So mutant, deficient in production of cosmomycin. The analyses of the obtained products from the expression of both genes showed an effect in reducing cosmomycin levels and suppression of various intermediates in the antitumor complex.

Keywords: *Streptomyces*. Microbial Genetics. Genes. Polymerase Chain Reaction. Cloning.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Colônia característica de <i>Streptomyces</i> .....	22
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	23
Figura 3 - Compostos policetídicos produzidos por <i>Streptomyces</i> spp. ....	25
Figura 4 - Estrutura geral da aglicona de uma antraciclina .....	26
Figura 5 - Estrutura de antraciclinas produzidas por <i>Streptomyces</i> .....	27
Figura 6 - Biossíntese do esqueleto policetídico .....	32
Figura 7 - Reações subseqüentes pós-PKS na biossíntese da aglicona .....	33
Figura 8 - Reações de modificação de agliconas não glicosiladas .....	34
Figura 9 - Estrutura química das cosmomicinas produzidas por <i>S. olindensis</i> .....	36
Figura 10 - Genes biossintéticos identificados no cosmídeo p5E11 .....	37
Figura 11 - Desenho Ilustrativo da estratégia de amplificação por <i>Long PCR</i> .....	47
Figura 12 - Representação da técnica LDGW.....	48
Figura 13 - Esquema da geração de um mutante por dupla recombinação.....	51
Figura 14 - Estratégia de nocaute para os genes <i>cosS</i> e <i>cosY</i> .....	52
Figura 15 - Construção dos plasmídeos de pEM4AY e pEM4AS .....	53
Figura 16 - Espectro de absorção do extrato bruto do complexo cosmomicina D ....	55
Figura 17 - Espectro de espectro de absorbância no ultravioleta-visível da cosmomicina D.....	56
Figura 18 - Técnica de LDGW-PCR no cosmídeo p5E11 .....	58
Figura 19 - Seqüência <i>contig</i> obtida da técnica <i>LDGW-PCR</i> no cosmídeo p5E11 ...	59

Figura 20 - Produtos de amplificação obtidos com iniciadores degenerados.....	60
Figura 21 - Produto de amplificação de <i>Long PCR</i> no genoma de <i>S. olindensis</i> .....	61
Figura 22 - Organização do cluster gênico da cosmomicina D .....	65
Figura 23 - Via biossintética da cosmomicina D.....	70
Figura 24 - Biossíntese dos açúcares Parte I.....	72
Figura 25 - Biossíntese de açúcares parte II.....	73
Figura 26 - Digestão enzimática dos plasmídeos pCCH, pCCY-II e pCCS-II.....	77
Figura 27 - Seqüência indicando a orientação do cassete de apramicina no gene <i>cosY</i> do plasmídeo pCCYII .....	78
Figura 28 - Seqüência indicando a orientação do cassete de apramicina no gene <i>cosS</i> do plasmídeo pCCSII .....	78
Figura 29 - Análise cromatográfica do extrato da cepa selvagem e a cepa <i>SoΔS</i> ....	79
Figura 30 - Espectro de absorção dos extratos pEM4AS e pEM4AY.....	81
Figura 31 - Cromatogramas dos transformantes pEM4AS e pEM4AY.....	82
Figura 32. Estrutura das moléculas cosmomicina A, B e C e dos compostos achados nos extratos das cepas pEM4AS e pEM4AY.....	83
Figura 33 – Teste de atividade antimicrobiana contra <i>Bacillus subtilis</i> .....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fórmula química e massa atômica da cosmomicina A, B, C e D.....	37
Tabela 2 - Linhagens empregadas no estudo .....	38
Tabela 3 - Plasmídeos usados neste trabalho .....	38
Tabela 4 - Antibióticos usados no estudo.....	39
Tabela 5 - Iniciadores usados para amplificar genes biossintéticos CosD.....	45
Tabela 6 - Iniciadores usados para construção de plasmídeos recombinantes .....	54
Tabela 7 - Sítios de ligação ao ribossomo das novas ORF.....	63
Tabela 8 – Função deduzida dos genes do <i>cluster</i> cosmomicina D .....	66
Tabela 9 – Genes envolvidos na biossíntese de antraciclinas PKS tipo II .....	68
Tabela 10 - Compostos descritos nos extratos pEM4AS e pEM4AY .....	81
Tabela 11 - Diâmetro dos halos de inibição dos extratos no teste de atividade antimicrobiana .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	proteína transportadora de grupos acilo
ARO	aromatase
AT	aciltransferase
ATP	adenosina 5'-trifosfato
CIAP	fosfatasa alcalina do intestino de bezerro
CLF	Fator alongador da cadeia
CoA	Coenzima A
cosD	cosmomicina D
CYC	ciclase
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DH	desidratase
DMSO	dimetil-sulfóxido
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
FAS	sintase de ácidos graxos
HPLC	Cromatografia Líquida de alto desempenho
IPTG	isopropil tio $\beta$ -D-galactosídeo
Klenow	fragmento maior do DNA polimerase de <i>E. coli</i>
KR	cetoreductase
KS	cetosintase
LC-ESI MS	espectrometria de massas com ionização por electrospray
MOPS	ácido 3N-(morfolino)-propano-sulfónico
PCR	reação em cadeia da polimerase
PKS	policetídeo sintase
RNA	ácido ribonucléico
TBE	tris-ácido-bórico-EDTA
TE	tioesterase
Tris	tris-2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol

RBS

sítio de ligação ao ribossomo

UV

ultravioleta

X-Gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Streptomyces</i> spp.</b> .....	<b>21</b>
2.1.1	Características gerais .....	21
2.1.2	Ciclo de vida .....	22
2.1.3	Características do genoma .....	23
<b>2.2</b>	<b>Metabólitos secundários</b> .....	<b>24</b>
2.2.1	Compostos policetídicos .....	24
2.2.1.1	<i>Antraciclinas</i> .....	25
2.2.1.2	<i>Modo de ação</i> .....	28
<b>2.3</b>	<b>Biossíntese de antraciclinas</b> .....	<b>29</b>
2.3.1	<i>Clusters</i> biossintéticos de <i>Streptomyces</i> spp.....	29
2.3.2	Biossíntese do esqueleto policetídico .....	30
2.3.3	Formação da cadeia $\beta$ -cetoacil pelo minPKS .....	30
2.3.4	Síntese da aglicona por enzimas pós-PKS.....	31
2.3.5	Modificação da aglicona .....	33
2.3.5.1	<i>Substratos não glicosilados</i> .....	33
2.3.5.2	<i>Glicosilação</i> .....	34
<b>2.4</b>	<b>Estratégias para produzir novos compostos policetídicos</b> .....	<b>35</b>
<b>2.5</b>	<b>Cosmomicina D</b> .....	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Linhagens empregadas no estudo</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Plasmídeos</b> .....	<b>38</b>
<b>3.3</b>	<b>Antibióticos</b> .....	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Métodos microbiológicos</b> .....	<b>39</b>
3.4.1	Meios de cultura .....	39
3.4.2	Soluções .....	40
3.4.3	Condições de crescimento.....	41
3.4.4	Preservação de linhagens .....	41
<b>3.5</b>	<b>Manipulação de DNA</b> .....	<b>41</b>
3.5.1	Extração de DNA .....	41



3.5.2	Reação padrão de PCR.....	42
3.5.3	Digestões enzimáticas.....	42
3.5.4	Geração de extremidades cegas e tratamento com fosfatase alcalina.....	42
3.5.5	Ligações .....	42
3.5.6	Purificação do DNA .....	43
3.5.7	Eletroforese em gel de agarose.....	43
3.5.8	Seqüenciamento e análise das seqüências.....	43
3.5.9	Transformação com DNA plasmidial.....	43
3.5.9.1	<i>Preparação de células competentes com cloreto de cálcio.....</i>	43
3.5.9.2	<i>Preparação de células eletrocompetentes .....</i>	44
3.5.10	Preparação e transformação de protoplastos de <i>Streptomyces</i> .....	44
<b>3.6</b>	<b>Elucidação de novos genes biossintéticos do cluster CosD.....</b>	<b>45</b>
3.6.1	Amplificação de novos genes biossintéticos por PCR .....	45
3.6.1.1	<i>Iniciadores .....</i>	45
3.6.1.2	<i>Programa de amplificação usado em PCR.....</i>	46
3.6.2	<i>Long distance PCR</i> no genoma de <i>S. olindensis</i> .....	46
3.6.3	Amplificação de genes por <i>LDGW-PCR</i> no cosmídeo p5E11 .....	46
3.6.3.1	<i>Extensão.....</i>	47
3.6.3.2	<i>Cauda (Tailing).....</i>	47
3.6.3.3	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....</i>	48
3.6.3.4	<i>Nested PCR e seqüenciamento .....</i>	48
3.6.4	Seqüenciamento do genoma de <i>S. olindensis</i> .....	49
3.6.4.1	<i>Assembly.....</i>	49
3.6.4.2	<i>Anotações dos genes .....</i>	49
3.6.5	Identificação do cluster cosmomicina D.....	50
<b>3.7</b>	<b>Preparação de plasmídeos recombinantes .....</b>	<b>50</b>
3.7.1	Nocaute dos genes <i>cosS</i> e <i>cosY</i> .....	50
3.7.1.1	<i>Construção do plasmídeo pCCH.....</i>	50
3.7.1.2	<i>Construção dos plasmídeos pCCSII e pCCYII .....</i>	51
3.7.1.3	<i>Construção dos plasmídeos pEM4AS e pEM4AY.....</i>	51
3.7.2	Iniciadores usados na construção de plasmídeos recombinantes.....	53
3.7.3	Extração de antraciclinas em pequena escala do meio de cultivo.....	54
3.7.4	Análises cromatográficas.....	54

3.7.4.1	<i>Espectro de absorção do complexo cosmomicina D</i> .....	55
3.7.4.2	<i>Espectro de absorção da fração 2 do complexo cosmomicina D</i> .....	55
3.7.5	Teste de atividade antimicrobiana frente a <i>Bacillus subtilis</i> .....	56
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Amplificação de novos genes biossintéticos</b> .....	<b>57</b>
4.1.1	LDGW-PCR <i>Genome walking</i> no cosmídeo p5E11.....	57
4.1.2	Amplificação de genes biossintéticos por PCR.....	59
4.1.3	<i>Long distance</i> PCR no genoma de <i>S. olindensis</i> .....	61
4.1.4	Descrição do <i>cluster</i> biossintético cosmomicina D e análise da seqüência....	62
4.1.4.1	<i>Genes envolvidos na formação do ácido aplanônico</i> .....	65
4.1.4.2	<i>Genes envolvidos em reações pós-PKS para a formação da aglicona</i> .....	68
4.1.4.3	<i>Genes envolvidos na modificação da aglicona</i> .....	70
4.1.4.4	<i>Genes envolvidos na biossíntese de desoxiaçúcares</i> .....	71
4.1.4.5	<i>Glicosiltransferases</i> .....	73
4.1.4.6	<i>Genes reguladores</i> .....	74
4.1.4.7	<i>Genes de Resistência</i> .....	74
4.1.4.8	<i>ORFs com funções desconhecidas</i> .....	75
<b>4.2</b>	<b>Nocaut dos genes <i>cosS</i> e <i>cosY</i></b> .....	<b>76</b>
<b>4.3</b>	<b>Análises cromatográficas dos extratos pEM4AY e pEM4AS</b> .....	<b>80</b>
<b>4.4</b>	<b>Teste de atividade antimicrobiana frente a <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>87</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>105</b>
	<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários produzidos por microorganismos são compostos químicos de baixo peso molecular (<3000 Da) que geralmente exibem atividade biológica; na natureza desempenham o papel de antibióticos, toxinas, ionóforos, bioreguladores e sinalizadores intra e interespecíficos, conferindo vantagens competitivas (DEMAIN; ADRIO, 2008). As propriedades bioativas destas substâncias, assim como suas estruturas químicas têm sido exploradas no percurso da história da humanidade para a descoberta e desenvolvimento de drogas usadas no tratamento de doenças (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

De acordo com Berdy (2005) em torno de 20.000 e 22.000 dos metabolitos foram descritos na literatura científica e de patentes para os anos 2000 e 2002, cerca de 38% destas moléculas foram descritas em fungos filamentosos, enquanto, 45% em actinomicetes (7600 metabolitos de *Streptomyces*) e o restante 17% foi caracterizado em bactérias como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mixobacteria* e *Cianobacteria*. Segundo a FDA entre 2009 e 2010 a contribuição dos produtos naturais e seus derivados aumentou de 20.8% para mais do que 50%, sendo aprovadas só no ano 2010 vinte entidades novas incluindo agentes antitumorais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Compostos que se tem destacado são os do tipo policetídeo, produzidos por bactérias, fungos e plantas que exibem uma grande diversidade estrutural, funcional e apresentam propriedades farmacocinéticas que os tornam úteis na prática clínica como se verifica com os antibióticos (e.g., eritromicina), anticancerígenos (e.g., daunorubicina, doxorubicina, mitomicina, bleomicina), antifúngicos (e.g., anfotericina B, griseofulvina), imunossupressores (e.g., rapamicina), controle do colesterol (e.g. estatinas como a lovastatina e mevastatina) (STAUNTON; WEISSMAN, 2001) entre outras; permitindo o tratamento contra doenças agudas e degenerativas (ZHANG; DEMAIN, 2005).

A atividade antitumoral dos compostos policetídeos tem sido explorada nos últimos 20 anos, sendo de grande interesse um grupo de moléculas produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces* conhecidas como antraciclinas. A primeira antraciclina foi isolada no começo dos anos 1960s da bactéria *Streptomyces peucetius*, produtora de daunorubicina; posteriormente uma mutação aleatória deste microorganismo com *N*-nitroso-*N*-metil uretano originou a doxorubicina, que mostrou

ter uma excelente atividade antitumoral sendo aprovada para uso clínico como anticancerígeno desde 1974, com vigência atual no tratamento tanto de tumores sólidos quanto de leucemias (FEDERICO MARIA, 2005).

Apesar da sua utilidade, tanto a daunorrubicina quanto a doxorrubicina tem sérios efeitos secundários agudos e de longo prazo, associados principalmente à cardiotoxicidade cumulativa (MENNA et al., 2012) e ao aparecimento de células tumorais resistentes às drogas (SHEN et al., 2008). Não é surpreendente que, mesmo após a descoberta da doxorubicina, a busca por antraciclinas com melhores propriedades bioativas e com alvos mais específicos, continue formando parte dos programas de busca e triagem, que tem levado a descoberta e isolamento de novos compostos, onde os estreptomicetes continuam sendo a maior fonte de análogos.

Com o ressurgimento de doenças graves (e.g., tuberculose), a resistência microbiana aos antibióticos, o grande índice de mortalidade causada por infecções bacterianas e virais, os sérios problemas com a quimioterapia assim como o número crescente de casos novos de câncer no mundo (estimado em 21 milhões para 2030) (<http://globocan.iarc.fr>), torna-se uma necessidade prioritária nos próximos anos a procura e desenvolvimento de novos compostos bioativos com aplicação clínica (BERDY, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2012).

O advento da tecnologia do DNA recombinante e expansão de ferramentas moleculares para a manipulação genética de microorganismos permitiu o desenvolvimento de estratégias para obter de uma forma segura e eficiente produtos biológicos complexos como vacinas, proteínas recombinantes, novas antraciclinas e produtos farmacêuticos em base na informação genética codificada pelos ácidos nucleicos. Em *Streptomyces*, grandes avanços foram feitos no estudo funcional dos genes envolvidos na biossíntese de antraciclinas, agrupados em *clusters* dentro do genoma, resultando na geração de uma biblioteca de mais de cem genes biossintéticos que levaram a progressos na manipulação de vias metabólicas, produção de diversos compostos bioativos e na compreensão de como a diversidade das antraciclinas é gerada a partir de intermediários do metabolismo celular (METSÄ KETELÄ et al., 2008).

As estratégias empregadas no estudo de antraciclinas visando criar moléculas com alvos mais específicos abrangem diversas técnicas como o nocaute de gênico, superexpressão de genes, recombinação heteróloga, clonagem de *clusters*

biossintéticos, biossíntese combinatória, engenharia metabólica (LEE et al., 2009), alguns estudos se expandem progressivamente da genética molecular para a enzimologia mecanística, cujo foco de pesquisa está associado à química e catálise de enzimas biossintéticas (BUGG, 2001; MENDEZ; SALAS, 2003; MENZELLA; REEVES, 2007). Recentemente com o número crescente de genomas sequenciados, se observa que estes podem ser reestruturados em grande escala sem prejudicar o microorganismo; além disso, *clusters* crípticos e vias biossintéticas que codificam para metabólitos secundários podem ser ativados e redesenhados, pontos que pretendem ser abordados no campo emergente da biologia sintética (CHENG; LU, 2012)

O laboratório de bioprodutos sob a direção do professor Gabriel Padilla estuda a cosmomicina D (CosD), um composto policetídeo do tipo aromático da família das antraciclinas produzido por *Streptomyces olindensis*, uma bactéria grampositiva isolada por pesquisadores brasileiros no final da década dos 60; que mostrou propriedades antimicrobianas e antitumorais. Entre os trabalhos mais representativos sobre esta molécula encontram-se a interação antraciclina-DNA (CARVALHO et al., 2010; FURLAN et al., 2004), caracterização de mutantes (FURLAN, 2004) e estudos genéticos (GARRIDO et al., 2006; GARRIDO, 2005; SAENZ, 2007).

Os genes responsáveis pela biossíntese desta antraciclina foram parcialmente seqüenciados em uma região de 14kb (GARRIDO, 2005); no entanto, o número de genes descritos na síntese de moléculas relacionadas chega a envolver entre 34 e 40 genes abrangendo espaços cromossômicos de até 40 kb (METSÄ KETELÄ et al., 2008). O conhecimento do conjunto de genes responsáveis na formação da molécula permitiria a obtenção de novas estruturas com propriedades bioativas usando técnicas de engenharia genética. Levando isto em consideração o seguinte trabalho tem como objetivo identificar novos genes biossintéticos do *cluster* cosmomicina D, determinar a função dos genes *cosS* e *cosY* através da técnica de mutagênese por troca alélica e avaliar o efeito de cópias adicionais de ambos os genes na produção de *cosD* em *Streptomyces olindensis*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Streptomyces* spp.

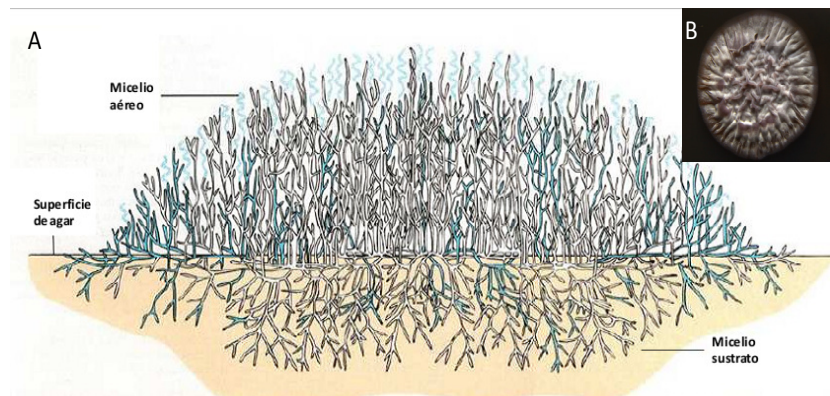
#### 2.1.1 Características gerais

Os microorganismos do gênero *Streptomyces* spp. são bactérias pertencentes à ordem dos Actinomicetales que compreende 119 gêneros (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001). Desde a descoberta dos primeiros actinomicetes entre os anos 1870 até finais dos 1950s, acreditava-se que tais microorganismos eram intermediários entre as bactérias e os fungos, no entanto, formam parte do grupo de bactérias gram-positivas que se distinguem por apresentar um alto conteúdo de G+C em seu DNA muitas vezes mais do que 70% em comparação com outros microorganismos gram-positivos como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus* que apresentam G+C de 50% (HOPWOOD, 2006).

Caracteristicamente estas bactérias com morfologia bacilar são aeróbias estritas, catalase positiva, formam colônias filamentosas (Figura 1) e seu metabolismo é quimiorganotrófico; algumas cepas são patogênicas para o homem animais e plantas (ANDERSON; WELLINGTON, 2001). O cheiro peculiar destes microorganismos, similar à terra molhada se deve a sua atividade metabólica e produção de pigmentos terpenóides (geosminas), assim como de enzimas extracelulares que são capazes de degradar a matéria orgânica de origem vegetal e animal (KOMATSU et al., 2008).

Os estreptomicetes encontram-se distribuídos em diferentes habitats, predominantemente no solo, onde atingem até o 90% dos microorganismos isolados, sua capacidade por colonizar a rizosfera é devida em parte às características antagonistas destes microorganismos para competir com outras bactérias como *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. (SEMÊDO et al., 2001); também foram descritos em ambientes aquáticos (SUBRAMANI; AALBERSBERG, 2012) colonizadores de plantas (KINKEL et al., 2012) e como agentes causais de doenças limitantes em plantações agrícolas.

Figura 1 - Colônia característica de *Streptomyces*



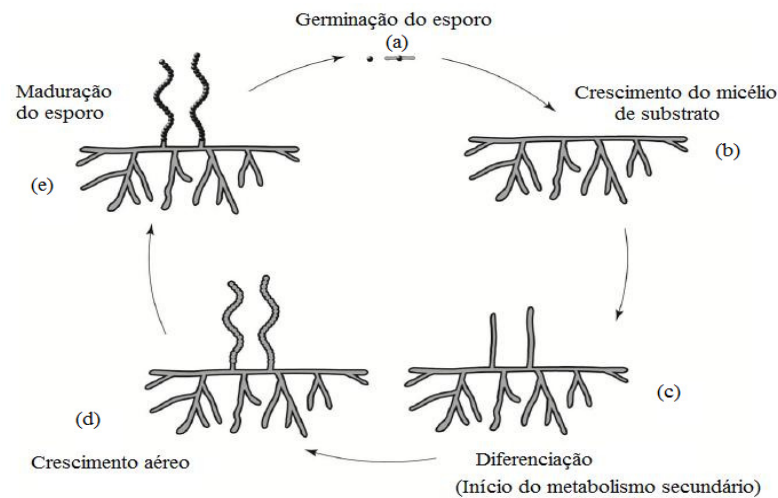
(A) Corte transversal de uma colônia de *Streptomyces*. (B) Colônia de *S. olindensis* em meio R5M. Fonte: Prescott et al.(2004).

### 2.1.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida dos estreptomicetes assemelha-se em vários aspectos ao ciclo de vida dos fungos filamentosos: ambos crescem formando hifas ramificadas que constituem o micélio vegetativo e dispersam os esporos formados em estruturas reprodutivas especializadas, conhecidas como hifas aéreas que emergem da superfície das colônias. Quando um esporo monogenômico de *Streptomyces* encontra as condições e nutrientes apropriados, o processo de germinação se inicia com o alongamento de tubos germinativos, que crescem apicalmente (Figura 2A) para formar hifas vegetativas ou micélio de substrato (Figura 2B).

Em resposta à depleção de nutrientes e outros sinais do meio, ocorrem processos de diferenciação morfológica que levam à formação das hifas aéreas (Figura 2C), que rompem a tensão superficial escapando do ambiente aquoso do micélio vegetativo e crescendo na presença de ar (Figura 2D); conjuntamente podem ser ativas vias metabólicas associadas com a produção de antibióticos (BIBB, 2005). As hifas aéreas sofrem divisão celular controlada, culminando em longas cadeias de compartimentos de pré-esporos (Figura 2E), que posteriormente desenvolvem a parede espessa dos esporos, sintetizam o pigmento cinza e conferem outras das características típicas dos esporos maduros (FLÄRDH; BUTTNER, 2009; KIESER et al., 2000).

Figura 2 - Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*



(A) Germinação do esporo, (B) crescimento do micélio de substrato, (C) diferenciação do micélio de substrato, (D) crescimento do micélio aéreo e formação de esporos, (E) maturação de esporos.

### 2.1.3 Características do genoma

O genoma de *Streptomyces* encontra-se arranjado em um cromossomo linear abrangendo regiões de ao redor de  $\approx 8\text{Mb}$  (BENTLEY et al., 2002; LIN et al., 1993; OMURA et al., 2001), seu tamanho chega a ser extraordinariamente grande quando comparado com outros genomas bacterianos descritos, como *Escherichia coli* (4,6 Mb) e *Bacillus subtilis* (4,2 Mb). O cromossomo apresenta um alto conteúdo de guaninas e citosinas ( $\sim 70\%$ ) com repetições invertidas (TIRs) e proteínas ligadas covalentemente nos extremos 5' terminal (HOPWOOD, 2006).

A replicação do cromossomo acontece de forma bidirecional desde a origem de replicação tipicamente central (*oriC*) onde a fita de síntese contínua é replicada à direita do extremo terminal cromossômico; a fita descontínua, enfrenta um problema associado com a remoção do iniciador de RNA do último fragmento de Okasaki, que deixa um espaço no extremo 3' na forma de fita simples de DNA. Esse extremo terminal é replicado mediante a ação das proteínas terminais (TP) que atuam como iniciadores para completar a síntese da fita complementar (HOPWOOD, 2006).

A região do núcleo central de aproximadamente 6,5 Mb contém em sua maioria genes essenciais do metabolismo primário envolvidos em funções como divisão celular, replicação do DNA, transição e tradução. Entre diferentes espécies de *Streptomyces* esta região parece ser altamente conservada quanto à relação do



conteúdo genético assim como na ordem gênica. Por outro lado, a região telomérica dos braços do cromossomo mostra uma variabilidade substancial e polimórfica de uma espécie para outra, como produto de eventos adaptativos a condições de estresse físico. Nesta região são observados genes associados com o metabolismo secundário, incluindo a maioria de clusters envolvidos na produção de antibióticos policetídeos (KALLIO, 2008).

A alta frequência de alterações genéticas nos braços do cromossomo de *Streptomyces* foi caracterizada como "instabilidade". Esta variabilidade se relaciona a elementos gênicos que geram grandes rearranjos no DNA assim como deleções e duplicações; estas regiões contêm longas sequências de repetições invertidas (TIRs) que variam de centenas a milhares de kilobases e participam em eventos que resultam em recombinação homóloga intra-cromossomalmente, substituições, e rearranjos (DYSON, 2011; FISCHER et al., 1998; GOSHI et al., 2002).

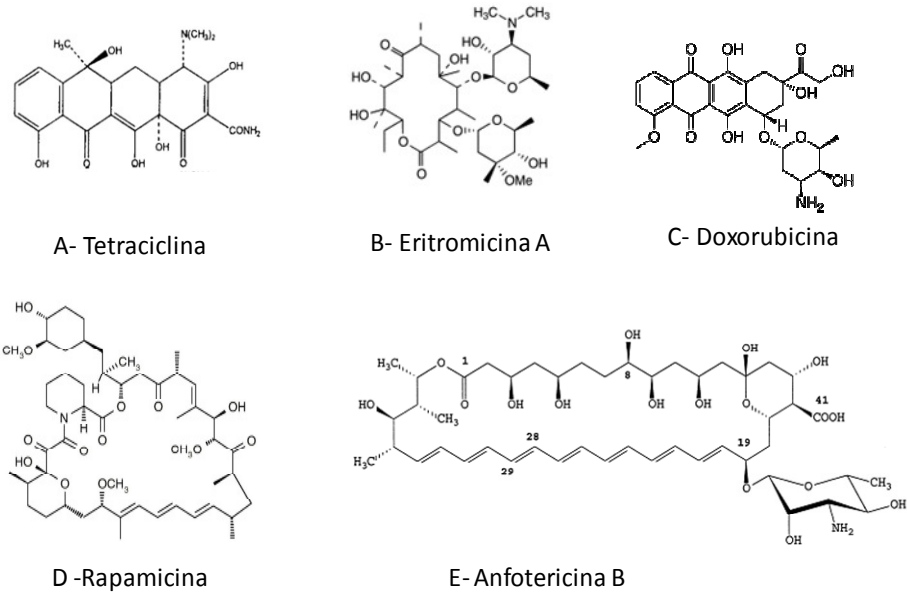
## 2.2 Metabólitos secundários

### 2.2.1 Compostos policetídeos

Os compostos policetídeos são metabólitos secundários produzidos principalmente por bactérias, fungos e plantas e representam um amplo grupo de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013). Devido à grande diversidade estrutural que existe (Figura 3), a maioria destas moléculas é classificada em três classes principais: os do tipo peptídico, as lactonas macrocíclicas e derivados de quinonas (LEEPER et al., 2000).

Em base na sua origem biossintética, os policetídeos são subdivididos nas categorias do tipo I, II e III sendo todos sintetizados por um complexo enzimático conhecido como policetídeo sintase (PKSs) (BALTZ, 2006); onde se encontram compostos de importância médica como, por exemplo: antifúngicos (e.g., anfotericina B, griseofulvina), antivirais (e.g., macrolídeo FK506), antitumorais (e.g., daunorubicina, doxorubicina, mitomicina, bleomicina), anti-hipertensivos, imunossupressores (e.g., rapamicina), hipercolesterolêmicos (e.g., lovastatina) e em particular os antibióticos (e.g., eritromicina, tetraciclina) (PROCÓPIO et al., 2012; WEISSMAN; DAVID, 2009).

Figura 3 - Compostos policetídicos produzidos por *Streptomyces* spp.



(A) Tetraciclina produzida por *S. aureofaciens*; (B) eritromicina produzida por *S. erythreus*; (C) doxorubicina produzida por *S. peucetius*; (D) rapamicina produzida por *S. hygroscopicus* FC904; (E) anfotericina B produzida por *S. nodosus*.

As PKSs tipo I são formadas de várias proteínas multifuncionais, as quais apresentam diferentes domínios catalíticos que são utilizados em uma ordem precisa para a elongação da cadeia policetídica (APARICIO et al., 1996; CORTES et al., 1990). As PKSs tipo II correspondem a um complexo multienzimático formado por várias proteínas que vão agir de forma reiterada para originar a cadeia policetídica (WEISSMAN; DAVID, 2009).

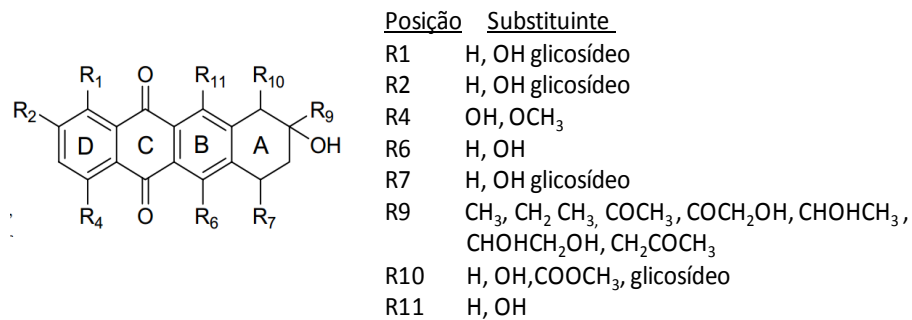
Os compostos policetídeos do tipo II são classificados em sete grupos estruturalmente distintos; as antraciclina, anguciclina, ácidos aureólicos, compostos tipo tetraciclina, pradimicina, tetracenomicina, pradimicina e benzo-isocromeno-quinona. Finalmente as PKSs tipo III são um grupo de proteínas homodiméricas um pouco diferentes das proteínas do tipo I e tipo II, dentro das que se engloba a superfamília das chalcona sintase (CHSs) (MOORE; HOPKE, 2001).

### 2.2.1.1 Antraciclina

Um dos produtos naturais mais estudados no último quarto de século são as

antraciclina produzidas por microorganismos do gênero *Streptomyces* spp, devido a suas propriedades anticancerígenas. As antraciclina formam parte de um grupo de glicosídeos derivados de quinonas 7,8,9,10-tetrahidro-5,12-naftaceno (BROCKMANN, 1963), que pertencem à família dos antibióticos policetídeos aromáticos do tipo II (NIEMI et al., 2002). A diversidade estrutural destes compostos (Figura 4) reside na variedade de modificações que pode sofrer sua estrutura central a “aglicona” com diferentes grupos funcionais (Figura 5), através da ação de enzimas envolvidas em reações de hidroxilação, redução, metilação e por reações de glicosilação com carboidratos (SULTANA, 2006).

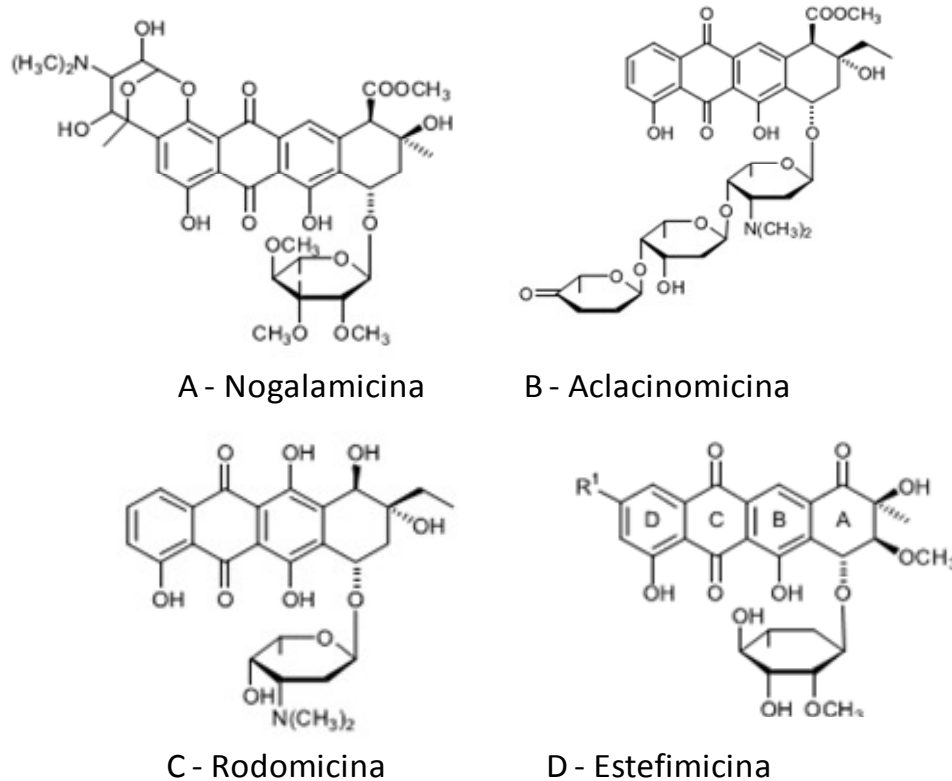
Figura 4 - Estrutura geral da aglicona de uma antraciclina



Fonte: Sultana (2006).

A primeira antraciclina, a rodomicina foi isolada de *S. purpurascens* em solo da floresta nas aforas de Göttingen (BROCKMANN; BAUER; BORCHERS, 1951). A partir desse momento a busca por compostos anticancerígenos começou como uma iniciativa dos laboratórios de pesquisa Farmitalia (agora Pfizer) em Milano, Itália em meados dos anos 1950s; os anos seguintes foram conhecidos como os “anos dourados” na procura de antibióticos (ARCAMONE et al., 1969). Visto que as propriedades antimicrobianas das antraciclina já eram conhecidas, a química desses metabolitos só foi pesquisada em meados de 1960. Em 1958, foi descrita a daunorubicina (GREIN et al., 1963) e a rubidomicina (DUBOST et al., 1963); estas moléculas mostraram atividade contra bactérias, fungos e propriedades citotóxicas contra alguns tipos de tumores. No ano 1967, foi isolada a doxorubicina da cepa *S. peucetius* subsp. *caesius*, produto de uma mutação com *N*-nitroso-*N*-metil uretano, posteriormente aprovada pela FDA para uso comercial como agente anticancerígeno em 1974 (LOMOVSKAYA et al., 1999).

Figura 5 - Estrutura de antraciclina produzidas por *Streptomyces*



(A) Nogalamicina, (B) aclacinomicina A, (C)  $\beta$ -rodomicina, (D) estefimicina.  
 Fonte: Metsä-Ketelä (2008).

A doxorubicina é o agente anticancerígeno desenvolvido com mais êxito, contrariamente às drogas antitumorais como a daunorubicina e aclacinomicina, usadas contra leucemias agudas (FUJII; EBIZUKA, 1997; OKI et al., 1975; WARRELL, 1986; WIERNIK; DUTCHER, 1992), a doxorubicina mostrou atividade contra uma ampla variedade de tumores (HORTOBAGYI, 1997; MINOTTI et al., 2004) além de ser menos tóxica (ARCAMONE, 1981; BONADONNA; MONFARDINI, 1969). Outros compostos antracíclicos como a nogalamicina e derivados, isolados de *S. nogalater* apresentam uma elevada toxicidade (BHUYAN; BLOWERS; SHUGARS, 1980), e outras como a idarubicina, epirubicina, zorubicina e aclacinomicina A e B são usadas na prática clínica (STROHL, 1997). Com a expiração da patente da doxorubicina em 1988, o mercado deste produto já atingia cifras de US\$ 250 milhões/ano. Estima-se que o tamanho do mercado de drogas utilizadas no tratamento do câncer possa gerar vendas anuais de US\$ 17 a 20 bilhões e que a capitalização do mercado de antibióticos seja maior do que 30 bilhões de dólares nos EUA ao ano (YM Biosciences Inc).

### 2.2.1.2 *Modo de ação*

As propriedades antineoplásicas das antraciclinas foram atribuídas à inibição da biossíntese de DNA nas células alvo (BOOSER; HORTOBAGYI, 1994; TORRES-MONTANER; HUGHES, 2004), mas o mecanismo citostático ainda não foi esclarecido. A atividade da maioria das antraciclinas é causada por sua forte intercalação não covalente com o DNA; a daunorubicina, nogalamicina, aclacinomicina A e B intercalam partes específicas da aglicona ao DNA por interações de Van de Waals e ligações de hidrogênio (BRANA et al., 2001; LOWN, 1993). Conseqüentemente, a inibição da topoisomerase II desempenha também um papel importante no controle do crescimento de células cancerígenas; a doxorubicina, daunorubicina e epirubicina formam um complexo terciário antraciclina-DNA-topoisomerase, evitando que a enzima religue os extremos de DNA quebrado (CAPRANICO et al., 1990; JENSEN et al., 1993).

Entretanto, as antraciclinas do tipo aclacinomicina interferem na ligação do DNA e a topoisomerase II, de modo a não permitir à enzima clivar o DNA (LARSEN; ESCARGUEIL; SKLADANOWSKI, 2003; SORENSEN et al., 1992). A capacidade destes compostos para gerar radicais livres causa danos diretos na membrana celular através de um processo conhecido como peroxidação (CHICHUK; STRASHKEVICH; KLEBANOV, 1999). Além disso, são inativados receptores e enzimas de ligação de membrana (HORENSTEIN; VANDER HEIDE; L'ECUYER, 2000). Um novo alvo de sua atividade biológica está relacionado à inibição da atividade da DNA helicase (BACHUR et al., 1993; BACHUR et al., 1998).

Como é bem sabido, os efeitos colaterais causados pelas antraciclinas são o maior problema. Além de náuseas, queda de cabelo, mielosupressão, distúrbios gastrointestinais e hepatotoxicidade, o efeito colateral considerado mais grave é a cardiotoxicidade (MENNA et al., 2012; MORDENTE et al., 2001; WOJTACKI, 1998). Um dos grandes desafios para o futuro consiste em desenvolver variantes ativas de antraciclinas que não apresentem esses efeitos colaterais, enfrentando um novo desafio na administração de antitumorais: a resistência do tumor às drogas, que inclui a indução do fenótipo de resistência múltipla a drogas (SHEN et al., 2008).

O principal caso de resistência múltipla à drogas está associado à glicoproteína P ou P170. Esta proteína de membrana pertence à grande família

dos transportadores ABC (ATP-binding cassette) que atuam expulsando os medicamentos para o exterior da célula com a energia que procede da hidrólise de ATP; através deste processo uma vasta gama de drogas podem ser eliminadas da célula tumoral (Strohl, 1997). Um segundo tipo de transportador ABC foi relatado em 1992 como mecanismo de resistência à doxorubicina em tumores de células de pulmão, essa proteína foi denominada como MRP (proteínas de resistência a múltiplas drogas) (BORST et al., 1999); outros registros de resistência reportam a proteína LRP (proteínas de resistência no pulmão) (SCHROEIJERS et al., 2001), a proteína ARA (LONGHURST et al., 1996) e a proteína BCRP (DOYLE et al., 1998). Além disso, outro mecanismo de resistência descrito está associado à capacidade das células cancerígenas sobreviver devido a um forte sistema de proteção à morte celular causado pelo estresse oxidativo que envolve níveis significativos de glutatona (GSH) (FURUSAWA et al., 2001).

## 2.3 Biossíntese de antraciclinas

### 2.3.1 *Clusters* biossintéticos de *Streptomyces* spp.

Diferentemente dos genes envolvidos no metabolismo primário (dispersos no genoma), aqueles que participam nas vias de metabólitos secundários se encontram arrançados de forma contínua em agrupamentos entre 10-200 kb em *locus* referidos como *clusters* (AHLERT et al., 2002). Os *clusters* são tipicamente compostos de doze ou mais genes, contendo aqueles associados à montagem das cadeias de carbono, modificações e regulação das moléculas (KALLIO, 2008).

O primeiro *cluster* biossintético clonado, para produzir um composto policetídeo, foi da actinorodina (HOPWOOD et al., 1985); nos últimos 20 anos, foram descritos agrupamentos gênicos de antraciclinas como a daunorubicina (dau) em uma região de 40 kb no genoma de *S. peucetius* (VASANTHAKUMAR; KATTUSAMY; PRASAD, 2013); a rodomicina (rdm) de *S. purpurascens* (13kb) (NIEMI; MÄNTSÄLÄ, 1995); aclacinomicina (akn) caracterizada em *S. galilaeus* ATCC 31133 (13,5 kb) (FUJII; EBIZUKA, 1997; OKI et al., 1975; RÄTY et al., 2000c); a nogalamicina (sno) em *S. nogalater* ATCC2745 (20kb) (TORKKELL et al., 2001; TORKKELL et al., 1997; YLIHONKO et al., 1996), a estefimicina de *S.*

*steffisburgensis* (25 kb) (GULLÓN et al., 2006); outros *clusters* foram completa ou parcialmente seqüenciados (PALMU et al., 2007).

Com o primeiro projeto genômico concluído de um actinomicete, *Streptomyces coelicolor* A3(2) em 2002, foram identificadas cerca de 8000 seqüências codificantes de proteínas e em torno de 20 *clusters* (4,5% do genoma total) de vias biossintéticas associadas com produtos naturais (BENTLEY et al., 2002). No genoma de *S. avermitilis* são reportados 25 *clusters* biossintéticos (IKEDA et al., 2003); em *S. bingchengensis*, 23 *clusters* gênicos associados a policetídeos, peptídeos não ribossomais e biossíntese de terpenos (WANG et al., 2010); em *S. griseus*, 34 *clusters* de metabólitos secundários, alguns conhecidos e outros desconhecidos (OHNISHI, 2008). Notavelmente, muitos dos *clusters* identificados formam parte dos chamados clusters críticos que regulam vias biossintéticas ainda desconhecidas (CHALLIS, 2008).

### 2.3.2 Biossíntese do esqueleto policetídeo

Apesar da sua diversidade estrutural aparente, os policetídeos compartilham um mecanismo de biossíntese comum (LEEPER et al., 2000). Os compostos aromáticos policetídeos do tipo II como as antraciclinas, são sintetizados por meio de reações seqüenciais catalisadas por enzimas análogas às envolvidas na biossíntese dos ácidos graxos. Inicialmente, uma cadeia linear policetídea de 16-26 carbonos (RIDLEY; LEE; KHOSLA, 2008) é montada a partir de uma unidade iniciadora (acetato ou propionato, entre outras) e duas unidades extensoras de acetato em reações repetitivas de Claisen, catalisadas pelo complexo enzimático policetídeo sintase mínimo (minPKSs) (KALLIO, 2008). Este complexo é formado de duas unidades cetosintase  $KS_{\alpha}$  e  $KS_{\beta}$  ou o fator de alongação da cadeia (CLF) formando os heterodímeros ( $KS_{\alpha}$ /CLF ou  $KS_{\alpha}$ / $KS_{\beta}$ ), a proteína carregadora de acila (ACP) e a malonilCoA:ACP maloniltransferase (MAT) (DREIER; KHOSLA, 2000).

### 2.3.3 Formação da cadeia $\beta$ -cetoacil pelo minPKS

Na primeira etapa de síntese da cadeia  $\beta$ -cetoacil, a enzima (MAT) liga uma unidade de malonato à (ACP) envolvendo um braço fosfopanteteinil. Uma vez que o

complexo malonil-ACP encontra o heterodímero  $KS_{\alpha}$ -CLF não ocupado, iniciam-se as reações de condensação de Claisen, que acontecem nos domínios  $KS_{\alpha}$  dando início à formação da cadeia policetílica (Figura 6AI). Devido à subunidade  $KS_{\beta}$ , carecer do sítio cisteína ativo, esta subunidade está envolvida em reações de descarboxilação do grupo malonil (Figura 6AII), que leva à transferência do grupo acetil resultante ao sítio ativo da cetosintase  $KS_{\alpha}$ , preparando assim o heterodímero  $KS_{\alpha}$ -CLF com uma unidade de acetato (Figura 6AIII). Seguidamente, acontece uma reação de dissociação da ACP e associação de um segundo equivalente do malonil-ACP (Figura 6AIV). A elongação da cadeia, continua por um determinado número de ciclos de extensão com unidades malonil, até que a síntese da cadeia poli- $\beta$ -cetoacil atinge o comprimento necessário (Figura 6B). A etapa de terminação da síntese da cadeia cetoacil (Figura 6C) é promovida pela liberação do heterodímero  $KS$ -CLF ligado da cadeia ACP-acil (DREIER; KHOSLA, 2000).

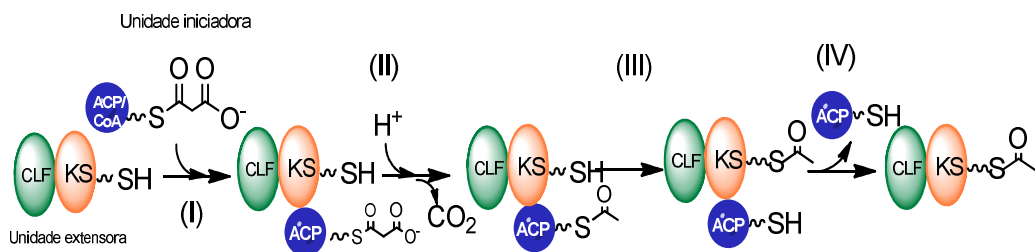
#### 2.3.4 Síntese da aglicona por enzimas pós-PKS

A cadeia carbonada policetílica nascente é altamente reativa, sendo processada por subunidades PKS adicionais para formar compostos poliaromáticos. Dentro de estas subunidades encontram-se as cetoredutases (KR), ciclases (CYC), aromatasas (ARO), que interagem conjuntamente com o minPKS direcionando o padrão de dobramento para produzir o primeiro anel aromático. A cetoredutase reduz o grupo ceto do C9 da cadeia  $\beta$ -cetoacil que vai se converter no C2 da aglicona (Figura 7B). A enzima aromatase, com dupla função: desidratase e ciclase fecha o primeiro anel aromático (Figura 7C), posteriormente em conjunto com uma enzima ciclase fecham os dois anéis seguintes (Figura 7D). A enzima oxigenase, oxida o carbono da posição 12 produzindo ácido aplanônico (Figura 7E) o primeiro intermediário isolável, como produto final da via PKS (KANTOLA et al., 2000). As reações de pós-PKS, começam com a ação de uma metiltransferase (MET) convertendo o ácido tricíclico em seu correspondente éster (Figura 7F); esta reação é requerida para a condensação do aldol no fechamento do quarto anel por uma enzima ciclase (Figura 7G); a biossíntese da aglicona é completada pela ação de uma cetoredutase que produz aclavinona e nogalamycinona (JANSSON, 2004; SULTANA, 2006).

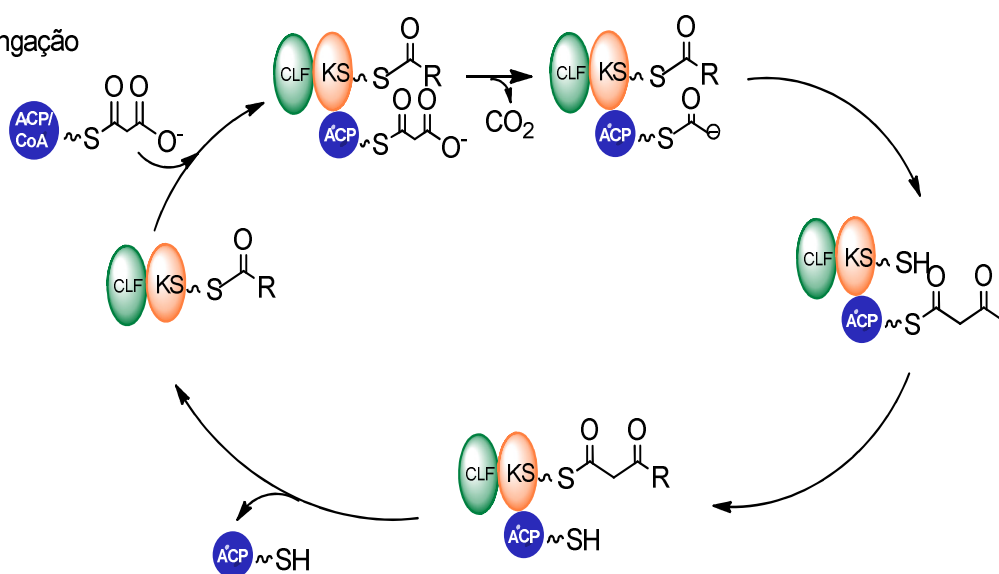


Figura 6 - Biossíntese do esqueleto policetídeo

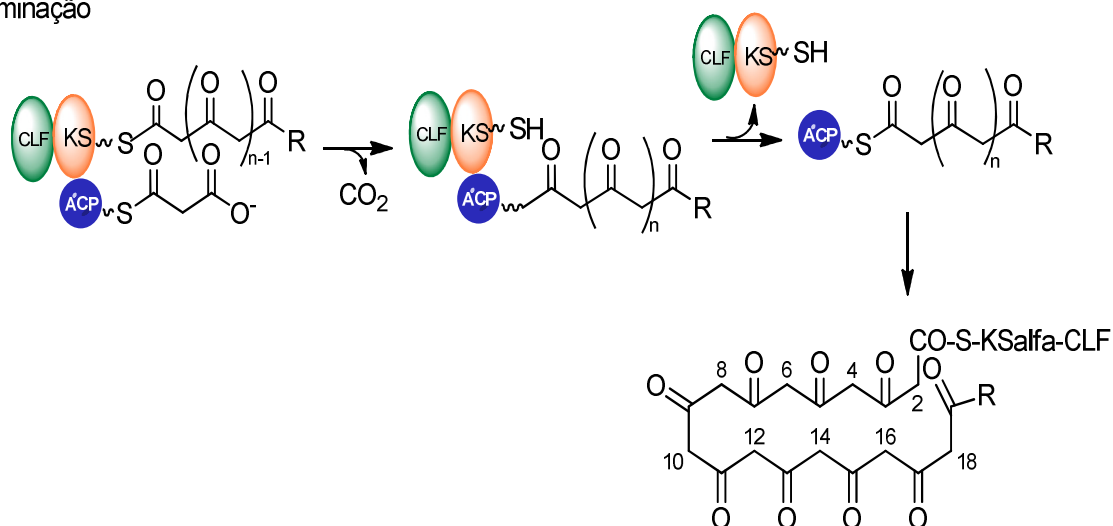
## A. Iniciação



## B. Elongação



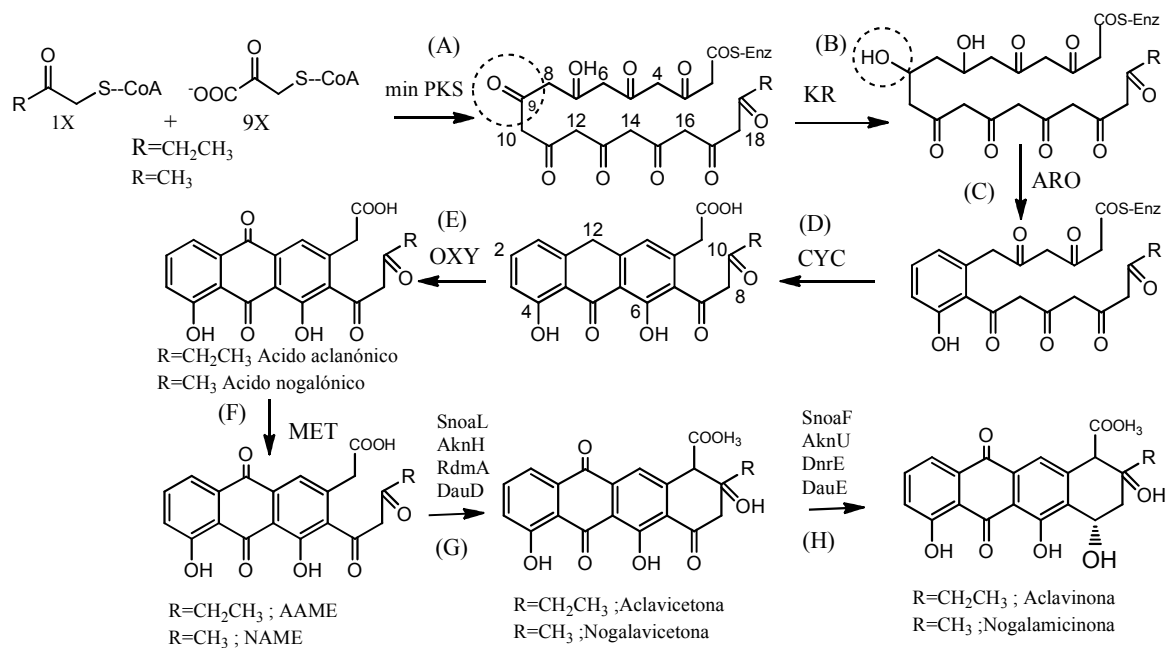
## C. Terminação



A) Iniciação da biossíntese da cadeia policetídeo (B) elongação da cadeia (C) reações de terminação da cadeia policetídeo.

Fonte: Modificado de Dreier e Khosla (2000).

Figura 7 - Reações subseqüentes pós-PKS na biossíntese da aglicona



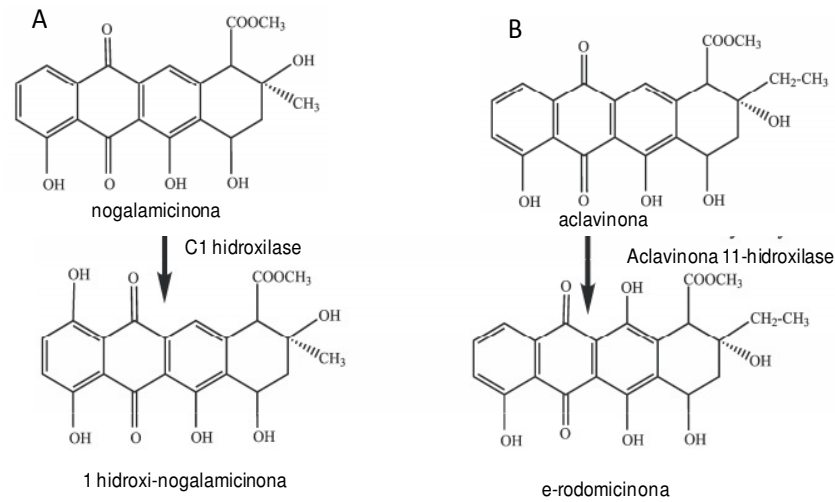
Fonte: Jansson (2004).

### 2.3.5 Modificação da aglicona

#### 2.3.5.1 Substratos não glicosilados

A diversidade estrutural da aglicona é produto de reações realizadas por diversas enzimas referidas como “*tailoring enzymes*”. A maioria das modificações envolve substratos glicosilados, no entanto, são descritas algumas exceções como ocorre com a hidroxilação da posição C1 da nogalamicinona, aglicona da nogalamicina; catalisada pela enzima SnoaL2 (TORKKELL et al., 2001), a qual é a única modificação da antraciclínica na biossíntese (Figura 8A). Uma hidroxilação similar foi observada na aclacinomicina produzida por *S. galilaeus*, associada com a enzima AclR homóloga com SnoaL2 (BEINKER et al., 2006). Estas enzimas não mostram sequências nem estruturas similares à FAD ou monooxigenases P450, as quais são hidroxilases em vias biossintéticas de antibióticos (NIEMI et al., 2002; SULTANA, 2006). Na via biossintética da rodomicina, a aclavinona é convertida em  $\epsilon$ -rodomicinona (Figura 8B) por uma enzima hidroxilases FAD dependente (HONG et al., 1994).

Figura 8 - Reações de modificação de agliconas não glicosiladas



(A) Nogalamicinona convertida a 1-hidroxinogalamicinona (B) Reação apresentando a 11-hidroxilação da aclavinona produzindo  $\epsilon$ -rodomicinona.

Fonte: Sultana (2006).

### 2.3.5.2 Glicosilação

Os compostos antracíclicos contém diferentes açúcares os quais são usualmente ligados ao carbono da posição C7 ou C10 (C1 e C2 no caso da nogalamicina) da aglicona, ligados por meio de *tailoring enzymes* de vias biossintéticas. A glicosilação das antraciclinas determina a atividade antimicrobiana e antitumoral, especificamente a presença de um grupo amina no esqueleto policetídico (FUJII; EBIZUKA, 1997). A glicose é a maior fonte de desoxiaçúcares descrita nas antraciclinas, sendo que as unidades de açúcares são principalmente sintetizadas como derivados timidina difosfo (dTDP), em reações catalisadas pela enzima dTDP-glicose timidiltransferase e duas desidratases que produzem o intermediário (dTDP-4,5-cetoglicose); sintetizado pela ação de diversas enzimas como epimerases, cetoreductases, aminotransferases e metilases (NIEMI et al., 2002).

Os açúcares dTDP são ligados à aglicona através de enzimas glicosiltransferases (GTF), estas enzimas apresentam flexibilidade e especificidade ao substrato como foi reportado na enzima Elm GT de *S. olivaceus* que adiciona L-ramnose à demetoxitetraacenomicina C, mais se verificou que é capaz de adicionar à sua aglicona L-rodinose, L-olivose, L-digitoxose, D-olivose, D-micarose, D-glicose e

inclusive um dissacarídeo D-olivose-D-olivose para produzir elaromicina. Além de Elm GTF são descritas outras glicosiltransferases como Urd GT2 de *S. fradie*, Ole de *S. antibioticus*, Tyl MII de *S. fradie*, Avr de *S. avermitilis*, AknS em *S. galilaeus* (RIX et al., 2002).

## 2.4 Estratégias para produzir novos compostos policetídicos

Classicamente, o isolamento de compostos bioativos produzidos por organismos tem sido realizado através de programas de busca “triagens”, onde muitas moléculas bioativas foram isoladas e avaliadas; devido à alta demanda por novos compostos com atividade biológica, novas aplicações são pesquisadas visando aproveitar os compostos já existentes (XING; RAO; LIU, 2008).

A exploração da biodiversidade e novos ambientes, é objeto de estudo atualmente, como ocorre com os ambientes marinhos, onde foram isolados vários compostos de interesse clínico principalmente de actinomicetes (OLANO; MENDEZ; SALAS, 2009). Além disso, o surgimento ferramentas moleculares como a metagenômica permitiu avaliar a diversidade microbiana em amostras ambientais, permitindo o isolamento de DNA contendo clusters biossintéticos de metabólitos secundários de microorganismos não cultiváveis (NIKOLOULI; MOSSIALOS, 2012).

A utilização de agentes mutagênicos também tem resultado na geração de novos compostos, como a doxorubicina (LOMOVSKAYA et al., 1999) e os métodos semi-sintéticos tem levado à produção de antibióticos com modificações como o menogaril (PENG; VANNIEUWENHZE, 2012) derivado da nogalamicina, e a idarubicina derivada da daunorubicina (MANDELLI et al., 2009).

A manipulação genética de *Streptomyces* fez possível a manipulação de antibióticos usando a biossíntese combinatória, uma abordagem para sintetizar antibióticos híbridos obtidos da clonagem de genes biossintéticos de origens diferentes a modo de serem funcionais dentro de um hospedeiro para produzir novos compostos (HOPWOOD et al., 1985); o nocaute de genes mostrou ser uma técnica molecular de utilidade na síntese de compostos policetídicos análogos como observado na biossíntese da ambruticina em *S. cellulosum* e (JULIEN et al., 2006) *S. olindensis* (GARRIDO, 2005).

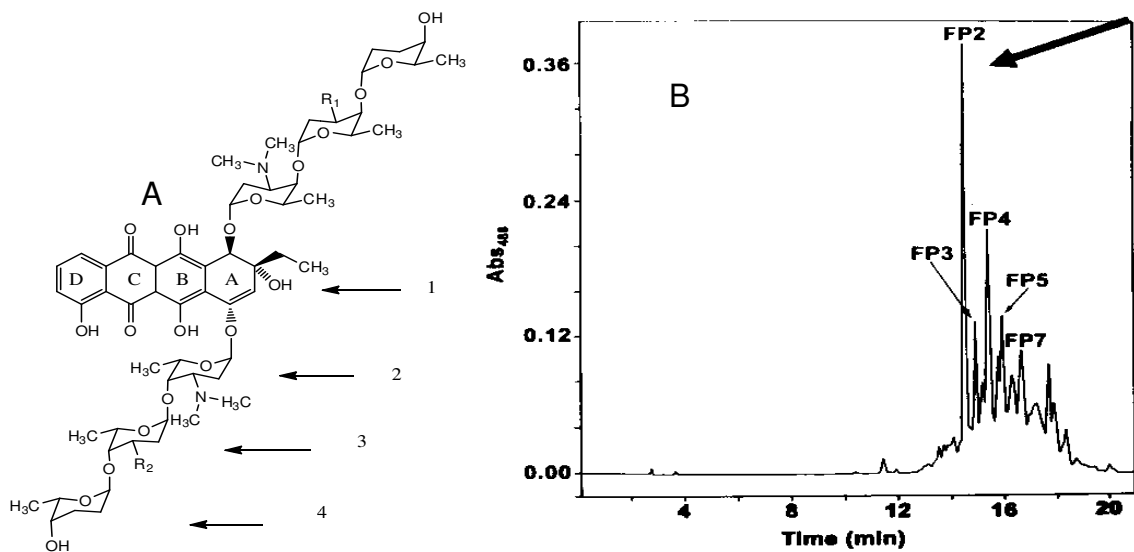
Com o aumento de genomas sequenciados, à bioinformática permite explorar

as sequências em busca de vias biossintéticas de metabólitos secundários *in silico* (MEDEMA et al., 2010), de está forma se estima que o número de clusters identificados de estreptomicetes abrange entre 20 e 50 por genoma (DYSON, 2011). Esta informação é aproveitada por ciências como a biologia sintética que usa conhecimentos em engenharia genética para ativar *clusters* crípticos através dos mecanismos de regulação nativa ou substituindo-os por reguladores sintéticos desenhados *in silico* (MEDEMA et al., 2010).

## 2.5 Cosmomicina D

Na década de 60 foram isoladas pelo departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE), várias linhagens de *Streptomyces* produtoras de antraciclinas, avaliando-as como produtoras de compostos antitumorais, onde se destacou a cepa *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 produtora de um complexo policetídeo de cor roxa. Na época, este complexo policetídeo foi denominado de retamicina, molécula que possuía 3 açúcares ligados ao carbono 10 da aglicona, evento inédito nas antraciclinas.

Figura 9 - Estrutura química das cosmomicinas produzidas por *S. olindensis*



Cosmomicina D: R1=OH e R2=OH, cosmomicina C: R1=H, R2=OH e Citorodina N: R1=OH, R2=H. cosmomicina. 1)  $\beta$ -rodomicina 2) rodosamina 3) L-rodinose ou L-deoxi-fucose 4) L-rodinose.

Estudos posteriores determinaram uma molécula que apresentava mais três açúcares ligados ao carbono 7 (FURLAN et al., 2004), esta nova estrutura foi denominada como cosmomicina D (Figura 9A) e forma parte de um complexo antitumoral formado por várias frações onde a fração 2 corresponde a este composto (Figura 9B). Outras antraciclinas, com um padrão similar de glicosilação foram isoladas de *S. cosmosus* nov. sp. produtor de quatro compostos policetídeos denominados cosmomicina A, B, C e D. As massas desses compostos foram determinados por espectrometria de massas como se mostra na

Tabela 1 (HIRAYAMA et al., 1987).

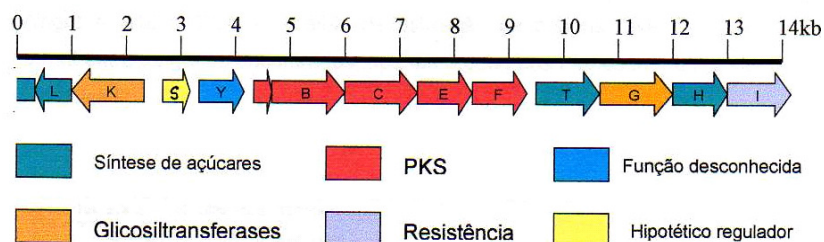
Tabela 1 – Fórmula química e massa atômica da cosmomicina A, B, C e D.

Cosmomicina	A	B	C	D
Peso Molecular ( $\text{g mol}^{-1}$ )	756	772	1173	1189
Fórmula molecular	$\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{O}_{13}\text{N}$	$\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{O}_{14}\text{N}$	$\text{C}_{60}\text{H}_{55}\text{O}_{21}\text{N}_2$	$\text{C}_{60}\text{H}_{59}\text{O}_{22}\text{N}_2$

Fonte: Hirayama (1987)

Em trabalho realizado anteriormente por Garrido (2005), foi construída uma biblioteca genômica de *S. olindensis*, analisada com sondas específicas procurando genes envolvidos na produção de policetídeos (SOKS) selecionando o cosmídeo p5E11, onde foi identificado o agrupamento gênico de 14 Kb contendo 13 genes envolvidos na produção cosmomicina D (Figura 10). Entre os genes identificados se destacam os genes da síntese de PKS, síntese de açúcares, glicosiltransferases, genes reguladores, genes de resistência e outros com função ainda desconhecida

Figura 10 - Genes biossintéticos identificados no cosmídeo p5E11



Fonte: Garrido (2005).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens empregadas no estudo

Tabela 2 - Linhagens empregadas no estudo

Linhagens	Características	Referência
<b><i>E.coli</i> XL1-blue</b>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene
<b><i>E. coli</i> DH10B</b>	F- <i>mcrA</i> Δ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 endA1 recA1 deoR</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>araD139 galU galK nupG rpsL</i> λ-	Lab. bioprodutos
<b><i>E.coli</i> ET12567/pUB307</b>	F- <i>dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM hsdR recF 143 zjj-201::Tn10galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136hisG4 tsx78 mtli glnV44 Kmr</i>	Flett et al.(1997)
<b><i>S. olindensis</i> DAUFPE 5622</b>	Produtor do composto cosmomicina D	Universidade Federal de Pernambuco
<b><i>S. olindensis</i> SoV20</b>	Variante de <i>S. olindensis</i> sobreprodutora CosD	Furlán (2004)
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>		Lab. bioprodutos Lab. bioprodutos

#### 3.2 Plasmídeos

Tabela 3 - Plasmídeos usados neste trabalho

Vetor	Tamanho	Características	Referência
<b>pUC18</b>	2,7 kb	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZ</i> , rep (pMB1)	Fermentas
<b>p5E11</b>	3 kb	Cosmídeo contendo 13 ORF's da <i>cosD</i> , Ap <sup>R</sup>	Garrido (2005)
<b>pHZ1358</b>	10 kb	plasmídeo, TioR, Ap <sup>R</sup> , <i>oriT</i> RK2, replicon pIJ101,	Sun et al.(2002)
<b>pCCH</b>	6,9 kb	pUC18 contendo fragmento <i>SacI</i> de 5kb do cosmídeo p5E11 com os genes <i>cosS</i> e <i>cosY</i> , Ap <sup>R</sup>	Este trabalho
<b>pCCSII</b>	9,1 kb	Derivado de pCCH contendo o gene truncado <i>cosS</i> com cassete de apramicina, Am <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Este trabalho
<b>pCCYII</b>	9,1 kb	Derivado de pCCH contendo o gene truncado <i>cosY</i> com cassete de apramicina. Am <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Este trabalho
<b>pUO9090</b>	4 kb	Plasmídeo, β-gal, Am <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Martin <i>et al.</i> , no publicado
<b>pEM4A</b>	9,4 kb	Plasmídeo, β-gal, Am <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> ,	Perez (2000)
<b>pEM4AY</b>	10,3 kb	Plasmídeo pEM4A contendo o gene <i>cosY</i> clonado no sítio EcoRI/XbaI, Am <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Este trabalho
<b>pEM4AS</b>	9,9 kb	Plasmídeo pEM4A contendo o gene <i>cosS</i> clonado no sítio EcoRI/XbaI, Am <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Este trabalho

β-gal: atividade β-galactosidasa; Am<sup>R</sup>:resistência a apramicina; Ap<sup>R</sup>: resistência a ampicilina; Km<sup>R</sup>:resistência a canamicina ; Tio<sup>R</sup>: resistência a tioestreptona; *oriT*: origem de replicação em *E. coli*.

### 3.3 Antibióticos

Os antibióticos usados neste trabalho são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Antibióticos usados no estudo

Antibiótico	Estoque (mg/ml)	Concentração final (ug/ml)	Solvente
<b>Ampicilina</b>	100	100	Água destilada
<b>Canamicina</b>	50	25	Água destilada
<b>Tiostreptona</b>	120	50	DMSO
<b>Apramicina</b>	50	25	Água destilada
<b>Acido Nalidixico</b>	30	25	NaOH 0,15M

### 3.4 Métodos microbiológicos

#### 3.4.1 Meios de cultura

**Meio LB.** Meio líquido ou sólido utilizado para obter massa celular de *E. coli* e isolar colônias. Composição: triptono (5 g/l), extrato de levedura (5 g/l), NaCl (5 g/l), e agar (15 g/l) quando necessário.

**Meio R5M** (modificado a partir do meio R5 Hopwood, 1985). Meio usado para produção de antibiótico cosmomicina D. Composição: glicose (10 g/l), extrato de levedura (5 g/l), casaminoácidos (0.1 g/l),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (10,12 g/l), 2 ml de elementos traços. Após autoclavar adicionam-se 2,5 ml de  $KH_2PO_4$  em concentração 0,5% e 1 ml de solução de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  em concentração de 5 M.

**Meio Yeme.** Meio usado para ativação de esporos, preparação de protoplastos e crescimento de *Streptomyces* spp para realizar extração de DNA. Composição: extrato de levedura (0,3%), extrato de malte (0,3%), peptona (0,5%), glicose (1%), sacarose (25%) para *Streptomyces olindensis*. Após autoclavar adicionar: 2 ml de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (2,5 M). A preparação de protoplastos requer a adição de 25 ml/L de glicina 20%.

**Meio A.** Meio sólido utilizado para esporulação de *Streptomyces*. Composição: MOPS (21 g/l), glicose (5 g/l), extrato de levedura (0.5 g/l), extrato de carne (0.5 g/l), casaminoácidos (1 g/l), agar (22 g/l). Ajustar com KOH a pH 7,2 antes de autoclavar.



**Meio R2YE** (Thompson *et al.*, 1980). Meio usado para regeneração de protoplastos. Para sua preparação realizar uma solução contendo: Sacarose (103 g/l),  $K_2SO_4$  (0.25 g/l),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (10.12 g/l), glicose (10 g/l), Difco casaminoácidos (0.1 g/l) e completar com 800 ml de água destilada. Aliquotar em erlenmeyers de 80 ml, autoclavar e adicionar as seguintes soluções estéreis na ordem mencionada: 1 ml de  $KH_2PO_4$  (0.5%); 8 ml de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (3.68%); 1.5 ml de L-proline (20%); 10 ml de tampão TES (5.73% ajustado em pH 7.2); 2ml de solução de elementos traços; 0.5 ml de NaOH (1 N), 0.75 ml de fatores de crescimento para auxotróficos quando necessário.

**Meio R5.** Meio alternativo ao meio R2YE usado para regeneração de protoplastos. Composição: sacarose 103 g/l,  $K_2SO_4$  0,25 g/l,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  10,12 g/l, glicose 10 g/l, casaminoácidos 0,1 g/l, solução de elementos traços 2ml, extrato de levedura 5 g/l, TES buffer 5,73 g/l, completar a volume final de 1000 ml. Realizar alíquotas de 100 ml em frascos de 250 ml e colocar 2,5 gramas de agar, seguidamente autoclavar. No momento de usar, derreter o meio e adicionar as seguintes soluções estéreis na seguinte ordem: 1 ml de  $KH_2PO_4$  (0,5%), 0,4 ml de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (5 M), 1,5 ml de L-prolina (20%), 0,7 ml de NaOH (1 N), adicionar 0,75 ml fatores de crescimento quando necessário.

**Meio TSB** (Caldo tripticasa de soja) Meio de crescimento para *E. coli* e *Streptomyces* spp usado para realizar pré- inoculo. O meio comercial prepara-se pesando 30 g por litro de solução.

#### 3.4.2 Soluções

**Solução de elementos traços:** 40 mg/l de  $ZnCl_2$ , 200 mg/l de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 10 mg/l  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , 10 mg/l  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 10 mg/l  $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ , 10 mg/l de  $(NH_4) Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

**TE.** 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8.0

**Solução P.** Pesar 103 g/l de sacarose, 0,25 g/l  $K_2SO_4$ , 2,02 g/l de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 2 ml de elementos traços. Ajustar a volume de 800 ml e autoclavar em alíquotas de 80 ml, no momento de usar adicionar as seguintes soluções estéreis: 1 ml de  $KH_2PO_4$  (0,5%), 10 ml de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  e 10 ml de Buffer TES (5.73% ajustado para 7,2).

**Solução de desnaturação.** 0,5M NaOH; 1,5 M NaCl.

**Solução de neutralização.** 1M de Tris-Cl pH 7,5; 1,5 M NaCl

**Solução SET.** 75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0 , 20 mM Tris-HCl pH 7,5

### 3.4.3 Condições de crescimento

O cultivo padrão de *E. coli* foi mantido a 37 °C em estufa por 16-20 horas a 150 rpm em meio líquido. Em *Streptomyces* estes cultivos foram incubados a 28 °C em agitador orbital a 200 rpm por um período de 3 a 5 dias tanto para crescimento como para produção de cosmomicina D; para extração de DNA genômico foi necessário incubar por 40 horas. Em vários os casos foi necessário realizar um pré-cultivo em meio TSB líquido para o aumento da massa celular por um período de 48-72 horas. Em meio sólido o crescimento de está bactéria pode demorar entre 5 a 7 dias.

### 3.4.4 Preservação de linhagens

A preservação das linhagens de *E. coli* se realizou centrifugando 1,5 ml de uma cultura crescida durante a noite a 780 x g a temperatura ambiente por 10 minutos. O sedimento era ressuspendido em partes iguais de meio LB fresco e glicerol 50% e posteriormente armazenado a -80 °C e -20 °C. As linhagens de *Streptomyces* foram preservadas através da suspensão de esporos em glicerol 20%, recolhidos de cultivos crescidos durante 4-6 dias em meio A sólido com ajuda de lâminas de bisturi estéreis e armazenados a -20 °C.

## 3.5 Manipulação de DNA

### 3.5.1 Extração de DNA

A obtenção do DNA plasmidial de *E. coli* em pequena escala foi realizada pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook et al.(1989) e pelo Kit comercial GeneJet de Fermentas. A extração de DNA genômico de *Streptomyces* se realizou de acordo com os protocolos descritos por Kieser et al.(2000).

### 3.5.2 Reação padrão de PCR

As reações de PCR foram realizadas em volume de 50 µl contendo 1X do tampão Pfu (200 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25 °C), 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 M KCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mg/mL BSA), 2mM de MgSO<sub>4</sub> ; 0,2 mM de solução de dNTPs; 1 µM de cada iniciador (senso e antisenso); 0,5 Uµl<sup>-1</sup> de Pfu DNA polimerase de Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lituânia) e realizadas em termociclador Mastercycler 5331 Gradient da Eppendorf. O DNA molde de *S. olindensis*, o cosmídeo p5E11 e os plasmídeos usados foram ajustados em concentração de 70-100 ng.

### 3.5.3 Digestões enzimáticas

Os reagentes e as condições ótimas para as reações de digestão enzimática foram realizadas seguindo as recomendações feitas pelos fabricantes. Quando disponíveis as seqüências, foram realizadas digestões *in silico* usando o aplicativo RESTRICT do pacote Jemboss v 1.5 de EMBOSS (CARVER; BLEASBY, 2003) e o programa NEBcutter (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2003).

### 3.5.4 Geração de extremidades cegas e tratamento com fosfatase alcalina

Os extremos cegos foram gerados com a enzima fragmento Klenow e tratados com a enzima fosfatase alcalina FastAP de Fermentas antes de serem colocados em reações de ligação, seguindo as recomendações descritas pelo fabricante.

### 3.5.5 Ligações

As ligações foram realizadas empregando a enzima T4 DNA ligase (Fermentas) testando várias relações de vetor:inserto 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4. As reações foram incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora quando de tratava de extremos coesivos e 2 horas para ligações de extremidades cegas.

### 3.5.6 Purificação do DNA

O DNA foi purificado empregando o KIT comercial GFX MicroSpin Column (General Electric, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do mesmo.

### 3.5.7 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses foram realizadas em géis de agarose em concentração de 0.8% suplementado com brometo de etídio em concentração final de 0,5 ug/ml. As amostras de DNA foram misturadas com tampão “Loading Dye” 10X (100 mM EDTA, 43% glicerol e 0,5% azul de bromo-fenol) e corridas em cubas horizontais a uma voltagem de 100V contendo tampão TAE (composição: Tris 0,04 M, ácido acético glacial 0,12% e Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mM pH 8) como eletrólito; e observadas em transiluminador de UV. Os marcadores de peso molecular empregados foram 1kb e λ-HindIII de Fermentas.

### 3.5.8 Seqüenciamento e análise das seqüências

As amostras de DNA para seqüenciamento foram preparadas e enviadas de acordo com as normas descritas pelo centro de estudos do Genoma Humano da USP. As seqüências obtidas foram editadas no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) e analisadas com a ferramenta tBlastX e ORF Finder frente ao banco de dados do Genbank (2012).

### 3.5.9 Transformação com DNA plasmidial

#### 3.5.9.1 *Preparação de células competentes com cloreto de cálcio*

As células de *E. coli* DH10B e XL1-blue foram crescidas até atingir fase exponencial (densidade óptica entre 0.4-0.6) e tratadas com solução cloreto de cálcio gelado como descrito por Sambrook et al.(1989) estocadas e congeladas a – 80°C. A transformação de células foi realizada misturando 2 µl da reação de ligação (100 pg -10 ng) com 100 µl de células competentes, colocadas em gelo por 30

minutos; logo se aplicou um choque térmico de 42 °C por 90 segundos seguido de incubação de 2 min. em gelo. As células foram ressuspensas em 1 ml de meio LB líquido e incubadas a 37 °C por 1 hora com agitação. Seguidamente, semeadas em placas com meio LB sólido suplementado com antibiótico e em alguns casos foi adicionado X-gal (40 µg/ml) e IPTG (12,5 µg/ml) para selecionar colônias pelo sistema de alfa complementação.

### 3.5.9.2 *Preparação de células eletrocompetentes*

As células de *E. coli* DH10B foram crescidas até atingir fase exponencial (densidade óptica entre 0.4-0.6) centrifugadas e posteriormente submetidas a lavagens com glicerol 10% gelado estocadas e congeladas a -80 °C. A transformação foi realizada colocando 1 µl da reação de ligação adicionada a 50 µl de células eletrocompetentes. As reações foram realizadas em cubetas de 0,2 cm (BIORAD), usando um eletroporador BIORAD Gene Pulser c/Pulse control, com pulso de 12.500 V/cm, resistência paralela de 200 Ω e capacitância de 25 µF.

### 3.5.10 *Preparação e transformação de protoplastos de Streptomyces*

A preparação de protoplastos se realizou como descrito por Kieser et al.(2000); a transformação foi realizada descongelado 200 µl de protoplastos, seguido de centrifugação por 7 minutos a 835 x g (este passo é importante já que serve como lavagem para limpar as amostras de nucleases provenientes dos protoplastos lisados) o sobrenadante foi descartado de modo que ficasse um volume de aproximadamente 50 µl para ressuspender as células. Misturaram-se 20 µl de solução de DNA com os protoplastos e 200 µl da solução P suplementada com 25% de polietileno glicol PEG 1500 e posteriormente o volume total foi semeado em placas de meio R2YE ou R5 sólido de forma massiva. As placas foram incubadas a 30 °C durante 20 horas, logo após, adicionados 2 ml de solução do antibiótico na concentração adequada cobrindo a placa totalmente. Este método conhecido como *Flooding* permite selecionar as colônias transformantes depois de incubar as placas entre 5 e 7 dias a 30 °C. As colônias emergentes são repicadas em placas de meio A com antibiótico.

### 3.6 Elucidação de novos genes biossintéticos do cluster CosD

A elucidação de genes biossintéticos do *cluster* cosmomicina D abordou três estratégias: a primeira foi encaminhada na amplificação de genes em reações de PCR; a segunda abordagem empregou a técnica de *Genome walking* LDGW-PCR e a terceira estratégia aproveitou o desenvolvimento nas técnicas de biologia molecular e genômica para seqüenciar o genoma de *S. olindensis* por pirosequenciamento.

#### 3.6.1 Amplificação de novos genes biossintéticos por PCR

##### 3.6.1.1 Iniciadores

Um conjunto de iniciadores degenerados foram desenhados para amplificar novos genes biossintéticos do cluster CosD a partir do alinhamento e seleção de regiões conservadas de seqüências nucleotídicas de proteínas ciclases, cetoreductases e metiltransferases policetílicas de grupamentos gênicos de actinomicetes produtores de antraciclinas (Tabela 5).

Tabela 5 - Iniciadores usados para amplificar genes biossintéticos CosD

Identificação	Seqüências 5'-3'	Produto PCR	Gene alvo
<b>*CosM-F</b>	GTGACGAACTGTCGCGCAC	300 bp	Cetoreductase
<b>CosM-R</b>	TCCACGAGTACGGKCCSGTSCC		Cetoreductase
<b>CycH-F</b>	TACAACACSGGRAARACSGA	356 bp	Ciclase
<b>CycH-R</b>	GGCACCTACCGBCAGCTCGG		Ciclase
<b>CycW-F</b>	GAGATGCGBSRVCACTTCGG	458 bp	Ciclase
<b>CycW-R</b>	TCAGCCTGGACGCRCCSTTCGG		Ciclase
<b>Keto-F</b>	TCGTYACBGGYGCSACSAG	740 bp	Cetoreductase
<b>Keto-R</b>	CAGGCSMTSAACGTCTGCGGC		Cetoreductase
<b>Met-F</b>	TACGACCGRCTSGGNGTSGARTTC	645 bp	Metiltransferase
<b>Met-R</b>	TGGGTSGACTGGTCVCACACS		Metiltransferase
<b>CycW-3F</b>	CCACATCGACCTCCTGGAGC	≈5kb	Fragmento
<b>Csm-3R</b>	CCACATCGACCTCCTGGAGC		Cluster cosD

\*CosMF iniciador não degenerado desenhado a partir do gene *cosM*.

### 3.6.1.2 Programa de amplificação usado em PCR

As reações de PCR com os iniciadores degenerados foram realizadas misturando os reagentes como mencionado na seção 3.5.2 e as corridas em termociclador foram feitas sob as seguintes condições: um ciclo inicial de 96 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 2 minutos a 96 °C; 1 minuto a 62 °C; 2 minutos a 72 °C, seguido de uma extensão final de 8 min. e 30 segundos.

### 3.6.2 Long distance PCR no genoma de *S. olindensis*

A estratégia de *Long Distance* PCR foi realizada considerando a posição dos genes codificantes para as proteínas ciclases em relação aos genes de cetoredutases dos *clusters* biossintéticos da nogalamicina e aclacinomicina (Figura 11), visando amplificar fragmentos entre 4 e 7 kb com os iniciadores CycH-F e CosM-R; CycW-3F e Csm-3R (seção 3.6.1.1) a partir do DNA genômico de *S. olindensis*.

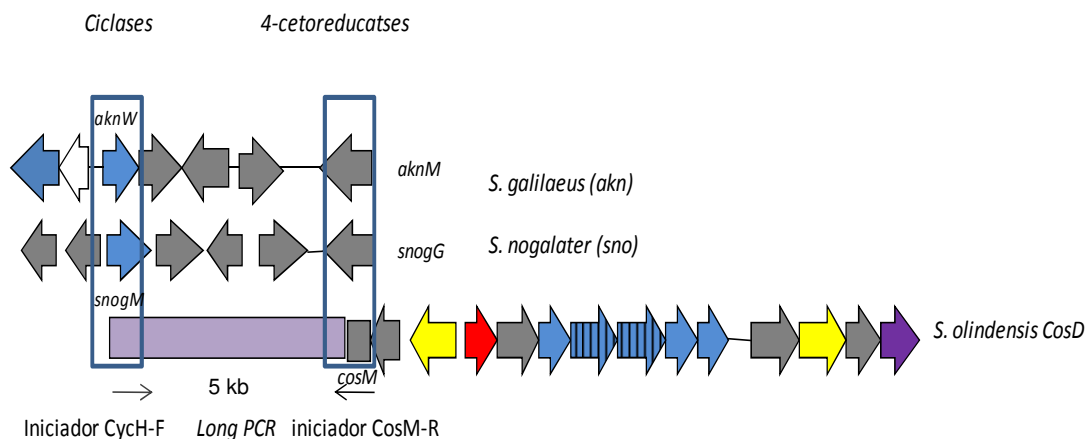
As reações de PCR realizadas continham os seguintes reagentes: tampão 1X Phusion HF, dNTP's 0,2 mM; iniciadores 50 pmol, DMSO 3%, enzima Phusion 1U $\mu$ l<sup>-1</sup> (Thermo Fisher Scientific., Ipswich, New England) 100 ng de DNA de *S. olindensis* em reações de 50  $\mu$ l. Os ciclos de PCR empregados foram 1 ciclo inicial a 98 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos a 98 °C por 1 minuto, 61 °C por 30 segundos, 72 °C por 5 minutos e 72 °C por uma extensão final de 8 minutos. Os fragmentos amplificados foram clonados com ajuda do Kit comercial CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas). Os clones recuperados foram dispensados em placas de ELISA contendo 150  $\mu$ l de meio LB contendo ampicilina, crescidos durante à noite a 37 °C e conservados com glicerol 20%. Seguidamente se realizou uma extração de DNA plasmidial e digestão com a enzima *Bgl*II para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

### 3.6.3 Amplificação de genes por *LDGW-PCR* no cosmídeo p5E11

A técnica *Long-distance Genome walking* (LDGW-PCR) de (MIN; POWELL, 1998) foi usada para amplificar e estender a seqüência do cluster CosD no

cosmídeo p5E11. A metodologia foi realizada em quatro etapas: Extensão, *tailing*, PCR e *Nested PCR* como se observa na Figura 12.

Figura 11 - Desenho Ilustrativo da estratégia de amplificação por *Long PCR*



*akn*, cluster da aclacinomicina; *aknW* gene codificante para ciclase; *aknM* gene codificante para cetoreductase; *sno* cluster da nogalamicina; *snogM* ciclase putativa, *snogG* gene codificante para cetoreductase.

### 3.6.3.1 Extensão

Esta etapa foi realizada para amplificar por PCR DNA de fitas simples contendo regiões desconhecidas do cosmídeo p5E11 usando o iniciador (Sp1), desenhado a partir do gene *cosI*. Sessenta picomoles do iniciador Sp1: 5'-CTGGCGATCCAGACCGAAGC e 100 ng de DNA do cosmídeo p5E11 foram colocados em uma reação de 50 µl com os reagentes descritos na seção 3.5.2 nas seguintes condições: 96 °C por 5 min, 30 ciclos de: 96 °C por 1 min, 62°C por 1min, 72°C por 4 min e 30 s; seguido de uma extensão final a 72 °C por 8 min e 30s.

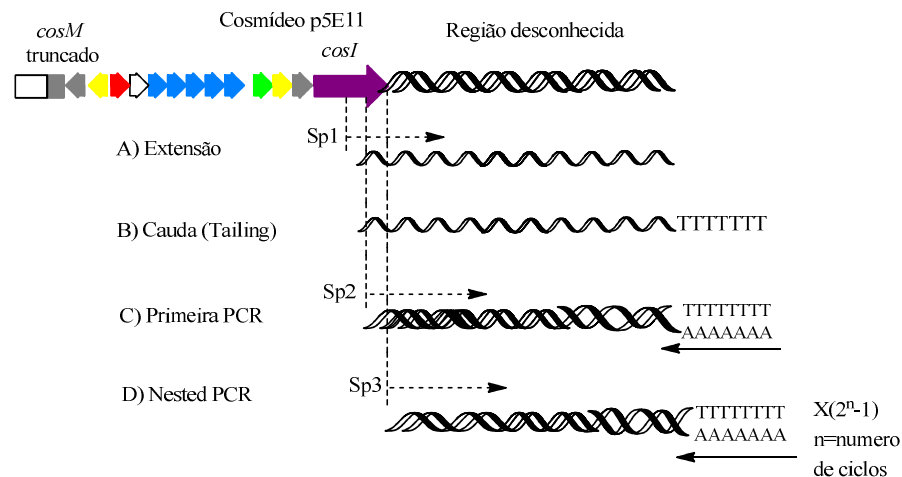
### 3.6.3.2 Cauda (Tailing)

Nesta etapa é colocada uma cauda de timinas no extremo terminal 3' das fitas simples de DNA formadas na etapa de extensão, com o objetivo de realizar uma reação de PCR propriamente dita. Cinco microlitros de DNA purificados da reação de extensão são aquecidos a 95 °C por 3 minutos em reações de volume final de 20 µl. Cada reação foi montada com 5 µl de tampão TdT 5X (50mM fosfato de



potássio (pH 6.4), 100 mM NaCl, 1mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.1% Tween® 20 e 50% glicerol); 0,2 mM dTTP e água livre de nuclease. Após a desnaturação do DNA, o tubo foi colocado imediatamente no gelo por um minuto antes da adição de 1  $\mu$ l da enzima terminal desoxinucleotidil transferase (TdT) (Promega Inc., Madison, USA) atingindo uma concentração final de 15 U. A reação foi incubada a 37 °C durante 20 minutos (tempo suficiente para a enzima TdT adicionar uma cauda de 30 timinas no extremo 3') a reação foi inativada por 10 min. a 65 °C. O produto final foi diluído cinco vezes com água livre de nuclease e aliqotado em tubos contendo cinco microlitros.

Figura 12 - Representação da técnica LDGW



(A) Reação de extensão para criar fitas simples de DNA no extremo 3' terminal, (B) *Tailing*, a cauda poli T é adicionada no extremo 3' com a enzima TdT, (C) Reação de PCR realizada com os iniciadores Sp2 e Poli-A (iniciador cauda específico), (D) *Nested PCR* realizada com iniciadores Sp3 e Poli-A.

Fonte: Min e Powel (1989)

### 3.6.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A primeira reação de PCR foi realizada empregando como molde 5  $\mu$ l de produto da reação de *tailing* suplementada com os reagentes descritos na seção 3.5.2 e os iniciadores Sp2: 5'-GACGAGGTGTTTCCTGAACCTGAC e cauda Poli-A específica (contendo 30 adeninas) sob os seguintes ciclos de PCR: ciclo inicial de 96 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 2 minutos a 96 °C; 1 minuto a 56 °C; 4 minutos a 72 °C, seguido de uma extensão final de 8 min. e 30 segundos.

### 3.6.3.4 Nested PCR e seqüenciamento

Cinco microlitros produto da reação da PCR anterior foram empregados para realizar a *Nested* PCR usando os iniciadores Sp3: 5'-CCTCAAGGAGGTCGCCCCAGTC e Poli-A com os reagentes descritos na seção 3.5.2 e as condições de amplificação na seção anterior. Os produtos de PCR obtidos foram purificados e seqüenciados no Instituto de genoma humano da Universidade de São Paulo.

#### 3.6.4 Seqüenciamento do genoma de *S. olindensis*

O DNA genômico de *S. olindensis* foi extraído como descrito por (KIESER et al., 2000) e enviado de acordo com as exigências da empresa Macrogen (908 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul 153-781, Korea) onde 2 µg de DNA genômico foram utilizados para gerar uma biblioteca com fragmentos de ~ 877 bases e processados para seqüenciamento pelo método de 454 piroseqüenciamento com um módulo *paired-end*, gerando *reads* de ~ 650 bases numa plataforma GS-FLX Titanium (Roche).

##### 3.6.4.1 *Assembly*

A corrida de seqüenciamento do genoma de *S. olindensis* gerou 650.799 leituras de tamanho médio de 400 pb; 97% dessas leituras foram montadas por meio do aplicativo GS *De Novo Assembler* (ROCHE, 2010) em 146 contigs.

##### 3.6.4.2 *Anotações dos genes*

A anotação automática de genes do genoma foi realizada com a ferramenta de predição FGENESB de (SOFTBERRY, 2010) e para a identificação de genes do metabolismo secundário se usou o algoritmo antiSMASH (MEDEMA et al., 2011) específico para a busca de agrupamentos de compostos policetídicos. A análise das fases abertas de leitura foi feita utilizando o programa Frameplot (ISHIKAWA; HOTTA, 1999) e (GCUA, 2006); as classes funcionais de proteínas hipotéticas foram acessadas com auxílio das ferramentas BlastP (ALTSCHUL et al., 1990) na base de dados do NCBI, o algoritmo ORF Finder (TATUSOV, 2011) e a base de

dados PFAM (FINN et al., 2010).

### 3.6.5 Identificação do cluster cosmomicina D

Utilizando-se o programa de alinhamento local de seqüências BlastStation2 (MIYAJIMA, 2002) foi feito um alinhamento entre o segmento conhecido de 14 kbs do cluster da cosmomicina D contra os 146 *contigs* obtidos no sequenciamento. Como resultado houve alinhamento total entre a região já descrita por Garrido (2005) com o *contig* 5 (327677 pb), sendo anotadas 40 ORFs por sua similaridade com genes descritos de antraciclinas com os aplicativos e programas descritos na seção anterior.

## 3.7 Preparação de plasmídeos recombinantes

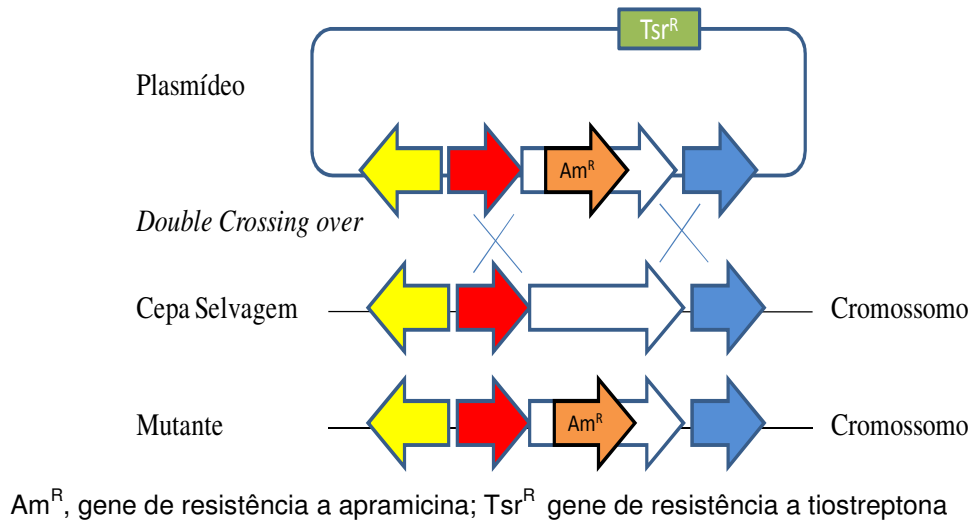
### 3.7.1 Nocaute dos genes *cosS* e *cosY*

A estratégia para obtenção de mutantes é referida como mutagênese por troca alélica (Figura 13), onde ocorre recombinação entre a cópia íntegra do cromossomo e uma região de um plasmídeo contendo o gene truncado com uma marca de resistência inserida em um sítio de restrição específico do gene (KIESER et al., 2000). A estratégia de nocaute e a construção dos plasmídeos para os genes *cosS* e *cosY* é esquematizada na Figura 14.

#### 3.7.1.1 Construção do plasmídeo pCCH

O cosmídeo p5E11 (GARRIDO, 2006) foi digerido com a enzima de restrição *SacI*, recuperando um fragmento de  $\approx 5$  kb contendo os genes *cosS* e *cosY*. Esse fragmento foi subclonado no vetor comercial pUC18 (Fermentas) no mesmo sítio de restrição gerando o plasmídeo pCCH (Figura 14A). Este plasmídeo foi replicado na cepa *E. coli* DH10B e conservado como se descreve na seção 3.4.4.

Figura 13 - Esquema da geração de um mutante por dupla recombinação



### 3.7.1.2 Construção dos plasmídeos pCCSII e pCCYII

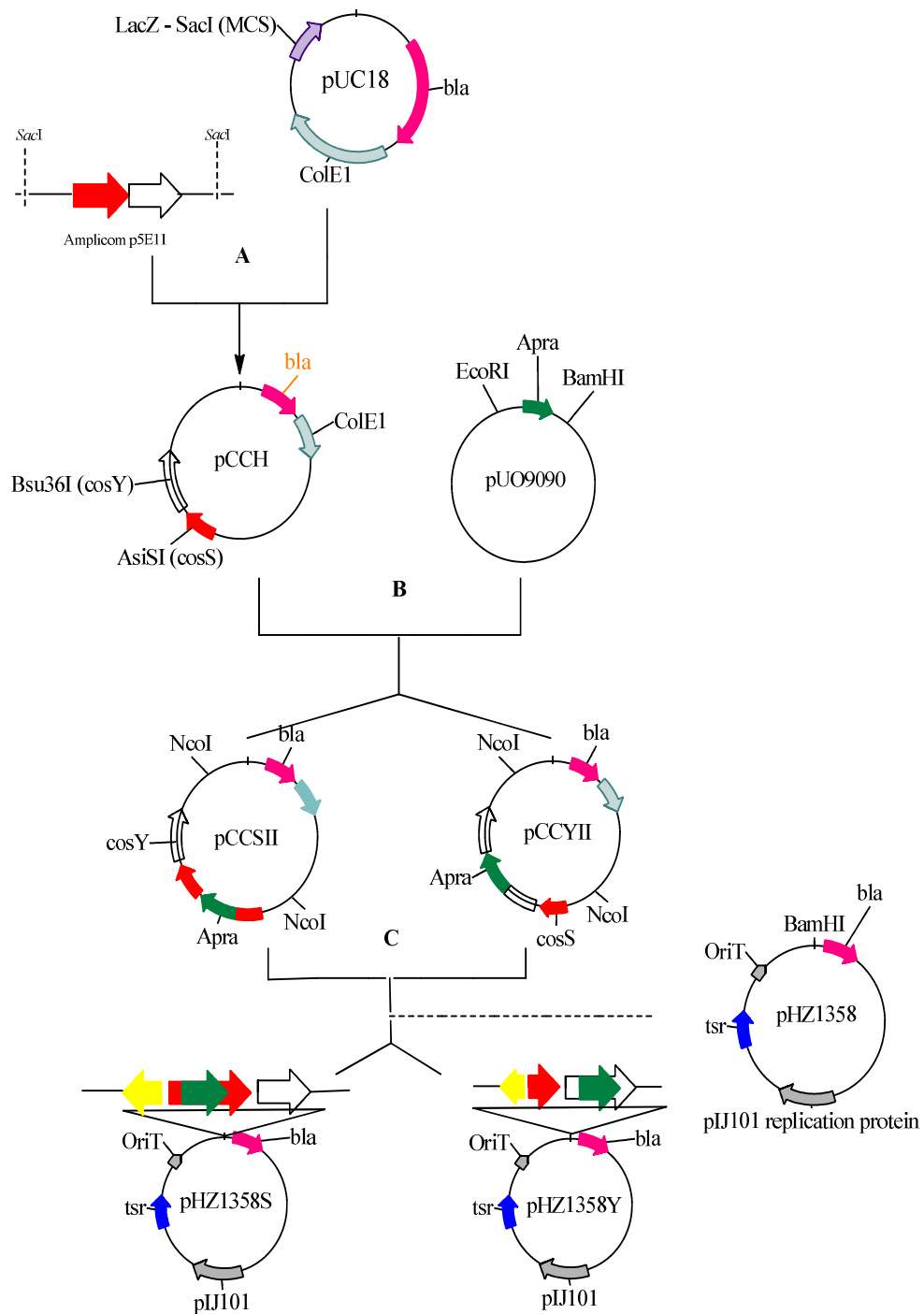
A construção dos plasmídeos pCCSII e pCCYII (Figura 14B) foi realizada digerindo o plasmídeo pCCH nos sítios de restrição *AsiSI* e *Bsu36I* dos genes *cosS* e *cosY* respectivamente, seguidamente se realizou um tratamento com a enzima Klenow e fosfatase alcalina. O cassete de apramicina (1,5 Kb) foi obtido da digestão do plasmídeo pUO9090 (Martin *et al.*, não publicado) com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* e tratado com Klenow. Uma vez compatibilizados os extremos de ambos os fragmentos foram ligados como se descreve na seção 3.5.5. Os plasmídeos obtidos foram replicados em *E. coli* DH10B (seção 3.5.9) e digeridos com diferentes enzimas de restrição (*XbaI*, *EcoRI*, *SacI*, *BamHI*, *KpnI*) para confirmar através do padrão de restrição e seqüenciamento a orientação do cassete de apramicina.

### 3.7.1.3 Construção dos plasmídeos pEM4AS e pEM4AY

A construção dos plasmídeos pEM4AS e pEM4AY (Figura 15) se realizou com o objetivo de avaliar o efeito de uma cópia adicional dos genes *cosS* e *cosY* na produção de cosmomicina D. O plasmídeo pEM4A (9,4 kb) (BLANCO *et al.*, 2001) foi digerido nos sítios de restrição *EcoRI* e *XbaI* para clonar os genes de *cosS* e *cosY* na região a jusante do promotor constitutivo *ermE*<sup>\*</sup>. Estes genes foram

amplificados com iniciadores contendo sítios de restrição específicos (ver Tabela 6) que permitiram a amplificação do seu sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e submetidos a reações de ligação.

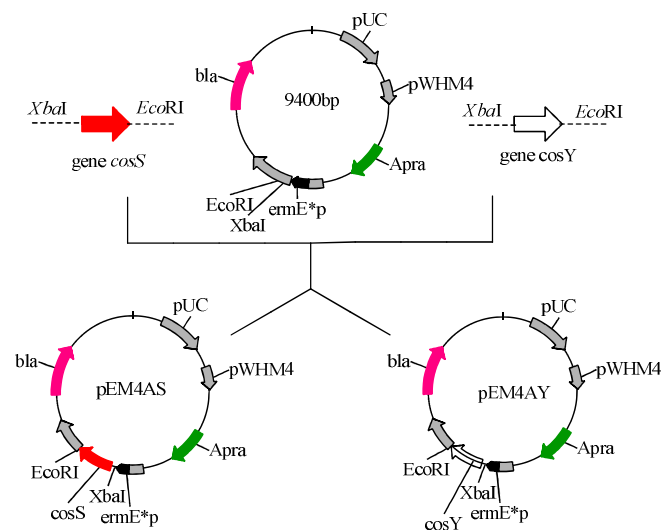
Figura 14 - Estratégia de nocaute para os genes *cosS* e *cosY*



(A) Construção do plasmídeo pCCH, (B) construção dos plasmídeos pCCSII e pCCYII, (C) construção dos plasmídeos conjugativos pHZ1358S e pHZ1358Y

As construções obtidas foram replicadas em *E. coli* e confirmadas através do padrão de corte com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*. Em seguida usaram-se em reações de transformação de protoplastos de *S. olindensis*; como se menciona na seção 3.5.10. As colônias recuperadas foram crescidas em meio R5M líquido suplementado com antibiótico e monitoradas através de uma triagem visual acompanhando a produção de cosmomicina D por um período de 5 a 7 dias; as cepas e extratos obtidos foram denominados com a mesma nomenclatura descrita para os plasmídeos pEM4AS e pEM4AY.

Figura 15 - Construção dos plasmídeos de pEM4AY e pEM4AS



### 3.7.2 Iniciadores usados na construção de plasmídeos recombinantes

Na Tabela 6 são apresentados os iniciadores usados nesta etapa do trabalho, as reações de PCR seguiram as concentrações descritas na seção 3.5.2. Os ciclos de PCR usados com os iniciadores CosYAF- APRA65V e CosSAF-APRA65V foram 1 ciclo de 5 min. a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min. a 95 °C; 2 min. a 55 °C; e um minuto a 72 °C seguido de uma extensão final de 72°C por 8 min. Este programa foi usado para verificar a orientação do cassete de apramicina (seção 3.7.1.2). O programa para amplificar os genes *cosS* e *cosY* (seção 3.7.1.3) com os iniciadores CosS F/R e CosY F/R consistiu em 1 ciclo de 5 min. a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min. a 95 °C; 2 min. a 68 °C; 1,5 min. a 72 °C e uma extensão final de 72 °C por 8 minutos.

### 3.7.3 Extração de antraciclinas em pequena escala do meio de cultivo

Os cultivos para produção de cosmomicina da cepa selvagem e cepas modificadas foram realizados em 50 ml de meio R5M líquido por triplicata, suplementado-o com o antibiótico apramicina quando necessário. Uma vez se observou a produção de cosmomicina, entre 2 e 5 ml de meio de cultivo foram aplicados em cartuchos de extração de fase sólida (Sep-pak C-18, 50 mg Waters), acondicionados previamente com água destilada. Os compostos retidos na coluna foram eluídos com metanol e concentrados em centrifuga de vácuo, pesados e ressuspendidos em metanol para HPLC (Sigma Aldrich) atingindo uma concentração de 6 mg/ml.

Tabela 6 - Iniciadores usados para construção de plasmídeos recombinantes

Gene/ Fragmento	Iniciador	Seqüência 5'3'	Amplicom	Anotação
<b>Apra/cosY</b>	APRA65V	GCAAATACGGCATCAGTTACC	302 bp	Conferir orientação cassete apramicina
	CosYAF	GACGGATCACTCCTCGGCCTG		
<b>Apra/cosS</b>	APRA65V	GCAAATACGGCATCAGTTACC	275 bp	Conferir orientação cassete apramicina
	CosSAF	CACATCAAGTTCGGCTCGAT		
<b>cosY</b>	CosYF	ATAATATCTAGAAAGGACGACCGCTGTGCCGATC	1054 bp	Sítio <i>XbaI</i>
	CosYR	ATATTAGAATTCGCGGTGCCCTAGAAGACGACT		Sito <i>EcoRI</i>
<b>cosS</b>	CosSF	ATAATATCTAGAGGGAGATTGAGCAGGGAGACG	645 bp	Sítio <i>XbaI</i>
	CosSR	ATATTAGAATTCACCGAACTCCCGTCAACGGCC		Sítio <i>EcoRI</i>
<b>pCCSII</b>	1FSBgIII	TATTAGATCTGCGAAGGTGGTGAAGAGTACC	2730 bp	Fragmento <i>pCCSII</i> Sítio <i>BglII</i>
	1RSBgIII	TATTAGATCTAGGCCGAGGAGTGATCCG		
<b>pCCYII</b>	1YFBgIII	AATAAGATCTGACTACGAGATCGCGCCC	3500 bp	Fragmento <i>pCCYII</i> Sítio <i>BglII</i>
	1YRBgIII	ATTAAGATCTCAGGCTGATGGTCCGGGTC		

### 3.7.4 Análises cromatográficas

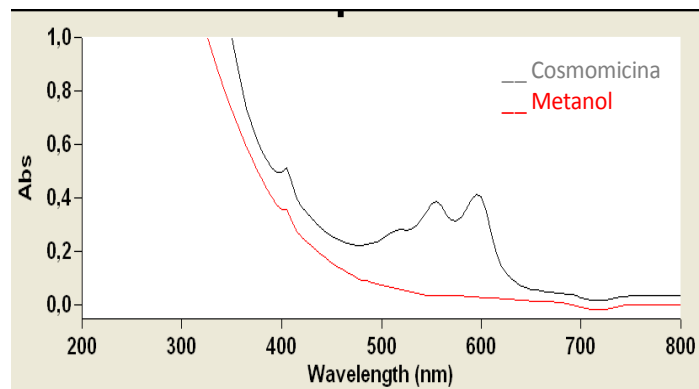
Os extratos obtidos foram analisados utilizando a coluna analítica de fase reversa Phenomenex Luna Su C18 (2) 100A (250 mm X 4,6 mm) utilizando um gradiente de fase móvel de 20 minutos iniciando com mistura de 10% acetonitrila, 89,9% água e 0,1% de ácido fórmico; finalizando com 58% acetonitrila, 41,9% água e 0,1% de ácido fórmico com recuperação das condições iniciais nos 10 minutos

subseqüentes como descrito por Garrido (2005). As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência: cromatógrafo analítico Shimadzu com sistema binário de bombas, modelo LC-20AD, detector UV-visível com arranjo de diodos modelo SPD-20AD e injetor automático Shimadzu SIL-20A. Para análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por electrospray (LC-ESI MS), um detector Bruker micrOTOF - QII foi acoplado a um CLAE Shimadzu com as mesmas características já descritas.

#### 3.7.4.1 Espectro de absorção do complexo cosmomicina D

O perfil de absorção do extrato bruto da cosmomicina produzido pela cepa selvagem *S. olindensis* foi lido através de uma varredura de absorbâncias entre os 200 e 800 nm, onde se observou o espectro de absorção característico entre 550 e 650 nm reportado por Furlan (1997) como observado na Figura 16; este perfil foi usado para comparar os espectros dos extratos obtidos das cepas transformantes pEM4AS e pEM4AY.

Figura 16 - Espectro de absorção do extrato bruto do complexo cosmomicina D



Varredura de espectro de 200 a 800 nm

#### 3.7.4.2 Espectro de absorção da fração 2 do complexo cosmomicina D

Foi analisado o espectro de absorbância no ultravioleta-visível (190-800 nm) da cosmomicina D isolada e purificada do complexo antitumoral, a qual foi usada como controle para rastrear seu pico característico nos extratos das cepas de estudo. Observou-se que o comprimento de onda mais adequado para realizar as

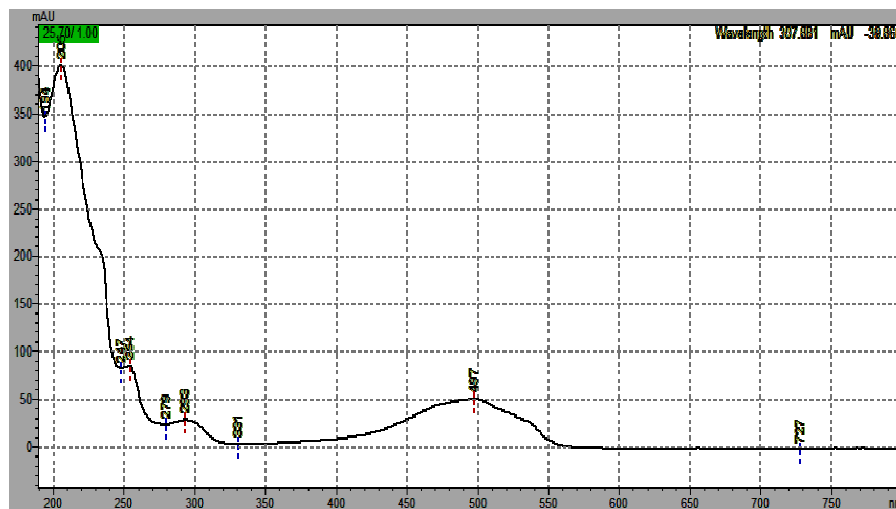


leituras era 500 nm (Figura 17), pois é um comprimento de onda onde o composto apresenta um valor alto de absorvância.

### 3.7.5 Teste de atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado em duplicata para avaliar a presença de antibiótico nos diferentes extratos (seção 3.7.3). Placas de meio LB sólido foram semeadas com 100  $\mu$ L de *Bacillus subtilis* em densidade optica de 0,1; seguidamente foram colocados discos de papel filtro estéreis de diametro de 6 mm sobre o agar e colocados 10  $\mu$ L do extrato bruto. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e a leitura realizada entre as 12-16 horas seguintes.

Figura 17 - Espectro de espectro de absorvância no ultravioleta-visível da cosmomicina D



Varredura de absorvância no ultravioleta-visível 190-800 nm da cosmomicina D.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amplificação de novos genes biossintéticos

Com o objetivo de elucidar novos genes biossintéticos do *cluster* cosmomicina D, seqüenciado parcialmente por Garrido (2005) do cosmídeo p5E11 da biblioteca genômica de *S. olindensis*, este clone foi estudado novamente já que se presumia a presença de novos quadros abertos de leitura associados com o mecanismo de resistência ao antibiótico. Paralelamente foram realizadas reações de PCR visando amplificar fragmentos gênicos associados à síntese da aglicona com iniciadores desenhados a partir de proteínas de antraciclinas pKS do tipo II usando como molde o DNA genômico da bactéria, esta estratégia foi usada na triagem da biblioteca genômica empregando como sonda um fragmento do gene da subunidade alfa da cetosintase que resultou no isolamento do cosmídeo p5E11. Finalmente, levando em consideração os avanços observados em tecnologia de sequenciamento de última geração e a grande melhora da relação custo/benefício e menores tempos de corrida; foi realizado um “draft” do genoma, de *S. olindensis* através da tecnologia de piroseqüenciamento.

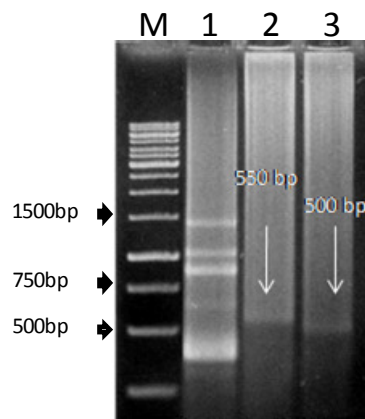
#### 4.1.1 LDGW-PCR *Genome walking* no cosmídeo p5E11

Usando a seqüência do cosmídeo p5E11 como molde se empregou a técnica de *Genome walking* (LDGW-PCR) para amplificar regiões desconhecidas de DNA de cosD. Esta técnica oferece uma série de vantagens em comparação com outras técnicas descritas para o mesmo fim como a reação de PCR com iniciadores aleatórios, *inverse* PCR, *panhandle* PCR, *cassette* PCR já que não depende do uso de enzimas de restrição, *iniciadores* aleatórios, ligação de adaptadores e clonagens subseqüentes em vetores que podem ser críticos em questão de consumo de tempo e materiais (TONOOKA; FUJISHIMA, 2009); esta metodologia foi empregada em outros trabalhos onde foram amplificados genes em *Drosophila*, *Anopheles gambiae* (Min & Powell, 1998), *Lactobacillus* (ELKINS; MOSER; SAVAGE, 2001) e *Streptomyces fradiae* (LUTZ, 1999).

Como descrito na seção 3.6.3, o fragmento de fita simples estendido a partir

do gene *cosI* foi de  $\approx 1,5$  Kb e nas reações de PCR subseqüentes foram amplificados fragmentos de 550 bp e 500 bp respectivamente (Figura 18). Logo que foi montada a seqüência *contig* (Figura 19) se evidenciou a presença de uma nova ORF contigua ao gene *cosI* chamada de *cosJ* que mostrou 89% de identidade à proteína transportadora do tipo ABC de *S. zinciresistens* K42.

Figura 18 - Técnica de LDGW-PCR no cosmídeo p5E11



(M) marcador de DNA de 1kb. (1) Extensão com o iniciador Sp1(2) Produto da primeira reação de PCR utilizando os iniciadores Sp2 e poli-A; (3) Produto da segunda reação de PCR utilizando os iniciadores Sp3 e poli-A.

Uma vez padronizadas as reações, optou-se por realizar extensões de 3kb e 4kb, no entanto, houve uma restrição na amplificação dos fragmentos obtendo-se sempre o mesmo produto de PCR entre 550 e 500 bp, acredita-se que houve a formação de estruturas secundárias atribuídas ao alto conteúdo de GC que restringiu à enzima polimerase a se estender em trechos maiores, mesmo acrescentando aditivos como DMSO em concentração final 5% para evitar tais estruturas (MUSSO et al., 2006).

O fragmento amplificado *cosJ* indica que o sistema de efluxo do antibiótico de *S. olindensis* forma parte do sistema de transportador ABC do tipo I, característico em microorganismos produtores de compostos antitumorais. Este sistema está formado por duas proteínas codificadas por genes independentes: um componente do tipo ABC que liga ATP e uma permease, neste caso *cosI* e *cosJ* em *S. olindensis*. Este sistema foi descrito em *S. peucetius* produtor de daunorubicina onde foram identificados os genes *drxA*, *drxB* (MALLA et al., 2010; MENDEZ; SALAS, 2001), as proteínas MtrA e MtrB em *S. argillaceus* (FERNÁNDEZ et al., 1996) e OleC e OleC5 em *S. antibioticus* (RODRIGUEZ et al., 1993).

Figura 19 - Seqüência *contig* obtida da técnica *LDGW-PCR* no cosmídeo p5E11

```

>Cos I
          Iniciador Sp1
ATGGGCGGCGCCGAC CTGGCGATCCAGACCGAAGC TCTGAAGAAGAAATACGGCGACAAGGAGGCCCT
CGCGGGACTCGACCTGGAGGTACCCCGAGGCGTTCGTCTACGGGCTCCTCGGCCCGAACGGCGCCGGAA
AGACCACCGCGGTCCGCATCCTCTCCACCCTGCTGAAGTACGACGAGGGAACAGCCGGGTTCGCCGGC
TACGACGTCGCCACCCAGTCGGCCCAGGTCCGCTACAGCATCGGACTCCTCGGCCAGCACGCCGCAGT
GGACGAGGACCTGAGCGGCCGTCAGAACCCTGTGATGTTTCGGGCGCTTATAACCACATCGGTA AACGCA
ACGCCAGGCCCGGGCCGACGAACTGCTGGAGCGCTTCGGCCTCACCGAGGCCGCCGCAAGCCGGCC
AAGCAGTACTCCGGCGGTATGCGCCGGCGGCTCGACCTCGCCGCCAGCCTCATCCTGGCCCCGTCCGT
GCTGTTCCCTCGACGAGCCCACCACCGGGCTCGACCCGCGGGCCGCAACGACGTCTGGGAGTCCGTCC
GAGGCCTGATCGCCGAGGGCCGCACGGTCTGCTGACCACCCAGTACCTGGAGGAGGCCGACCAGCTC
GCCGACCGCATCGCCCTGATCGACAACGGCAGGGTTCGTCGAGTCCGGCACCCCGGACCAGCTCAAGAA
CAAGATCGGCGGGGACCGGATCGACGTCGTCCTCCGCCGCGCCACGACCTCGAACGCGCCACCCACA
CGATCGGCACCCCTGCTGCGCTCCGAGCCCAGACGGACGCCGACAACCGGCGCATCAGCGTCGTCGTC
GACAACCGGGTCGCCGCCCTCACCGCCGTCGCCCGCAACTCGACGACGCCGGCATCGAGGCC
          Iniciador Sp2
GAGGACATCGCCCTGCGCAGGCCCACTCTC GACGAGGTGTTCTGAACCTGAC CGGCAACGGGGCGGCCAC
          Iniciador Sp3
          >ABC transportador
GTCCGCCGAGCAGAG CCTCAAGGAGGTCGCCAGTC ATGACCGCGATGATCBCGCGGAACTGCCAG
GAACCCGCTGGCCAAACTGGGCTGGGTCTCGCGGACTCCTGGACGCTCACGCTCCGCGGACTGTCCC
ACTGGGCCCCGAACCCACCCAGATCCTGGCCGGCCTCGCCTTCCCGATCCTGATGGTGCTGCTGTTT
GGCGGCATCTTCGGCAGCGGCATGCAGGTCGAGGGCGGCGGGGACTACATGGACTTCTGATGCCCGG
CATGTTTCGTCATGTCGATGGCCTTCGGCATCGGCGAGACCATGGCCGGCGTCACCGCCGACGCCTCCA
AGGGCGTCACCGACCGGTTCCGCTCCATGCCATGTCCGCCGCTCCGTGGTCATCGGGCAGAGCATC
GTCAACATGCTCTACAGCACCGTGGTCCTGATGATCCTCATGGGCTTCGGTCTGGATCGCCAGATT
  
```

\* As setas indicam o local de anelamento dos iniciadores Sp1, Sp2 e Sp3 respectivamente.

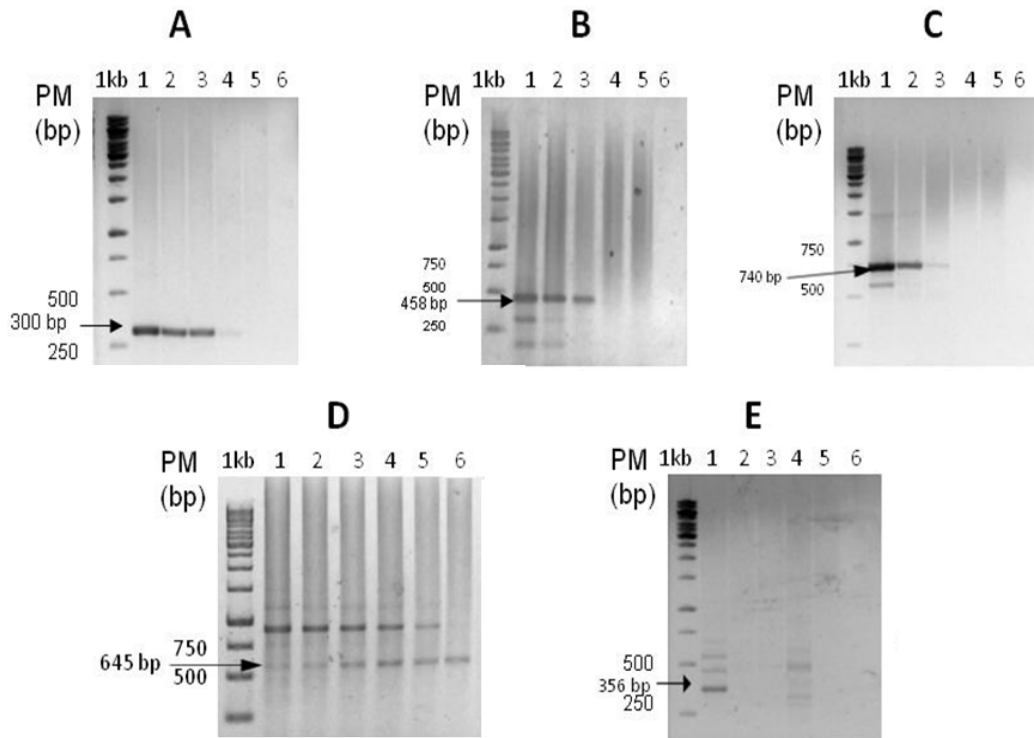
#### 4.1.2 Amplificação de genes biossintéticos por PCR

Os fragmentos gênicos com os tamanhos e funções biossintéticas esperadas foram amplificados nas reações de PCR com os iniciadores degenerados mencionados na seção 3.6.1.1 usando como molde DNA de *S. olindensis* (Figura 20), esta estratégia tem sido utilizada para e identificar genes e *clusters* biossintéticos em diferentes espécies de *Streptomyces* (BLODGETT; ZHANG; METCALF, 2005; METSA-KETELA et al., 2002; RÄTY et al., 2002b; WEBER et al., 2003).

As seqüências de aminoácidos deduzida (APÊNDICE A) indicam que o fragmento CycW apresenta 72% de identidade com o produto da proteína ciclase policetídica de *S. nogalater*; CychH, 82% de identidade à ciclase metilaclanônica de *S. purpurascens* (RdmA); à seqüência Met, 65% de identidade com a proteína AknG de *S. galilaeus*; a seqüência Keto, 94% de identidade com a cetoreductase policetídica de *S. purpurascens* (RdmJ) e finalmente CosM mostra 100% de

identidade com o gene *cosM* de *S. olindensis*. Dado que todas as seqüências mostraram similaridade com genes de vias biossintéticas de antraciclinas do tipo pKS tipo II, se inferiu que tais fragmentos formavam parte do *cluster* CosD como se confirmou posteriormente com o seqüenciamento do genoma da bactéria.

Figura 20 - Produtos de amplificação obtidos com iniciadores degenerados



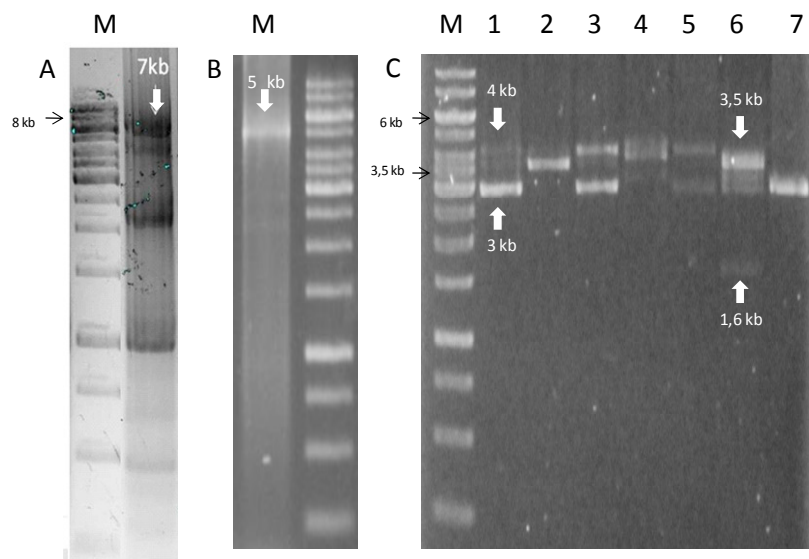
(A) *CosM* (B) *CycW* (C) *Keto* (D) *Met* (E) *CycH* no genoma de *S. olindensis* sob gradiente em temperatura de anelamento; caneta (1) 62°C. (2) 64,3°C. (3) 66,4°C. (4) 68,6°C. (5) 70,1°C (6) 72,2°C. Marcador de peso 1kb DNA ladder. (ver seção 3.6.1)

Visando amplificar os genes completos foram realizadas reações de PCR com as condições padronizadas, desta vez usando DNA dos clones p5E11 e p2C4 da biblioteca genômica de *S. olindensis*; este último mostrou hibridizar com sondas para policetídeos, não obstante, como resultado se observou que não houve amplificação com os iniciadores relatados o que indicou a ausência desses genes nesses cosmídeos. Adicionalmente foram realizadas reações de *Long distance* PCR como se especifica a continuação na tentativa de amplificar trechos longos de DNA contendo vários dos genes usando DNA genômico como molde.

#### 4.1.3 Long distance PCR no genoma de *S. olindensis*

Através desta abordagem se consideraram os *clusters* biossintéticos de antraciclinas pKS do tipo II como a aclacinomicina produzida por *S. galilaeus* que mostrou semelhanças em sua seqüência com a cosmomicina D e o agrupamento da nogalamicina produzida por *S. nogalater* que serviram como ponto de comparação para assumir a possibilidade dos genes codificantes para as enzimas ciclases estarem numa distância entre 4 a 7 kb do gene *cosM* (cetoreductase) de *S. olindensis*. Após a padronização das reações, foram amplificados os fragmentos dos tamanhos esperados os quais foram estudados através de construção de uma biblioteca; onde se recuperaram 19 clones e selecionaram-se os clones B1 e B5 como portadores de uma banda de  $\approx 7$ kb (reação de PCR realizada com os iniciadores CycH-F e CosM-R, ver seção 3.6.2), e o clone C2 contendo um fragmento de  $\approx 5$ kb, fragmento amplificado com os iniciadores CycW-3F e Csm-3R (Figura 21). Estes clones iam ser seqüenciados pelos extremos com os iniciadores do vetor comercial pJET1.2, porém, com a disponibilização da seqüência proveniente do seqüenciamento do genoma *S. olindensis* foi priorizada a análise desta informação onde se identificou o *cluster* biossintético completo.

Figura 21 - Produto de amplificação de Long PCR no genoma de *S. olindensis*



M, marcador de 1kb (A) Banda de 7kb obtida com iniciadores CycW-F e CosM-R. (B) Banda de 5kb obtida com iniciadores CycW-3F e Csm-3R (C) Digestão dos clones com a enzima de restrição *BglI* (1-5) clones B1-B5 (6-7) clone C2- C3. Gel de agarose 0,8%.

#### 4.1.4 Descrição do *cluster* biossintético cosmomicina D e análise da seqüência

Como descrito acima, se verificou que as técnicas de “*Genome walking*” e PCR empregadas para obtenção de fragmentos do *cluster* cosD, geraram resultados preliminares positivos, no entanto, podemos afirmar que tais avanços foram modestos, mesmo observando que tais seqüências encontravam-se dentro do *cluster*, indicando o acerto e o planejamento das ações inicialmente previstas.

Com disponibilização da informação do genoma de *S. olindensis*, se identificou o *cluster* biossintético da cosmomicina D através do alinhamento da seqüência descrita por Garrido (2005) com os *contigs* gerados; foi observada uma correspondência total dos 14kb com uma região do *contig* 5. Análises com os algoritmos e ferramentas bioinformáticas descritas na seção 3.6.4.2 permitiram identificar uma região de 43129 bp contendo o agrupamento gênico de interesse; a qual apresenta um conteúdo de GC de 72,2%; este *cluster* é considerado um dos maiores até hoje descritos dentro do grupo das antraciclinas atingindo um tamanho semelhante ao descrito à daunomicina de 40 kb (VASANTHAKUMAR; KATTUSAMY; PRASAD, 2013). A análise de G+C feita com FRAMEPLOT para a seleção das ORF permitiu selecionar 40 quadros de leitura aberta com base na análise da terceira posição dos códons, permitindo escolher aquelas como uma linha de corte acima do 75%, como descrito por Bibb e Wright (1992) que atribuem percentagens GC de até 90% aos genes em *Streptomyces*.

Observa-se que o tamanho médio das ORF's é de 1051 nucleotídeos; sendo a maior a ORF 17 com 3574 nucleotídeos e sua proteína correspondente com 761 a.a codificando uma possível proteína de resistência ao antibiótico do tipo “UvrA-like” homóloga ao gene *drrC*. A menor ORF é a 53, com um tamanho de 223 nucleotídeos codificando uma proteína de 84 a.a., que correspondente à proteína carregadora de acilas da cetosintase mínima. As similaridades das seqüências com outras antraciclinas sugerem que a região 5' do *cluster* esteja delimitada pela ORF 56 e pelo extremo 3' com a ORF 16, prováveis oxidoredutases.

Os genes descritos apresentam como códon iniciador típico ATG; 14 deles têm como códon alternativo GTG e só um TTG, um códon raro dentro dos estreptomicetes, que representa ao redor de 3% dos genes descritos em *Streptomyces coelicolor* (HUTCHINGS et al., 2006). As seqüências assinaladas

como prováveis RBSs foram localizados manualmente através da seqüência consenso aGGA(g/c)G (STROHL, 1992) de modo que complementassem a seqüência do hexâmero UCCUCC da região 3' do rRNA 16' de *Streptomyces* e se observou que as distâncias encontradas variaram entre -5 e -18 pb como se apresenta na Tabela 7.

Tabela 7 - Sítios de ligação ao ribossomo das novas ORF

Gene	Códon iniciador	Distância	Provável RBS
ORF 16	ATG	-10	AGGAG
ORF 17	GTG	-11	AGAGGA
ORF 18	ATG	-18	GAACC
ORF 19	ATG	-16	AGGAGG
<i>cosI</i>	ATG	-13	AGAAGG
<i>cosH</i>	GTG	-14	AGGACG
<i>cosG</i>	GTG	-12	AGGAG
<i>cosT</i>	ATG	-11	AGGACG
<i>cosF</i>	ATG	-10	GGAGG
<i>cosE</i>	GTG	-11	GGACG
<i>cosC</i>	ATG	-10	GGCGG
<i>cosB</i>	ATG	-9	GGAGG
<i>cosX</i>	ATG	-13	GGACG
<i>cosY</i>	GTG	-12	AGGACG
<i>cosS</i>	ATG	-12	AGCAGG
<i>cosK</i>	ATG	-10	AGGGG
<i>cosL</i>	ATG	-17	GGACG
<i>cosM</i>	ATG	-9	AGCACG
ORF 34	ATG	-9	GGAGG
ORF 35	ATG	-15	GGAGG
ORF 36	ATG	-11	GGAG
ORF 37	GTG	-11	AGGAGG
ORF 38	ATG	-11	GGAGG
ORF 39	ATG	-5	GG
ORF 40	ATG	-9	AGGAG
ORF 41	ATG	-16	AGGGG
ORF 42	GTG	-12	AGGGG
ORF 43	ATG	-13	AGGAGG
ORF 44	TTG	-11	GG
ORF 45	ATG	-8	GGA
ORF 46	ATG	-10	GAGG
ORF 47	GTG	-15	AGGGG
ORF 48	ATG	-12	AGGGA
ORF 49	GTG	-8	GGA
ORF 50	GTG	-12	GGAG
ORF 51	ATG	-15	GAG
ORF 52	GTG	-8	GGGGG
ORF 53	GTG	-15	GGAGG
ORF 54	GTG	-11	AGGAGG
ORF 55	GTG	-14	GGA
ORF 56	ATG	-11	GGGG/AGGG
Consenso		-5 a-18	aGGA(G/C)G
rRNA 16S 3'-OH			UCCUCCAC



O estudo destes sítios, abordados através da engenharia de RBS em estreptomicetes tem sido pouco explorada em comparação aos trabalhos desenvolvidos em *E. coli* (SALISSET et al., 2009), no entanto, RBSs de proteínas que são altamente expressas, como por exemplo as proteínas ribossomais, foram usados por Takano et al.,(2009) junto com RBSs sintéticos sob a seqüência AAGGAGG, implementada com sucesso (BUNET et al., 2011).

Os genes que podem ser transcritos como um operon por ter sua tradução acoplada devido à sobreposição entre os códons de término e de início das suas seqüências ou por estarem separados por 20 ou menos pares de bases de DNA (NORMARK et al., 1983; PRICE; ARKIN; ALM, 2006) anotados manualmente com o programa ARTEMIS são: operon 1, formado pelo genes: *cos I*, *cosJ*, *cosH* e *cosG*; operon 2: *cos X*,*B*,*C*,*E* e *F*; operon 3: *cosL*, *cosM* e a ORF-34; operon 4: ORF 36 e a ORF 35; operon 5: ORF 44, ORF 43, ORF 42, ORF 41, ORF 40; operon 6: ORF 49, ORF 48 e a ORF 47.

A determinação de seqüências promotoras é dificultada pelo grande número de promotores sigma, mas também são observados outros tipos de promotores como *ihf*, *crp*, *rpD17*. Esta grande variedade de possibilidades na regulação gênica no nível transcricional está associada com a diversidade de condições ambientais às quais o microorganismo deve responder produzindo diferentes tipos de enzimas, além das envolvidas na síntese de metabólitos secundários (GARRIDO, 2005). Experimentos de manipulação das seqüências promotoras utilizando experimentos clássicos podem ser realizados como mapeamento de baixa e alta resolução com nuclease S1, para determinar o ponto exato de transcrição.

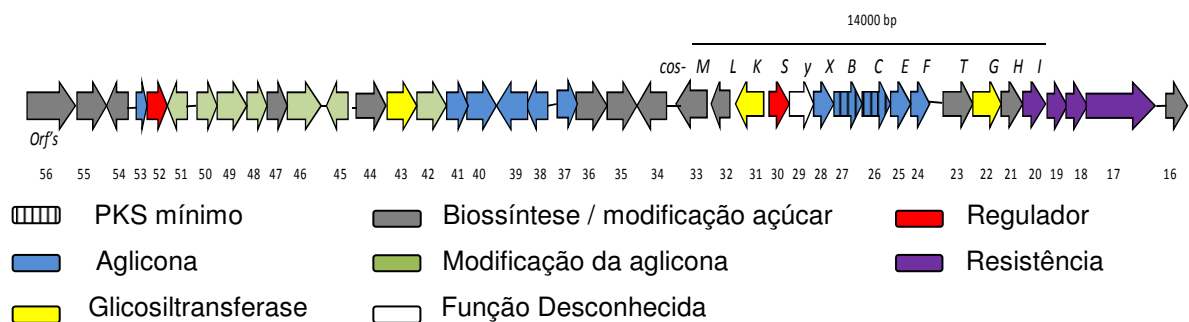
As principais funções gênicas do cluster *cosD* foram estabelecidas com base em comparações com as bases de dados do NCBI e PFAM como se apresenta na Tabela 8 o que permitiu agrupar os genes em várias categorias: genes envolvidos na biossíntese da aglicona, biossíntese pós-PKS, modificação da aglicona, biossíntese de açúcares, glicosiltransferases, genes de resistência e genes com função desconhecida permitindo complementar a via biossintética proposta por Garrido et al.,(2006). A organização do *cluster* cosmomicina D está representado na Figura 22; adicionalmente se coletou informação hipotética e experimental de genes de vias biossintéticas de antraciclinas pKS do tipo II descritos na literatura e bases de dados de seqüências para inferir a função hipotética dos genes da *cosD* como se apresenta

nas tabelas 8 e 9.

#### 4.1.4.1 Genes envolvidos na formação do ácido aclinônico

A síntese do esqueleto policetídeo da *cosD* começa com a condensação de um propionato (unidade iniciadora) e 9 acetatos provenientes de malonil CoA, em reações repetitivas de Claisen até formar um decacétido de 21 carbonos envolvendo um conjunto de genes que formam o PKS mínimo; estimulado pela formação do heterodímero (KS $\alpha$  e KS $\beta$ )-ACP (GARRIDO, 2005). O minPKS (Figura 23A) está formado pelos genes *cosB* e *cosC* que codificam as subunidades KS- $\alpha$  e KS- $\beta$  da enzima cetosintase e a proteína ACP (ORF 53) que se encontra a 35 kb da região a montante das cetoacil sintases; distância pouco usual dentro dos agrupamentos gênicos de antraciclinas PKS do tipo II, uma vez que tem sido descritos em regiões conservadas, embora também se reportou no minPKS da doxorubicina em *S. peucetius* (LOMOVSKAYA et al., 1999). Os genes *cosE* (codifica a unidade iniciadora de propionato) e *cosF* (codifica a ACP aciltransferase) homólogos aos genes *dpsC* e *dpsD* no *cluster* da doxorubicina e *aknE2* e *aknF* no *cluster* da aclacinomicina em *S. galilaeus* seriam fatores de fidelidade que desempenham um papel importante na seleção da unidade de propionato como unidade iniciadora (GRIMM et al., 1994).

Figura 22 - Organização do cluster gênico da cosmomicina D



A direção das setas representa o sentido de transcrição.

Com a formação do esqueleto policetídeo, as próximas reações envolvem a ação de uma cetoreductase (KR), codificada pela ORF 41 (Figura 23B) homologa à proteína DpsE do *cluster* da doxorubicina envolvida na redução do C9 do decacético da doxorubicina (HUTCHINSON, 1997; LOMOVSKAYA et al., 1999). A alta identidade de estas proteínas entre 39-80% sugere que compartilham o mesmo padrão de dobramento. Também foi visto que o sítio catalítico das KR está formado por uma téttrade Asn114-Ser144-Tyr157-Lys161, descrita como uma região conservada que permite um mecanismo catalítico específico para esta classe de enzimas (KORMAN et al., 2004).

Tabela 8 – Função deduzida dos genes do *cluster* cosmomicina D

(continua)

Gene	Função Hipotética	Posição no cluster (n. de nt)	Número de a.a	Maiores similaridades Identidade % (* Blast p)
ORF 16	Oxidoreductase	19150-19880 (1011)	276	Oxidoreductase - <i>S. chartreusis</i> , 95%
ORF 17	Proteína de resistência ao antibiótico do tipo "UvrA-like"	20204-22489 (3574)	761	Proteína transportadora do tipo ABC <i>S. zinciresistens</i> , 88% / proteína tipo UvrA <i>S. globisporus</i> , 62%.
ORF 18	Glutathione peroxidase	22543-23025 (612)	166	Glutathione peroxidase - <i>S. zinciresistens</i> 75%
<i>cosJ</i>	Proteína de membrana do transportador ABC- Resistência ao antibiótico	23194-24024 (1290)	276	Transportador ABC - <i>S. zinciresistens</i> , 91%
<i>cosI</i>	Proteína de ligação à ATP do transportador ABC – Resistência ao antibiótico	24021-25082 (1485)	353 329*	Proteína transportadora do tipo ABC / ATP binding - <i>S. zinciresistens</i> , 94%
<i>cosH</i>	dTDP-glicose 4,6 desidratase	25086-26069 (1469)	327	dTDP-glicose 4,6 desidratase - <i>S. violaceus</i> , 95%
<i>cosG</i>	Glicosiltransferase	26092-27372 (1809)	426	RhoG glicosiltransferase - <i>S. violaceus</i> , 96%
<i>cosT</i>	Proteína auxiliar de glicosiltransferase	27407-28657 (1753)	416	RhoF - <i>S. violaceus</i> , 74%
<i>cosF</i>	Aciltransferase para unidade iniciadora de síntese	28801-29850 (1078)	349	AknF- <i>S. galilaeus</i> , 68% / acila transferase - <i>S. zinciresistens</i> , 74%
<i>cosE</i>	Cetosintase para unidade iniciadora de síntese	29847-30881 (922)	344	3-oxoacil-ACP sintase- <i>S. zinciresistens</i> , 74%
<i>cosC</i>	Cetosintase subunidade	30878-32122 (1474)	414	AknC - <i>S. galilaeus</i> , 66% / beta-cetoacil sintase <i>S. zinciresistens</i> 83%
<i>cosB</i>	Ceto sintase subunidade	32119-33387 (1773)	422	AknB - <i>S. galilaeus</i> , 73%/ beta-cetoacil sintase- <i>S. zinciresistens</i> , 96%
<i>cosX</i>	Mono-oxigenase	33384-33719 (404)	111	AknX - <i>S. galilaeus</i> , 57% / mono-oxigenase <i>S. zinciresistens</i> , 74%
<i>cosY</i>	Função desconhecida	33836-34813 (1035)	325	Ornitina ciclodeaminase - <i>Burkholderia</i> sp , 40% / <i>S. zinciresistens</i> , 56%
<i>cosS</i>	Possível regulador transcricional da família Pad-R	34921-35484 (810)	187	AclS - <i>S. galilaeus</i> , 54 % / regulador transcricional PadR - <i>S. zinciresistens</i> , 84%
<i>cosK</i>	Glicosiltransferase	35731-37034 (1734)	430	AknK - <i>S. galilaeus</i> ,65%/ glicosiltransferase <i>S. zinciresistens</i> , 78%
<i>cosL</i>	dTDP-4-hexose 3,5 epimerase	37085-37723 (801)	212	dTDP-4-dehidroramnose 3,5 epimerase <i>S.</i> <i>zinciresistens</i> , 78%
<i>cosM</i>	epimerase/desidratase NAD dependente	37732-38694 (1012)	320	Epimerase /desidratase NAD- dependente <i>S. zinciresistens</i> , 74% / SnogG - <i>S.</i> <i>nogalater</i> , 54%

Tabela 8 - Função deduzida dos genes do *cluster* cosmomicina D (conclusão)

Gene	Função Hipotética	Posição no cluster (n. de nt)	Número de a.a	Maiores similaridades Identidade % (* Blast p)
ORF 34	NDP-hexose 2,3-desidratase	38691-40136 (1797)	481	NDP-hexose 2,3-dehidratase <i>S. zinciresistens</i> , 74% SnogH - <i>S. nogalater</i> , 61%
ORF 35	NDP-deoxihexose 3-aminotransferase	40223-41332 (1421)	369	Glutamina transaminase <i>S. zinciresistens</i> , 87% / AclZ - <i>S. galilaeus</i> , 72%
ORF 36	Metiltransferase	41329-42057 (765)	242	Metiltransferase - <i>S. zinciresistens</i> 88%
ORF 37	Ciclase	42128-42907 (1026)	259	Ciclase <i>S. zinciresistens</i> , 88% / <i>S. steffisburgensis</i> , 73% / <i>S. nogalater</i> , 72%
ORF 38	Ciclase	43056-43493 (388)	145	Fator 2 de transporte nuclear - <i>S. zinciresistens</i> 68% / AknV- <i>S. galilaeus</i> , 58%
ORF 39	Cetoreductase	43503-44249 (910)	248	Desidrogenase/ reductase- <i>S. zinciresistens</i> 78% / SnoaF C-7 cetoreductase- <i>S. nogalater</i> , 67%
ORF 40	Aromatase	44337-45695 (1598)	452	RdmK - <i>S. purpurascens</i> , 90%
ORF 41	Cetoreductase	45704-46489 (1196)	261	RdmJ- <i>S. purpurascens</i> , 94% AknA- <i>S. galilaeus</i> , 77%
ORF 42	NDP-hexose-3,4-desidratase	46497-47798 (1823)	433	RdmI- <i>S. purpurascens</i> , 95%
ORF 43	Glicosiltransferase	47810-49129 (1658)	439	RdmH - <i>S. purpurascens</i> , 92%
ORF 44	Proteína acessória P-450	49126-50298 (1128)	390	RdmG - <i>S. purpurascens</i> , 83%
ORF 45	Cetoreductase	50428-51462 (994)	344	RdmF - <i>S. purpurascens</i> , 94%
ORF 46	Aclavinona-11 hidroxilase	51719-53314 (2044)	531	RdmE - <i>S. purpurascens</i> , 91%
ORF 47	Metiltransferase	53358-54101 (950)	247	RdmD - <i>S. purpurascens</i> , 87%
ORF 48	10-carbometoxi-13-deoxicarminomicina esterase	54104-55000 (1209)	298	RdmC - <i>S. purpurascens</i> , 95%
ORF 49	Hidroxilase do carbono 10 da aglicona	55005-56108 (1189)	367	RdmB - <i>S. purpurascens</i> , 90%
ORF 50	Ciclase do ácido aclanônico metil Ester	56150-56557 (572)	135	RdmA - <i>S. purpurascens</i> 98%
ORF 51	Metil transferase para ácido aclanônico	56868-57632 (777)	254	AknG - <i>S. galilaeus</i> , 66% SnoaC - <i>S. nogalater</i> , 69%
ORF 52	Regulador transcricional da família SARP	57719-58438 (771)	239	Regulador SARP - <i>S. zinciresistens</i> AknI- <i>S. galilaeus</i> , 65%
ORF 53	Proteína carreadora de acila	58759-59013 (223)	84	AknD unidade carregadora de acilas (ACP)- <i>S. galilaeus</i> , 54%
ORF 54	Glicose-1-fosfato timidiltransferase	59300-60175 (1114)	291	Glicose-1-fosfato timidiltransferase- <i>S. zinciresistens</i> 85%/ AclY- <i>S. galilaeus</i> , 73%
ORF 55	Oxidoreductase	60328-61092 (942)	284	Aldo/ceto reductase – <i>S. zinciresistens</i> , 85%
ORF 56	Oxidoreductase	61119-62729 (2060)	536	Domínio berberine - <i>S. zinciresistens</i> AclO <i>S. galilaeus</i> , 63%

O fechamento do primeiro anel aromático para formar a aglicona da cosmomicina requer da enzima aromatase (ARO) codificada pela ORF 40 (Figura 23C), homóloga com a aromatase RdmK do cluster rodomicina em *S. purpurascens*;

o segundo e terceiro anel são fechados por enzimas ciclases (CYC); ORF 37 (Figura 23D) análoga a SnoaM de *S. nogalater* e AknW de *S. galilaeus* (HAUTALA et al., 2003). CosX formaria o anel quinona presente na cosmomicina (GARRIDO et al., 2006) promovendo a reação de oxigenação do carbono 12 para formar ácido aclanônico (Figura 23E) (CHUNG et al., 2002), como foi descrito para a proteína AknX da aclacinomicina em *S. galilaeus* (RÄTY et al., 2002b).

#### 4.1.4.2 Genes envolvidos em reações pós-PKS para a formação da aglicona

Uma vez formado o ácido aclanônico, este substrato sofre subseqüentemente uma série de modificações promovidas pelo conjunto de enzimas referido como enzimas pós-PKS (KENDREW et al., 1999). A primeira reação envolve uma metiltransferase (MET) codificada pela ORF 51 (Figura 23F) homóloga à proteína AknG em *S. galilaeus*, responsável pela esterificação do grupo carboxila do ácido aclanônico (RÄTY et al., 2002). O substrato metilado, o ácido aclanônico metil éster é alvo de uma enzima ciclase (CYC) codificada pela ORF 50 (Figura 23G), proteína que mostra uma alta homologia com RdmA, ciclase de *S. peuceitius* (98% de identidade) que fecha o quarto anel aromático formando aclaviketona; como foi descrito para ciclases relacionadas como AknH do cluster akn- em *S. galilaeus* (NIEMI; MÄNTSÄLÄ, 1995).

Tabela 9 – Genes envolvidos na biossíntese de antraciclinas PKS tipo II

(continua)

Categoria	Função gênica	<i>cos</i> - Cosmomicina <i>S. olindensis</i>	<i>sno</i> - Nogalamicina <i>S. nogalater</i>	<i>akn</i> - Aclacinomicina <i>S. galilaeus</i>	<i>dau/dnr</i> - dauno/doxorubicina <i>S. peuceitius</i>	<i>rdm</i> - Rodomicina <i>S. purpurascens</i>
<b>Biossíntese policetídeo</b>	Min PKS KS- $\alpha$	<i>cosB</i>	<i>snoa 1</i>	<i>aknB</i>	<i>dpsA</i>	
	Min PKS KS- $\beta$	<i>cosC</i>	<i>snoa2</i>	<i>aknC</i>	<i>dpsB</i>	
	ACP para PKS mínimo	ORF 53	<i>snoa3</i>	<i>aknD</i>	<i>dpsG</i>	
	Unidade iniciadora propionato	<i>cosE</i>		<i>aknE2</i>	<i>dpsC</i>	
	ACP aciltransferase	<i>cosF</i>		<i>aknF</i>	<i>dpsD</i>	
	Cetoreductase (KR)	ORF 41	<i>snoaD</i>	<i>aknA</i>	<i>dpsE</i>	<i>rdmJ</i>
	Aromatase	ORF 40	<i>snoaE</i>	<i>aknE1</i>	<i>dpsF</i>	<i>rdmK</i>
<b>Biossíntese Pós-policetídeo</b>	Ciclase	ORF 37	<i>snoaM</i>	<i>aknW</i>	<i>dpsY</i>	
	oxigenase	<i>cosX</i>	<i>snoaB</i>	<i>aknX</i>	<i>dnr/dauG</i>	
	Metiltransferase	ORF 51	<i>snoaC</i>	<i>aknG</i>	<i>dnrG/dauG</i>	
	Ciclase	ORF 50	<i>snoaL</i>	<i>aknH</i>	<i>dnrC/dauD</i>	<i>rdmA</i>
	cetoreductase	ORF 39	<i>snoaF</i>	<i>aknU</i>	<i>dnrE/dauE</i>	<i>rdmL</i>
<b>Modificação da aglicona</b>	C11 hidroxilase	ORF 46				<i>rdmE</i>
	Esterase	ORF 48				<i>rdmC</i>
	C1 hidroxilase		<i>snoaL2</i>	<i>aclR</i>		
	C10-hidroxilase	ORF 49				<i>rdmB</i>

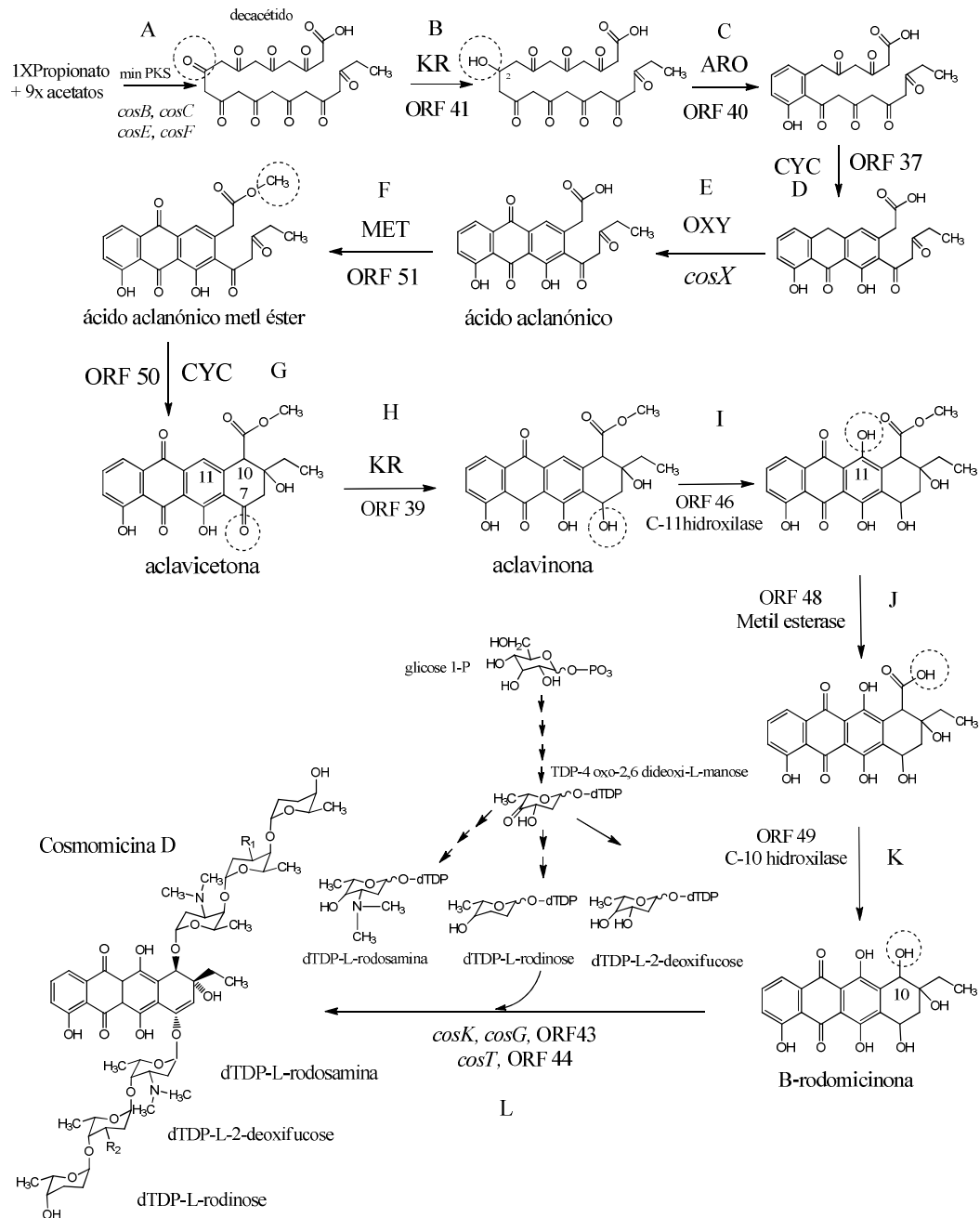
Tabela 9 - Genes envolvidos na biossíntese de antraciclinas PKS tipo II (conclusão)

<b>Categoria</b>	<b>Função gênica</b>	<i>cos</i> - Cosmomicina <b>S.</b> <i>olindensis</i>	<i>sno</i> - Nogalamicina <b>S.</b> <i>nogalater</i>	<i>akn</i> - Aclacinomicina <b>S.</b> <i>galilaeus</i>	<i>dau/dnr</i> - dauno/doxorubicina <b>S.</b> <i>peucetius</i>	<i>rdm</i> - Rodomicina <b>S.</b> <i>purpurascens</i>
<b>Deoxi- Açúcares</b>	TDP-glicose sintase	ORF 54	<i>snogJ</i>	<i>aclY/aknY</i>	<i>dnmL</i>	
	4,6-dehidratase	<i>cosH</i>	<i>snogK</i>	<i>aknR</i>	<i>dnmM</i>	
	2,3-dehidratase	ORF 34	<i>snogH</i>	<i>aknN/aclN</i>	<i>dnmT</i>	
	Aminotransferase	ORF 35	<i>snogI</i>	<i>aknZ/aclZ</i>	<i>dnmJ</i>	
	3,5-epimerase	<i>cosL</i>	<i>snogF</i>	<i>aknL</i>	<i>dnmU</i>	
	4-cetoreductase	<i>cosM</i>	<i>snogG/snogC</i>	<i>aknM/aclM</i>	<i>dnmV</i>	
	Aminometilase	ORF 36/47	<i>snogA/snogX</i>	<i>aknX2/aclP</i>		<i>rdmD</i>
	3-cetoreductase	ORF 45		<i>aknQ</i>		<i>rdmF</i>
	3-dehidratase	ORF 42		<i>aknP</i>		<i>rdmI</i>
	C-metiltransferase		<i>snogG2</i>			
	O-metiltransferase		<i>snogY</i>			
	O-metiltransferase		<i>snogL</i>			
	O-metiltransferase		<i>snogM</i>			
	P450-like , Ativação GTF	ORF 44 <i>cosT</i>	<i>snogN</i>	<i>aknT</i>	<i>dnrQ/dnmQ</i>	<i>rdmG</i>
Glicosiltransferases	<i>cosK, cosG</i> ORF 43	<i>snogE/snogZ</i>	<i>aknS</i>	<i>dnmS</i>	<i>rdmH</i>	
Oxidoreductase	ORF 56		<i>aclO/aknOx</i>			
<b>Reguladores</b>	Regulador PadR	<i>cosS</i>		<i>aclS</i>		
	Regulador SARP	ORF 52		<i>aknO</i>	<i>dnrI / dauI</i>	
	Autoregulador				<i>dnrO/dauO</i>	
	Pseudo regulador				<i>dnrN</i>	
<b>Resistência</b>	Ativador transcricional		<i>snorA</i>	<i>akn/aclI</i>		
	Transportador ABC/ATP binding	<i>cosI</i>			<i>drrA</i>	<i>rhol</i>
	ABC transportador	<i>cosJ</i>				
	Glutamina peroxidase	ORF 18				
	Transportador ABC	ORF 17	<i>snoO</i>		<i>drrC</i> <i>drrB</i> <i>drrD</i>	
<b>Desconhecida</b>	Ornitina desaminase	<i>cosY</i>				
	Oxidoreductase putativa	ORF 38		<i>aknV</i>	<i>dpsH/dnmW</i>	
	Oxidoreductase	ORF 16				
	Aldo/cetoreductase	ORF 55				
	Hidroxilase putativa		<i>snoW</i>	<i>aclQ</i>		

Fonte: adaptado de (METSÄ KETELÄ et al., 2008)

Seguidamente à reação de ciclização ocorre uma reação de redução do grupo ceto do C7 da aclaviketona para formar aclavinona, envolvendo a enzima cetoreductase codificada pela ORF 39 (Figura 23H) análogo com os genes *snoaF*, *aknU*, *rdmL* (Tabela 9).

Figura 23 - Via biossintética da cosmomicina D



Fonte: Modificado de Garrido et al.(2006).

#### 4.1.4.3 Genes envolvidos na modificação da aglicona

Com a aclaviketona reduzida a aclavinona, em seguida ocorre uma preparação para que o C10 possa ser atacado pelas enzimas glicosiltransferases, porém a enzima aclavinona hidroxilase (ORF 46) adiciona um grupo hidroxila na posição 11 da aclavinona (Figura 23I); está ORF codifica uma proteína de 531 aminoácidos

homóloga à enzima RdmE, que hidroxila a clavinona para formar precursores  $\epsilon$ -rodomicinona da daunorubicina, doxorubicina e rodomicinas (NIEMI et al., 2002).

O substrato hidroxilado, faz com que uma metil-esterase (ORF48) promova uma reação de carboxilação no C10, adicionando um grupo carboxila (Figura 23J), de forma similar se observou com a proteína metilesterase RdmC (identidade de 95%) responsável pela hidrólise do grupo carboximetila do esqueleto da aglicona na aclacinomicina (JANSSON et al., 2003a). Finalmente, a formação da  $\beta$ -rodomicinona requer de uma proteína homóloga a RdmB; a ORF 49 proteína de 298 a.a, capaz de retirar o grupo carboxila do C10 e posteriormente colocar uma hidroxila nesta posição (Figura 23K). RdmB foi descrita por remover o grupo carboxila do carbono C-10 do substrato 15-demetoxiaclacinomicina T na aclacinomicina (JANSSON et al., 2003b).

#### 4.1.4.4 Genes envolvidos na biossíntese de desoxiaçúcares

A cosmomicina D tem duas cadeias de trissacarídeos ligados ao carbono da posição 7 e 10 do anel D, formada pelos desoxiaçúcares: L-rodosamina, 2-desoxy-L-fucose e L-rodinose; a biossíntese de estes açúcares depende da formação de um intermediário comum; o substrato TDP-4-ceto-6-desoxi-D-glicose formado a partir de glicose-6-P e a ação de diferentes enzimas que determina como os três açúcares são arquitetados.

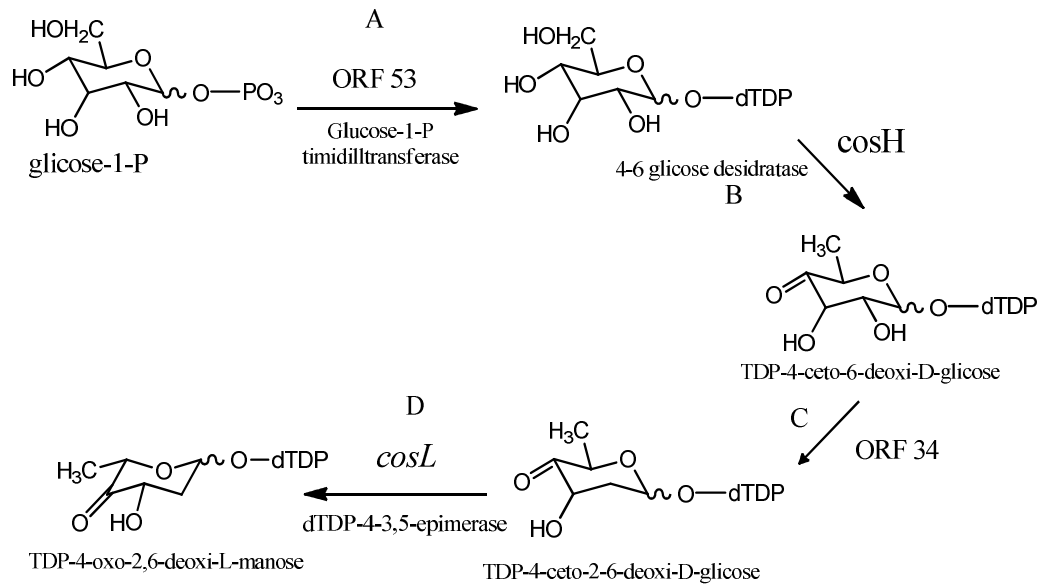
Na etapa inicial a glicose-1-P é ativada pela transferência de uma timidina difosfato ao C1 por meio da enzima glicose-1-P-timidiltransferase (TTP), codificada pela ORF 54 (Figura 24A) descrita analogamente nos genes *snogJ*, *aknY*, *dnmL* (Tabela 9) que catalisam um passo característico na via das desoxihexosas (RATY et al., 2002a). Na seqüência, o açúcar ativado sofre a ação NDP-hexosa 4,6 desidratases (*cosH*) que forma a 6-desoxihexose com um grupo ceto na posição 4 do açúcar TDP-4-ceto-6-desoxi-D-glicose (Figura 24B).

Em *S. olindensis*, é retirada deste açúcar uma hidroxila do carbono 2, formando TDP-4-ceto-2-6-didesoxi-D-glicose, este é o substrato da enzima 3-5 epimerase (*cosL*) que promove a mudança da conformação do açúcar da forma D para L (Figura 24C), formando o último intermediário comum da biossíntese dos 3 açúcares presentes nas moléculas de cosmomicinas TDP-4-oxo-2,6-didesoxi-L-



manose (Figura 24D) (GARRIDO et al., 2006).

Figura 24 - Biossíntese dos açúcares Parte I



Formação do intermediário TDP-4-oxo-2,6-deoxi-L-manose

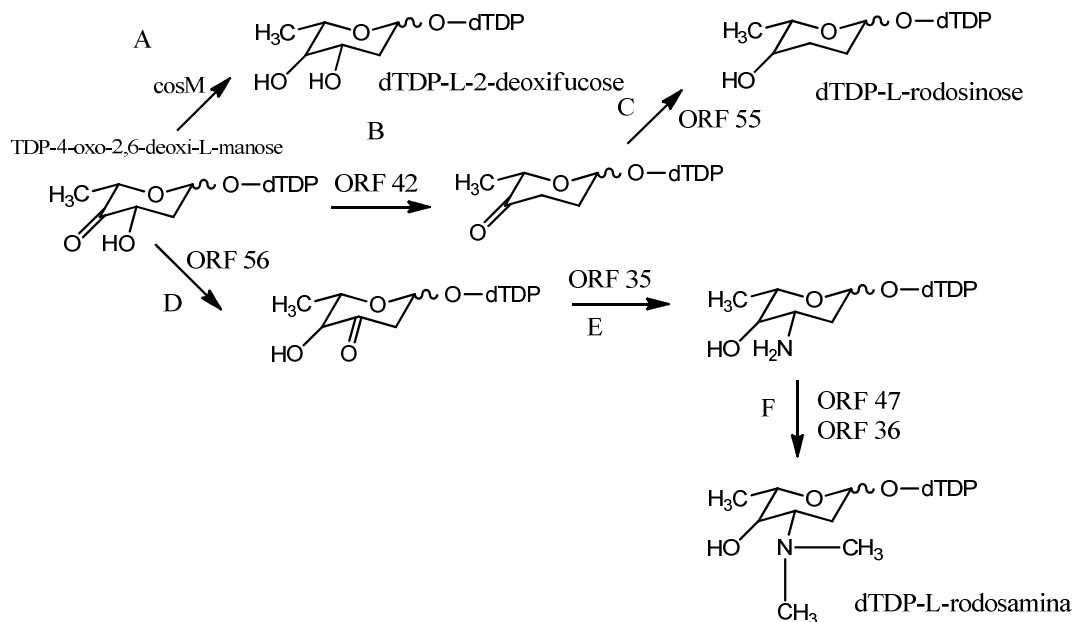
Com a formação desse intermediário pode-se sintetizar L-2-desoxi-fucose diretamente da redução do grupo ceto do carbono 4. Esta reação é mediada pela proteína codificada pelo gene *cosM* semelhante às 4-cetoreduções da via biossintética da nogalamicina SnogG e aclacinomicina AknM (RÄTY et al., 2002).

Na formação de L-rodinose deve ser retirada a hidroxila do carbono 3, formando uma L-4-ceto-2,3,6-tridesoxi-hexose, antes da redução do grupo ceto o carbono 4 (Figura 25B,C,D). O grupo de genes envolvidos nas reações biossintéticas da rodinose são: a ORF 42, desidratase dTDP-hexose 3-dehidratase com função similar à proteína AknP na formação de rodinose na aclacinomicina (Räty et al., 2002), o gene *cosM* e a ORF 55, cetoreduções com capacidade de reduzir o grupo ceto do C4.

A síntese de rodosamina é um pouco mais complexa, havendo primeiramente a necessidade de uma isomerização envolvendo os carbonos 3 e 4, seguida por uma transaminação do grupo ceto que agora se encontra no carbono 3. Na seqüência está amina é dimetilada formando L-rodosamina (Figura 25D, E, F). Os genes descritos para estas reações são a ORF 56 e ORF 16 (oxidoreduções), a

ORF 35 (aminotransferase) análoga à proteína AknZ, reportada na biossíntese da rodosamina em aclacinomicina (RATY et al., 2002a) e finalmente as reações de dimetilação estão associadas com as proteínas codificadas pela ORF 47 homóloga à enzima RdmD, metiltransferase que catalisa a N-metilação dos açúcares na rodomicina (JANSSON, 2004) e ORF 36, metiltransferase cuja provável função esteja vinculada aminometilação (GARRIDO, 2005).

Figura 25 - Biossíntese de açúcares parte II



Formação dos deoxiaçúcares dTDP-L-2-deoxifucose, dTDP-L-rodosinose e dTDP-L-rodosamina

#### 4.1.4.5 Glicosiltransferases

A modificação mais importante da aglicona consiste na glicosilação, já que o padrão de açúcares determina a atividade antitumoral e antibiótica das antraciclinas; as enzimas glicosiltransferases identificadas em CosD, correspondem às proteínas CosG, CosK e ao produto da ORF 43. A função de CosK e CosG foi determinada através de experimentos de nocaute por Garrido (2005) sugerindo que dTDP-L-rodosamina é ligado seqüencialmente ao grupo hidroxila no carbono C-7 e C-10 por CosG, seguido da transferência de dTDP-L-2-desoxifucose por CosK. A terceira glicosiltransferase estaria envolvida na adição de L-2-desoxifucose ou L-rodosinose formando a cadeia trissacarídica característica da molécula.

A proteína codificada por *cosT* de 415 aminoácidos e a ORF 44 com 145 aminoácidos tem como função auxiliar na transferência de L-rodosamina às enzimas glicosiltransferases da aglicona da cosmomicina como acontece com as proteínas DnrQ (MALLA et al., 2009) e AknT (LEIMKUHLE et al., 2007).

#### 4.1.4.6 *Genes reguladores*

O gene *cosS*, codifica uma proteína da família reguladora do tipo PadR e a ORF 52 um regulador do tipo SARP envolvidos nos mecanismos transcricionais de regulação da cosmomicina D. Alguns trabalhos realizados com genes análogos ao gene *cosS* em microorganismos grampositivos como *Pediococcus pentosaceus* (BARTHELMEBS; LECOMTE; DIVIES, 2000); *Lactobacillus plantarum* (LANDETE et al., 2008) e *Bacillus subtilis* apontam como função principal dos genes *padR* a síntese de fatores de transcrição, envolvidos no mecanismo de repressão de genes associados com a resposta ao estresse por ácidos fenólicos.

Em *S. coelicolor* a inativação do gene SCO3900 mostrou que codifica uma proteína PadR, um regulador negativo que participa na diferenciação morfológica mostrando características de autoregulação que influenciam a expressão co-transcricional de genes à jusantes (ZHANG et al., 2009). As proteínas da família PadR-like, formam parte de um amplo grupo de fatores transcricionais descrito em bactérias que regulam diversos processos incluindo resistência múltipla a drogas, virulência e detoxificação.

Quanto aos genes reguladores do tipo SARP, estudos realizados em *Streptomyces venezuelae* mostraram que sua inativação se vê refletida na depleção total da produção de jadomicina e quando superexpressos existe um incremento considerável do composto (YANG; HAN; VINING, 1995), da mesma forma foi observado com *S. clavuligerus* produtor de ácido clavulânico (SANTAMARTA et al., 2002) e *S. peucetius* (SCOTTI; HUTCHINSON, 1996).

#### 4.1.4.7 *Genes de Resistência*

O mecanismo de resistência à cosmomicina estaria dirigido pelos genes *cosI*, *cosJ*, ORF 17 e a ORF 18. O gene *cosI* e *cosJ* formariam um sistema típico de

efluxo de drogas, referido como sistema transportador ABC do tipo I, semelhante ao descrito em *S. peucetius* (DrrAB) formado por um componente hidrofílico que liga ATP e um componente de membrana. O gene *cosI* mostra homologia ao componente hidrofílico *drrA*, enquanto *cosJ* compartilha similaridade com permeases do tipo ABC, proteínas transportadoras de membrana. A ORF 17 homóloga a *drrC*, transportador ABC em *S. peucetius*, indicaria um mecanismo de resistência associado à excisão do antibiótico por reparo de DNA, reportado também em *E. coli* com a proteína UvrA (MENDEZ; SALAS, 2001; SAIER et al., 1998). A presença de uma enzima glutationa-dependente codificada pela ORF 18, sugere que *S. olindensis* apresenta um mecanismo de resistência contra o dano oxidativo capaz de usar o sistema transportador ABC como foi descrito em *Mycobacterium tuberculosis* (BLACK; WOLF, 1991; DAYARAM et al., 2006) e apresenta um sistema de redução do dissulfeto que contribui na manutenção do estado redox sendo usado como doador de elétrons para diferentes enzimas como as ribonucleótideo redutases.

#### 4.1.4.8 ORFs com funções desconhecidas

O produto do gene *cosY* tem sua maior homologia (55% de identidade) com a proteína ornitina ciclodeaminase (Ocd), ainda não reportada dentro dos genes biossintéticos de outras antraciclinas; esta família de proteínas é descrita por participar em reações de conversão de L-ornitina a L-prolina e foi anotada em vias biossintéticas de polipeptídios não ribossomais (NRPS) de *S. avermitilis* (Omura et al., 2001) e em *Streptomyces* sp. ATCC 11861 (VioK) como amidotransferase na biossíntese do antibiótico viomicina (THOMAS; CHAN; OZANICK, 2003). O nocaute do gene *rapL* (provável Ocd) do *cluster* biossintético da rapamicina, um policetídeo macrocíclico produzido por *S. hygrosopicus*, mostrou ser um precursor específico para a formação da lactona da rapamicina (KHAW et al., 1998).

O produto da ORF 38 semelhante à proteína *aknV* das aclacinomicinas, possível oxidoreductase putativa, foi sugerido que atuasse como ciclase policetídica, no entanto se especula que possa estar envolvido na estabilização dos componentes do complexo PKS tipo II. O gene *cosS*, regulador transcricional do tipo PadR-like foi descrito em *S. galilaeus* (*acls*), no entanto só poucos membros

desta família tem sido estudados geneticamente e bioquimicamente e sua função ainda é desconhecida.

#### 4.2 Nocaute dos genes *cosS* e *cosY*

Os primeiros estudos para avaliar a função dos genes *cosD* foram realizados por Garrido (2005), baseado em esse trabalho optou-se por empregar a mesma estratégia de nocaute por troca alélica. A proposta de trabalhar com ambos os genes *cosS* e *cosY* visava responder à questão de sua funcionalidade não só pelo fato de serem genes pouco usuais dentro dos descritos atualmente em *clusters* de outras antraciclinas, mas também porque experimentos realizados por Saenz (2007) mostraram que estes genes eram expressos ativamente durante a produção do antibiótico.

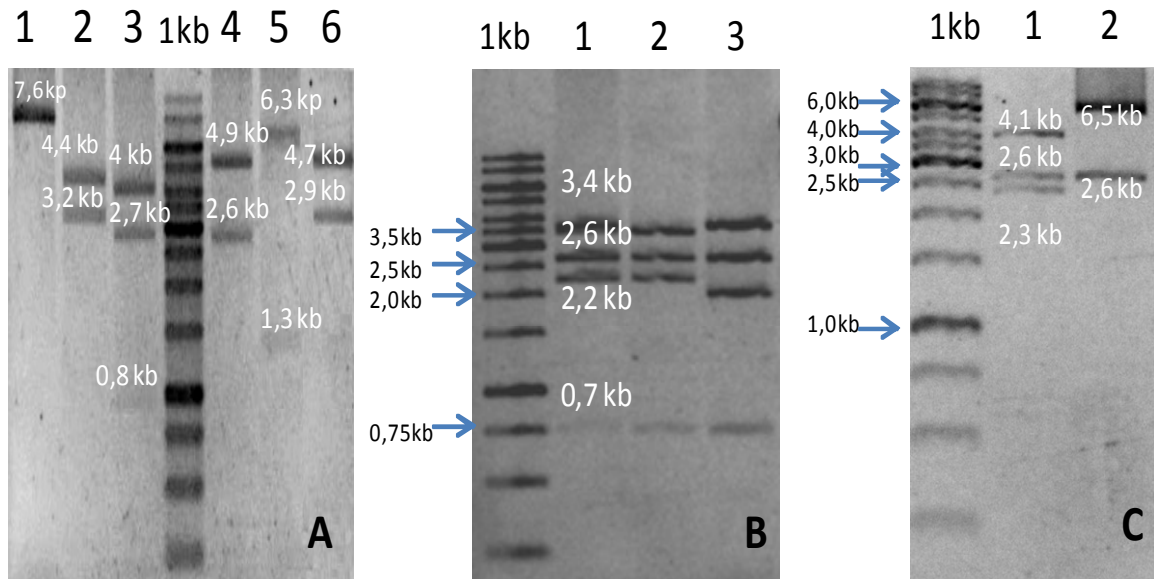
Como resultados desta parte do trabalho foram realizadas as construções pCCSII e pCCYII (ver seção 3.7.1.2), plasmídeos que contêm os genes *cosS* e *cosY* truncados por um cassete de apramicina clonado no mesmo sentido da transcrição de cada gene, como se confirmou através do padrão de restrição e seqüenciamento (Figura 26, Figura 27, Figura 28). Em ambos os plasmídeos observou-se que a enzima de restrição *NcoI* permite recuperar regiões de recombinação de  $\approx 1,8$  Kb e  $\approx 1,3$  Kb a cada lado do cassete de apramicina (1,5 Kb) fragmento de tamanho ideal para realizar recombinação homóloga (KIESER et al., 2000).

Apesar de este fragmento ser recuperado, houve dificuldades na realização das clonagens no vetor conjugativo pHZ1358; usado amplamente em experimentos de truncamento de genes e recombinação (SUN et al., 2009). Os motivos podem ser múltiplos incluindo aqueles associados à relação vetor:inserto, à reação de ligação, eficiência da transformação entre outras. Visando superar esses imprevistos foram desenhados *iniciadores* com sítios de restrição *bgIII* (Tabela 6) para realizar ligações do tipo coesivo no sítio *BamHI* de pHZ1358, dessa forma foram amplificados os fragmentos desejados a partir dos plasmídeos pCCSII e pCCYII, mas não se obtiveram colônias transformantes.

Por outro lado, os plasmídeos mencionados foram amplificados na bactéria ET12567/pUB307 (deficiente em metilação); extraídos e usados para transformar protoplastos de *Streptomyces olindensis* com o intuito de evitar o forte sistema de

metilação do microorganismo (KIESER; HOPWOOD, 1991). Produto da transformação com pCCSII se obteve a cepa So $\Delta$ S, que mostrou crescer sob marca de resistência apramicina produzindo um pigmento marrom quando crescida em meio R5M, diferente do pigmento roxo que produz a cepa selvagem.

Figura 26 - Digestão enzimática dos plasmídeos pCCH, pCCY-II e pCCS-II



(A) Digestão do plasmídeo pCCH com as enzimas (1) *EcoRI*; (2) *NcoI*; (3) *PvuI*; (4) *SacI*; (5) *BamHI*; (6) *KpnI*. (B) Digestão do plasmídeo pCCY-II (1 e 2) *SacI*, padrão esperado; (3) *SacI*, padrão com gene de apramicina sentido antisense. (C) plasmídeos (1) pCCS-II e (2) pCCY-II digeridos com *EcoRI/XbaI*. Marcador de peso molecular empregado 1kb em gel de agarose 0.8%.

Nas análises por espectrometria LC-ESI MS do extrato da cepa So $\Delta$ S se observou que houve uma supressão do pico característico da cosmomicina D, assim como aqueles descritos do complexo antitumoral. No controle, *cosD* apresentou um tempo de retenção na faixa de 17,28-18,04 min e uma massa de MS<sup>+</sup> de 1189,34 gmol<sup>-1</sup> no extrato da cepa selvagem e no padrão utilizado (Figura 29A e Figura 29B); a ausência na produção da antraciclina se verificou também na falta de atividade biológica do extrato frente a *Bacillus subtilis* (seção 4.4). Além disso, como se observa na Figura 29C houve acumulação de dois dos compostos com tempos de retenção aos 11 e 14 minutos com massas de 796,13 gmol<sup>-1</sup> e 961,45 gmol<sup>-1</sup> respectivamente, que ainda não foram identificados e aparecem tanto no cromatograma do extrato da cepa selvagem como no extrato So $\Delta$ S.

Figura 27 - Seqüência indicando a orientação do cassete de apramicina no gene *cosY* do plasmídeo pCCYII

>Fragmento do gene *cosY*

GCTGGCGCAGCGCCATCCCCTCCGGGCTCGCCGCGCGCTACCTCGCCCCGCCGGCCCCCTCCCTGCTC  
GGCCTCTTCGGCTCCGGCCAACCGGCCTGGTCCTGCCTGCTCGTGCTGCACCACGCGCTGCCCTCGCT  
CTCCGAGGTGCACGTCGGCCGGGACCCGGCCCAGGCCGGGACCTCGCGACGGCCGCCGCCCTGCGCA

>Cassete de apra clonado no sítio *Bsu36I*

CCGGCCTC **AATTCTGAAGCTTCTGCAGCTCACGGTAACTGATGCCGTATTTGC**

Figura 28 - Seqüência indicando a orientação do cassete de apramicina no gene *cosS* do plasmídeo pCCSII

>Fragmento do gene *cosS*

GACGGCCTGCTGAAGTCGACCGACATCCCCGACTGGCCCCGGCCGCGTTCGACTACGAGATCGCGCCCCC  
GGGCGAGGAGGAGTTCTTCCGGCTGCTGCGCGACGCGCTGCGCCAGGGGAACAACCGACCGGACATGC

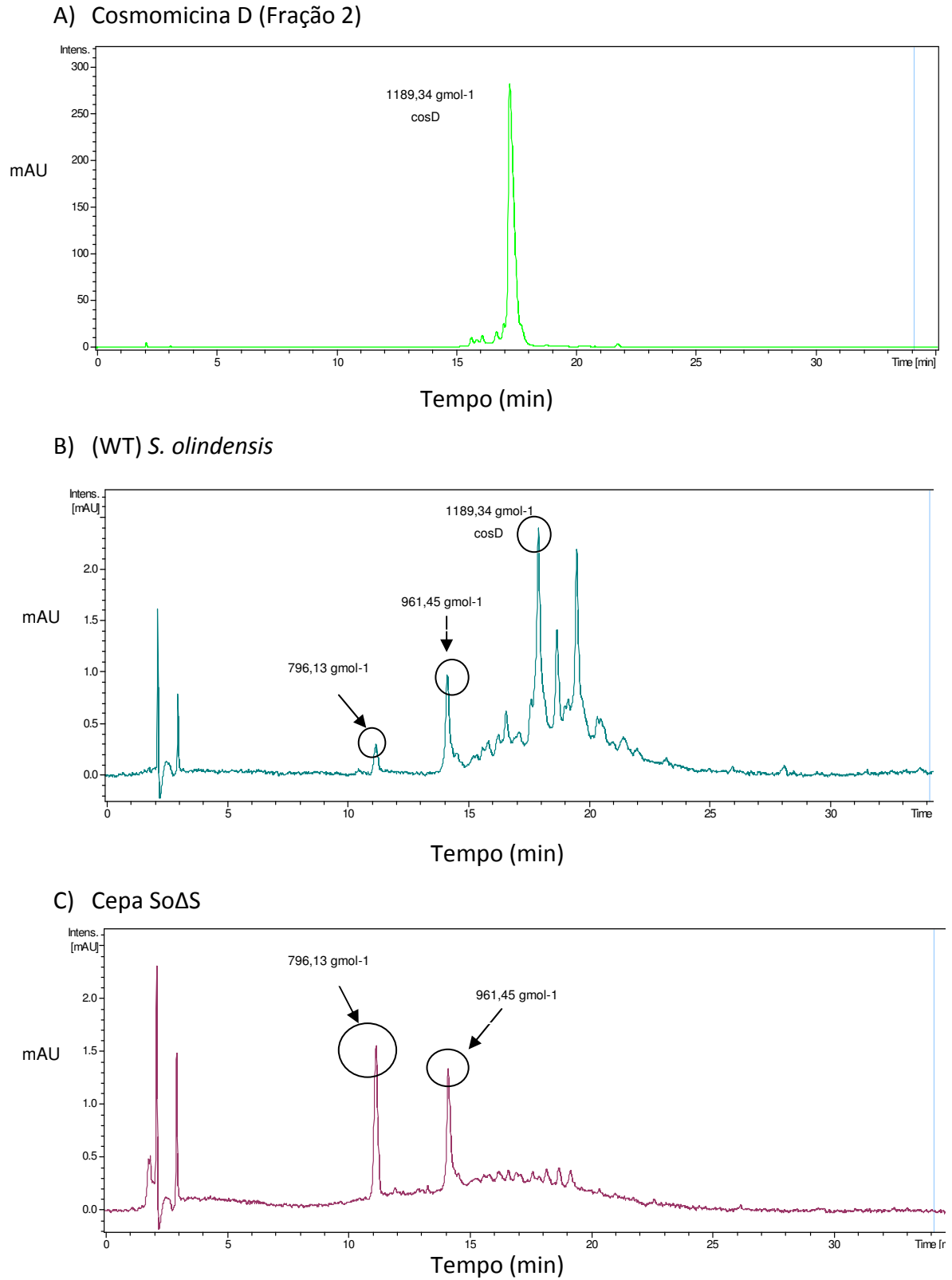
>Cassete de apra clonado no sítio *AsiSI*

TGGGGGCGCGCTCTCCTGCTGCCGGCGCTCAGCCGCGAGGAGGCG **AATTCTGAAGCTTCTGCAGCTCA  
CGGTAAGTATGATGCCGTATTTGCA**

Um ponto importante a ser abordado para obter mutantes nulos de ambos os genes consiste no emprego de novos plasmídeos conjugativos como os descritos por He et al.(2009) que podem facilitar a clonagem de fragmentos provenientes dos plasmídeos pCCYII e pCCSII, além disso podem ser testadas estratégias alternativas como a metodologia de recombinação com o sistema *λ-red*, PCR *targeting* (BERTOLT et al., 2004; GUST et al., 2003; SONG et al., 2008) e Fusion PCR (MIN; LV; ZHENG, 2007).

Mesmo a cepa SoΔS seja deficiente na produção de cosmomicinas, devem ser realizados ensaios adicionais que permitam confirmar o nocaute molecularmente como a amplificação por PCR do gene e identificar a região de recombinação, *southern blot* e testes de complementação da mutação. Embora seja antecipado falar que o gene *cosS* foi nocauteado, também é importante considerar que o plasmídeo pCCSII carece de elementos importantes para operar em *Streptomyces* como a origem de replicação *ori*, *rep* de pIJ101 presente no vetor conjugativo, mas não se desconsidera a possibilidade de um evento de recombinação ter acontecido já que se obteve uma cepa mutante.

Figura 29 - Análise cromatográfica do extrato da cepa selvagem e a cepa SoΔS

(A) Cosmomicina D (B) cromatograma do extrato da cosmomicina de *S. olindensis* (C) extrato da cepa SoΔS.



#### 4.3 Análises cromatográficas dos extratos pEM4AY e pEM4AS

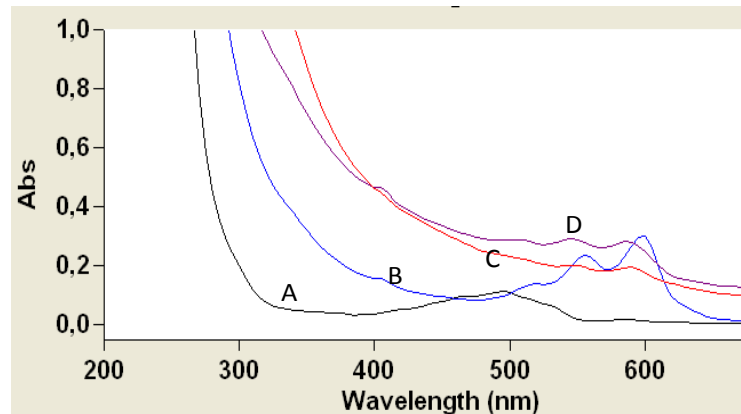
Os genes *cosS* e *cosY* foram clonados no vetor pEM4A (BLANCO et al., 2001). As novas construções chamadas de pEM4AS e pEM4AY foram utilizadas para avaliar o efeito de múltiplas cópias de ambos os genes na produção de cosmomicina D e sobre o complexo antitumoral. Em outros trabalhos, plasmídeos recombinantes foram construídos para expressar genes de compostos policetídeos produzidos por microorganismos do gênero *Streptomyces* como a oviedomicina (LOMBO et al., 2009) e a benastatina (XU; SCHENK; HERTWECK, 2007).

A primeira observação feita durante o período de crescimento das bactérias transformantes pEM4AY e pEM4AS foi a produção de um pigmento cor marrom que a diferença da cepa selvagem apresenta-se caracteristicamente de cor roxo, devido à produção de cosmomicina D. Este resultado sugeriu antecipadamente a supressão ou produção de uma baixa concentração de *cosD*.

Uma primeira aproximação para determinar a presença do complexo antitumoral e da antraciclina foi feita através da medição da absorbância entre 200 e 800 nm (Figura 30) procurando variações no espectro descrito por Furlan (1997). Como resultado se observou uma diminuição na concentração dos dois picos característicos, relatados aos 550 e 600 nm nas amostras dos transformantes em comparação com a cepa selvagem. Quanto ao espectro de *cosD* se observa que sua maior absorção está aos 490 nm, sendo uma banda pouco evidente, fato pelo qual foi realizado uma análise por espectrometria de massas.

Nas análises por espectrometria LC-ESI MS pode se observar que o extrato de pEM4AS mostra um perfil cromatográfico simplificado com relação ao perfil da cepa selvagem, com uma diminuição no número compostos produzidos do complexo antitumoral, onde há uma diminuição evidente na concentração de *cosD* em relação aos outros picos, sendo que na cepa selvagem é o composto com maior absorbância. Também se observam dois picos com massas de 1173,60 gmol<sup>-1</sup>, um deles com tempo de retenção de 19,53 minutos, presente no cromatograma da cepa selvagem poderia ser o intermediário cosmomicina C; por outro lado existe um composto de maior absorbância com massa de 1157,61 gmol<sup>-1</sup> e tempo de retenção aos 21,5 minutos, que ainda não foi identificado.

Figura 30 - Espectro de absorção dos extratos pEM4AS e pEM4AY



(A) Espectro da cosmomicina D, (B) Extrato da cepa selvagem *S. olindensis* (C) extrato da cepa pEM4AS, (D) extrato da cepa pEM4AY.

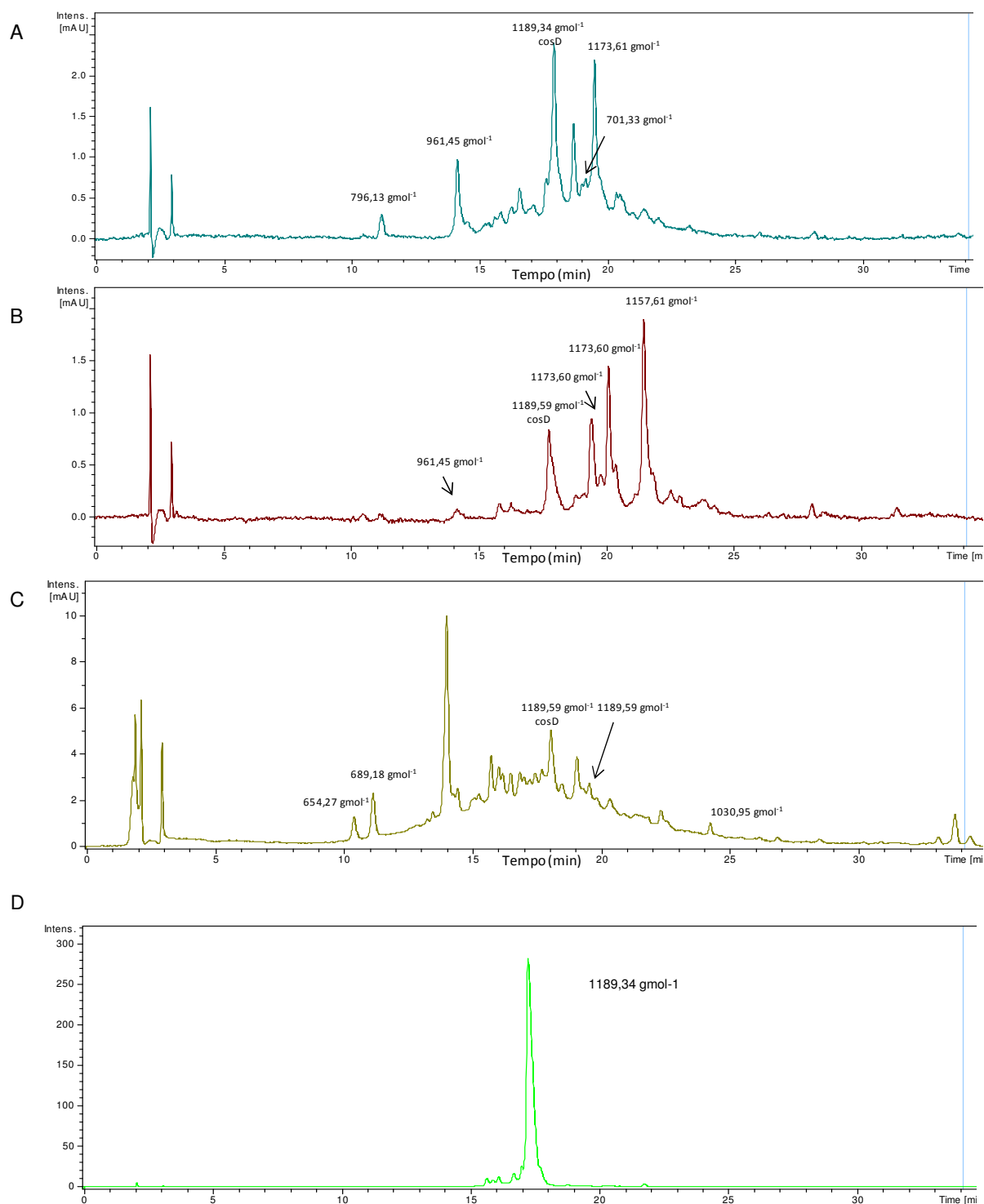
O perfil cromatográfico do extrato pEM4AY apresenta diferenças notáveis quando comparado com aquele obtido para a cepa selvagem, o pico de cosD sofreu uma diminuição, entretanto outros compostos aumentaram sua concentração consideravelmente, como o registrado aos 14 minutos com massa de  $961,45 \text{ gmol}^{-1}$  ainda não identificado (Figura 31C). Na Tabela 10, compilaram-se as massas da cosmomicina A, B e C como reportado por Hirayama (1987); estes compostos são considerados intermediários da biossíntese da cosmomicina D e se assume que estas moléculas estejam presentes nos extratos analisados, pelo fato de acharem-se massas correspondentes com tempos similares de retenção. Os espectros obtidos foram anexados no APÊNDICE B e as estruturas hipotéticas proposta para os compostos com massa  $796,13 \text{ gmol}^{-1}$ ,  $961,45 \text{ gmol}^{-1}$  e  $1157,63 \text{ gmol}^{-1}$  são apresentados na figura 32.

Tabela 10 - Compostos descritos nos extratos pEM4AS e pEM4AY

Amostra	Cosmomicina B $\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{NO}_{14}$ PM: 771,84712	Cosmomicina C $\text{C}_{60}\text{H}_{88}\text{N}_2\text{O}_{21}$ PM: 1173,34152	Cosmomicina D $\text{C}_{60}\text{H}_{88}\text{N}_2\text{O}_{22}$ PM: 1189,34092
FP2			+ (17,28-17,62min)
SWOT	-	+(19,54 min.)	+ (17,82-18,04 min.)
SoΔS	-	-	-
R5M	-	-	-
pEM4AY	+ (24,28 min)	-	+ (17,75 min) pouco
pEM4AS	-	+ (20,11 min)	+ (17,79 min)

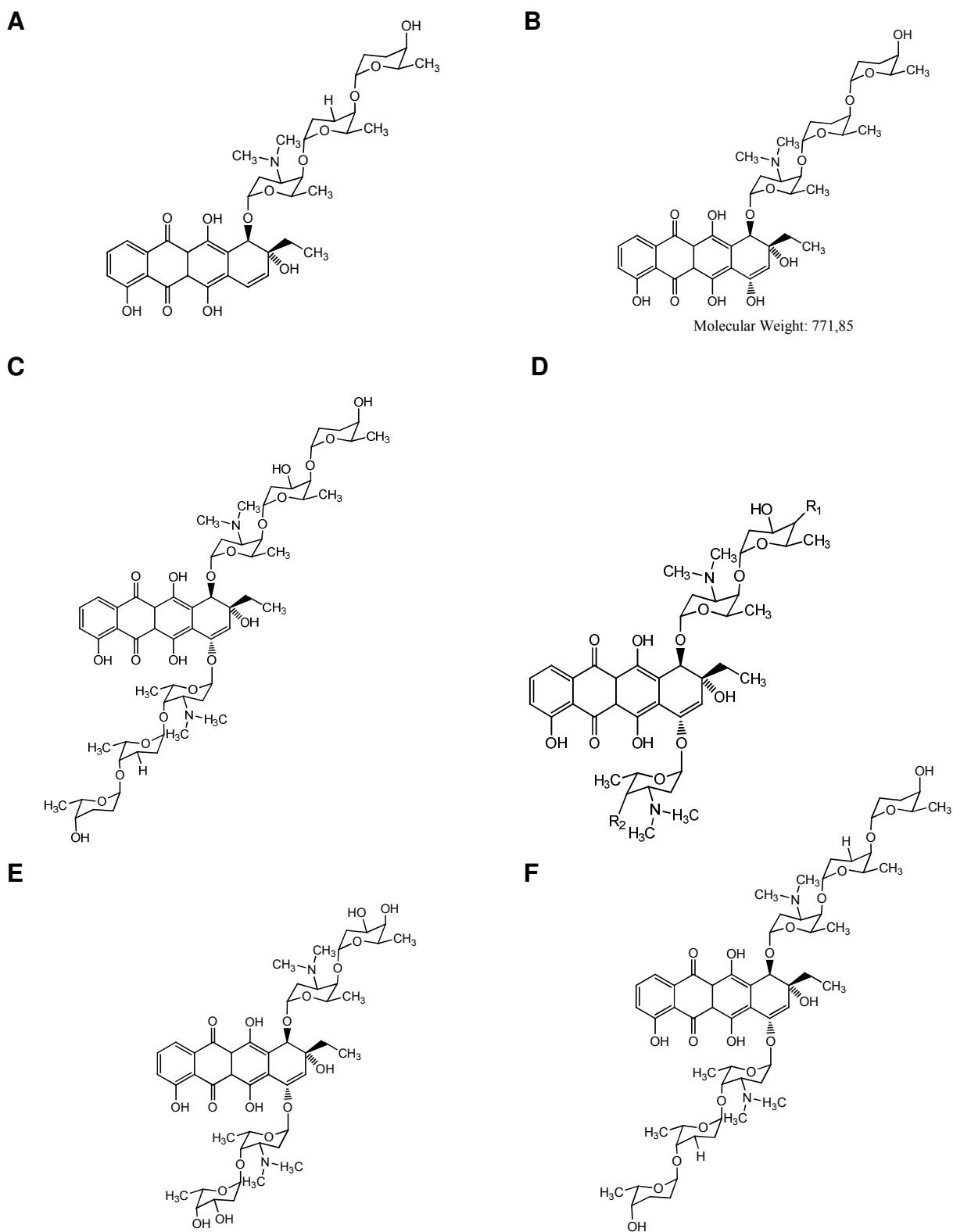
R5M: picos do meio de cultura R5M; SWOT: cepa selvagem *S. olindensis*

Figura 31 - Cromatogramas dos transformantes pEM4AS e pEM4AY



Cromatogramas do (A) extrato da cepa selvagem, (B) extrato pEM4AS, (C) extrato pEM4AY, (D) cosmomicina D.

Figura 32. Estrutura das moléculas cosmomicina A, B e C e dos compostos achados nos extratos das cepas pEM4AS e pEM4AY



(A) cosmomicina A, (B) cosmomicina B, (C) cosmomicina C, (D) pico 796,13  $\text{gmol}^{-1}$

(E) pico 961  $\text{gmol}^{-1}$ , (F) pico 1173, 63  $\text{gmol}^{-1}$

Com os resultados das análises cromatográficas dos extratos obtidos da cepa So $\Delta$ S e de superexpressão pEM4AS (Figura 31B), sugere-se como função hipotética para o gene *cosS* um provável regulador positivo de cosmomicina D, por ser um gene expresso desde o começo da produção do antibiótico como reportado por Sanz (2007) e não um repressor da via biossintética como se pensou inicialmente. Trabalhos realizados com o gene repressor da biossíntese de daunorubicina (*dauW*), nocauteado recentemente em *S. coeruleobidus*; mostrou-se que existe um aumento na biossíntese em até 8 vezes desta antraciclina na cepa mutante gerada (YUAN et al., 2011). Contrariamente aos experimentos realizados, a cepa So $\Delta$ S (provável mutante do gene *cosS*) foi deficiente na produção de cosmomicina D, e como se observou no extrato da cepa de superexpressão pEM4AS houve produção de antibiótico junto com a acumulação de outro tipo de moléculas refletidas em um aumento na produção de antibiótico como se evidenciou no teste de atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* (Figura 33).

Uma das características na regulação de metabólitos secundários em estreptomicetes é sua diversidade e complexidade. Com base nas análises *in silico* e os mecanismos regulatórios descritos em antraciclinas como a daunorubicina infere-se que exista no mínimo um ativador transcricional da via *cosD*, codificado pelo gene *cosS*, um regulador principal ORF 52 (proteína do tipo SARP) e um repressor similar ao codificado pelo gene *dauW*, codificada pela ORF 56 (536 aa) cujas proteínas mostraram 49% de identidade.

Na daunorubicina (DNR) foram descritos três fatores transcricionais: DnrO, DnrN e DnrI. O gene *dnrO* corresponde ao primeiro fator transcricional que é ativo na biossíntese de DNR, em resposta a uma série de sinais extracelulares que ainda são desconhecidas. DnrO se liga ao promotor de um segundo fator de transcrição codificado pelo gene *dnrN* e o ativa, este processo pode ser cooperativo entre (DnrO e DnrN) ou ser realizado simplesmente por DnrN. O regulador principal DnrI ativa todos os genes de resistência do cluster biossintético e ativa o repressor transcricional *dnrW* que pode inibir *dnrI* (VASANTHAKUMAR et al., 2013).

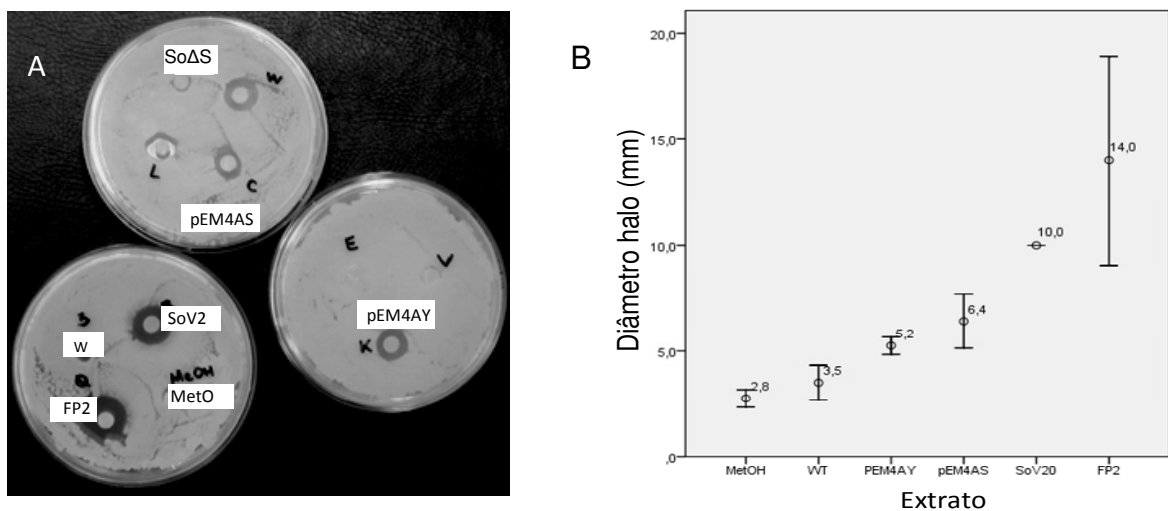
Quanto ao gene *cosY* provável ornitina ciclodeaminase (OCD's) responsável na conversão de L-ornitina em L-prolina se observa que a superexpressão também não comprometeu a síntese de cosmomicina D; no entanto, aconteceram modificações nos picos do complexo antitumoral como evidenciou-se no

cromatograma de superexpressão do gene *cosS*. Apesar de serem necessários experimentos adicionais para estabelecer uma função do gene *cosY* com base em dados experimentais, se sugere realizar o teste de atividade ciclodeaminase, para avaliar a relação entre prolina, glutamina e ornitina como realizado em outros microorganismos grampositivos como *Corynebacterium glutamicum* (LEE et al., 2010) e purificar a proteína; se propõe que a ornitina ciclodeaminase seja uma enzima que participe no metabolismo da ornitina sendo doador do grupo amina na montagem de açúcares.

#### 4.4 Teste de atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado para determinar de uma forma rápida a produção de antibiótico dos diferentes extratos. Os dados coletados indicam que o extrato da cepa transformante pEM4AS apresenta um halo de inibição meio maior que à cepa selvagem e que a cepa pEM4AY no teste frente a *Bacillus subtilis* (Tabela 11, Figura 33) indicando uma maior produção de antibiótico.

Figura 33 – Teste de atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*



(A) Extratos concentrados a 6mg/ml de: (WT) cepa selvagem *S. olindensis*; (W,C,L) cepa pEM4AS; (E,K,V) cepa pEM4AY; cepa SoΔS; SoV20, variante produtora e cosmomicina; MeOH metanol (controle negativo) e FP2 cosmomicina D 50 μg/ml (controle positivo). (B) Representação do diâmetro meio dos halos obtidos.

Tabela 11 - Diâmetro dos halos de inibição dos extratos no teste de atividade antimicrobiana

Extratos	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Fp2 (50 µg/ml)	++++	14 +/- 4,2
SoV20	+++	10 +/- 0,0
pEM4AS	++	6,41 +/- 1,29
pEM4AY	+	5,25 +/- 0,35
WT	+	3,50 +/- 0,70
MetOH	-	2,75 +/- 0,35
SoΔS	-	1,0 +/- 0.0

Atividade antimicrobiana expressa pelo diâmetro da zona de inibição; (-)  $\leq$  2,75 mm; (+) 3-5 mm; (++) 6-9 mm; (+++) 10 -13 mm, (++++)  $\geq$ 14 mm.

Em relação aos controles, observou-se que a fração 2 (50 µg/ml) referente à cosmomicina D e o antibiótico extraído da cepa mutante SoV20 mostraram os maiores halos de inibição como esperado. Dado que foi realizado um estudo do tipo qualitativo, torna-se necessário quantificar e isolar as frações majoritárias que foram observadas nos cromatogramas, desta forma espera-se estabelecer se através de análises químicas como ressonância magnética a superexpressão dos genes *cosS* e *cosY* em *S. olindensis* esteja associada à produção de moléculas modificadas ou intermediários da via que apresentem atividade biológica.

## 5 CONCLUSÕES

- Foi amplificado um fragmento de 550 bp contíguo ao gene *cosI* no cosmídeo p5E11 com a técnica LDGW-PCR que indicou a presença de mais um gene biossintético do cluster cosmomicina D;
- foram amplificados fragmentos gênicos das proteínas ciclases, metiltransferases e cetoreductase do cluster CosD por PCR com os iniciadores degenerados desenhados a partir do alinhamento de outras antraciclinas do tipo pKS II;
- o draft do genoma de *S. olindensis* permitiu identificar 40 ORFs envolvidas na biossíntese da cosmomicina D, com base em suas homologias como outras antraciclinas;
- foi obtida a cepa So $\Delta$ S, como parte da estratégia de nocaute do gene *cosS* deficiente na produção de cosmomicina D;
- a superexpressão dos genes *cosS* e *cosY* em *S. olindensis* se viu refletida na sobreprodução e supressão de compostos do complexo antitumoral que afetou a produção de cosmomicina D.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AHLERT, J.; SHEPARD, E.; LOMOVSKAYA, N.; ZAZOPOULOS, E.; STAFFA, A.; BACHMANN, B. O.; HUANG, K.; FONSTEIN, L.; CZISNY, A.; WHITWAM, R. E.; FARNET, C. M.; THORSON, J. S. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. **Science**, v. 297, p. 1173-1176, 2002.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 797-814, 2001.

APARICIO, J. F.; MOLNAR, I.; SCHWECKE, T.; KONIG, A.; HAYDOCK, S. F.; KHAW, L. E.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P. F. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. **Gene**, v. 169, p. 9-16, 1996.

ARCAMONE, F. **Doxorubicin: anticancer antibiotics**. New York: Academic Press, 1981. 369 p.

ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FANTINI, G.; GREIN, A.; OREZZI, P.; POL, C.; SPALLA, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceitius* var. caesius. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 11, p. 1101-1110, 1969.

BACHUR, N. R.; JOHNSON, R.; YU, F.; HICKEY, R.; APPLGREN, N.; MALKAS, L. Antihelicase action of DNA-binding anticancer agents: relationship to guanosine-cytidine intercalator binding. **Mol. Pharmacol.**, v. 44, p. 1064-1069, 1993.

BACHUR, N. R.; LUN, L.; SUN, P. M.; TRUBEY, C. M.; ELLIOTT, E. E.; EGORIN, M. J.; MALKAS, L.; HICKEY, R. Anthracycline antibiotic blockade of SV40 T antigen helicase action. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p. 1025-1034, 1998.

BARTHELMEBS, L.; LECOMTE, B.; DIVIES, C. Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6724-6731, 2000.

BEINKER, P.; LOHKAMP, B.; PELTONEN, T.; NIEMI, J.; MANTSALA, P.; SCHNEIDER, G. Crystal structures of SnoaL2 and AclR: two putative hydroxylases in the biosynthesis of aromatic polyketide antibiotics. **J. Mol. Biol.**, v. 359, p. 728-740, 2006.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

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

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDENO-TARRAGA, A. M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUANG, C. H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, p. 141-147, 2002.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot.**, v. 58, p. 1-26, 2005.

BERTOLT, G.; GOVIND, C.; DAGMARA, J.; TIAN, Y.; CELIAJ, B.; KEITHF, C. Lambda Red-Mediated Genetic Manipulation of Antibiotic-Producing *Streptomyces*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 54, p. 107-128, 2004.

BHUYAN, B. K.; BLOWERS, C. L.; SHUGARS, K. D. Lethality of nogalamycin, nogalamycin analogs, and adriamycin to cells in different cell cycle phases. **Cancer Res.**, v. 40, p. 3437-3442, 1980.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 208-215, 2005.

BLACK, S. M.; WOLF, C. R. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. **Pharmacol. Ther.**, v. 51, p. 139-154, 1991.

BLANCO, G.; PATALLO, E. P.; BRANA, A. F.; TREFZER, A.; BECHTHOLD, A.; ROHR, J.; MENDEZ, C.; SALAS, J. A. Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin. **Chem. Biol.**, v. 8, p. 253-263, 2001.

BLODGETT, J. A.; ZHANG, J. K.; METCALF, W. W. Molecular cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the phosphinothricin tripeptide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 49, p. 230-240, 2005.

BONADONNA, G.; MONFARDINI, S. Cardiac toxicity of daunorubicin. **Lancet.**, v. 1, p. 837, 1969.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd. New York: Springer, 2001. 317 p.

BOOSER, D. J.; HORTOBAGYI, G. N. Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. **Drugs**, v. 47, p. 223-258, 1994.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. The multidrug resistance protein

family. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1461, p. 347-357, 1999.

BRANA, M. F.; CACHO, M.; GRADILLAS, A.; DE PASCUAL-TERESA, B.; RAMOS, A. Intercalators as anticancer drugs. **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, p. 1745-1780, 2001.

BROCKMANN, H. [Anthracyclines and Anthracyclones. (Rhodomycinone, Pyrromycinone and Their Glycosides)]. **Fortschr. Chem. Org. Naturst.**, v. 21, p. 121-182, 1963.

BROCKMANN, H.; BAUER, K.; BORCHERS, I. Rhodomycin, ein rotes Antibiotikum (Antibiotica aus Actinomyceten, VII. Mitteil. **Chem. Ber.**, v. 84, p. 700-710, 1951.

BUGG, T. D. The development of mechanistic enzymology in the 20th century. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 465-493, 2001.

BUNET, R.; SONG, L.; MENDES, M. V.; CORRE, C.; HOTEL, L.; ROUHIER, N.; FRAMBOISIER, X.; LEBLOND, P.; CHALLIS, G. L.; AIGLE, B. Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of Kinamycins. **J. Bacteriol.**, v. 193, p. 1142-1153, 2011.

CAPRANICO, G.; ZUNINO, F.; KOHN, K. W.; POMMIER, Y. Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40 DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity. **Biochemistry**, v. 29, p. 562-569, 1990.

CARVALHO, H.; GARRIDO, L. M.; FURLAN, R. L.; PADILLA, G.; AGNOLETTI, M.; GUECHEVA, T.; HENRIQUES, J. A.; SAFFI, J.; MENCK, C. F. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 65, p. 989-994, 2010.

CARVER, T.; BLEASBY, A. The design of Jemboss: a graphical user interface to EMBOSS. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1837-1843, 2003.

CHALLIS, G. L. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. **Microbiology**, v. 154, p. 1555-1569, 2008.

CHENG, A. A.; LU, T. K. Synthetic biology: an emerging engineering discipline. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 14, p. 155-178, 2012.

CHICHUK, T. V.; STRASHKEVICH, I. A.; KLEBANOV, G. I. [Free radical mechanisms of low-intensive laser radiation]. **Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.**, v., p. 27-32, 1999.

CHUNG, J. Y.; FUJII, I.; HARADA, S.; SANKAWA, U.; EBIZUKA, Y. Expression, purification, and characterization of AknX anthrone oxygenase, which is involved in aklavinone biosynthesis in *Streptomyces galilaeus*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 6115-

6122, 2002.

CORTES, J.; HAYDOCK, S. F.; ROBERTS, G. A.; BEVITT, D. J.; LEADLAY, P. F. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. **Nature**, v. 348, p. 176-178, 1990.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta**, v., p. 2013.

DAYARAM, Y. K.; TALAUE, M. T.; CONNELL, N. D.; VENKETARAMAN, V. Characterization of a glutathione metabolic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* and its resistance to glutathione and nitrosoglutathione. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 1364-1372, 2006.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol. Biotechnol.**, v. 38, p. 41-55, 2008.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.

DOYLE, L. A.; YANG, W.; ABRUZZO, L. V.; KROGMANN, T.; GAO, Y.; RISHI, A. K.; ROSS, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, p. 15665-15670, 1998.

DREIER, J.; KHOSLA, C. Mechanistic analysis of a type II polyketide synthase. Role of conserved residues in the beta-ketoacyl synthase-chain length factor heterodimer. **Biochemistry**, v. 39, p. 2088-2095, 2000.

DUBOST, M.; GANTER, P.; MARAL, R.; NINET, L.; PINNERT, S.; PREUDHOMME, J.; WERNER, G. H. [a New Antibiotic with Cytostatic Properties: Rubidomycin]. **C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci.**, v. 257, p. 1813-1815, 1963.

DYSON, P. **Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. 255 p.

ELKINS, C. A.; MOSER, S. A.; SAVAGE, D. C. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. **Microbiology**, v. 147, p. 3403-3412, 2001.

FEDERICO MARIA, A. Anthracyclines. In: **Anticancer Agents from Natural Products**. CRC Press; 2005.

FERNÁNDEZ, E.; LOMBO, F.; MENDEZ, C.; SALAS, J. A. An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 251, p. 692-698, 1996.

FINN, R. D.; MISTRY, J.; TATE, J.; COGGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J. E.; GAVIN, O. L.; GUNASEKARAN, P.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 38, p. D211-222, 2010.

FISCHER, G.; WENNER, T.; DECARIS, B.; LEBLOND, P. Chromosomal arm replacement generates a high level of intraspecific polymorphism in the terminal inverted repeats of the linear chromosomal DNA of *Streptomyces ambofaciens*. **Proc. Nat. Ac. Sc.**, v. 95, p. 14296-14301, 1998.

FLÄRDH, K.; BUTTNER, M. J. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 36-49, 2009.

FUJII, I.; EBIZUKA, Y. Anthracycline Biosynthesis in *Streptomyces galilaeus*. **Chem. Rev.**, v. 97, p. 2511-2524, 1997.

FURLAN, R. L. **Caracterização de mutantes de *Streptomyces olindensis* produtor do atibiótico atitumoral retamicina**. 1997. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FURLAN, R. L.; WATT, S. J.; GARRIDO, L. M.; AMARANTE-MENDES, G. P.; NUR-E-ALAM, M.; ROHR, J.; BRANA, A.; MENDEZ, C.; SALAS, J. A.; SHEIL, M. M.; BECK, J. L.; PADILLA, G. DNA-binding properties of cosmomycin D, an anthracycline with two trisaccharide chains. **J. Antibiot. (Tokyo)**. v. 57, p. 647-654, 2004.

FURUSAWA, S.; NAKANO, S.; WU, J.; SAKAGUCHI, S.; TAKAYANAGI, M.; SASAKI, K. I.; SATOH, S. Apoptosis induced by doxorubicin and cinchonine in P388 multidrug-resistant cells. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, p. 1029-1039, 2001.

GARRIDO, L. M.; LOMBO, F.; BAIG, I.; NUR, E. A. M.; FURLAN, R. L.; BORDA, C. C.; BRANA, A.; MENDEZ, C.; SALAS, J. A.; ROHR, J.; PADILLA, G. Insights in the glycosylation steps during biosynthesis of the antitumor anthracycline cosmomycin: characterization of two glycosyltransferase genes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 73, p. 122-31, 2006.

GARRIDO, M. L. **Identificação e caracterização de genes envolvidos na biossíntese da antraciclina cosmomicina produzidas por *Streptomyces olidensis* DAUFPE5622**. 2005. 203 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GCUA. Graphical Codon Usage Analyzer. Version 2.0. 2006. SOFTWARE. <<http://gcu.schoedl.de/>>. Acesso em: 15 maio 2012.

GENBANK. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 3 fev. 2013.

GOSHI, K.; UCHIDA, T.; LEZHAVA, A.; YAMASAKI, M.; HIRATSU, K.; SHINKAWA, H.; KINASHI, H. Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 3411-3415, 2002.

GREIN, A.; SPALLA, C.; DI MARCO, A.; CANEVAZZI, G. Descrizione e classificazione di un attinomicete (*Streptomyces peucetius* sp. nova) produttore di una sostanza attiva antitumorale: La daunomicina **G. Microbiol.**, v. 11, p. 109-118, 1963.

GRIMM, A.; MADDURI, K.; ALI, A.; HUTCHINSON, C. R. Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. **Gene**, v. 151, p. 1-10, 1994.

GULLÓN, S.; OLANO, C.; ABDELFATTAH, M. S.; BRANA, A. F.; ROHR, J.; MENDEZ, C.; SALAS, J. A. Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster for the antitumor anthracycline steffimycin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 4172-4183, 2006.

GUST, B.; CHALLIS, G. L.; FOWLER, K.; KIESER, T.; CHATER, K. F. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 1541-1546, 2003.

HAUTALA, A.; TORKKELL, S.; RATY, K.; KUNNARI, T.; KANTOLA, J.; MANTSALA, P.; HAKALA, J.; YLIHONKO, K. Studies on a second and third ring cyclization in anthracycline biosynthesis. **J. Antibiot. (Tokyo)**, v. 56, p. 143-53, 2003.

HIRAYAMA, K.; AKASHI, S.; ANDO, T.; HORINO, I.; ETOH, Y.; MORIOKA, H.; SHIBAI, H.; MURAI, A. Field desorption tandem mass spectrometry of anthracycline antibiotics, cosmomycin A, B, A', B', C and D. **Biomed. Environ. Mass. Spectrom.**, v. 14, p. 305-312, 1987.

HONG, Y. S.; HWANG, C. K.; HONG, S. K.; KIM, Y. H.; LEE, J. J. Molecular cloning and characterization of the aklavinone 11-hydroxylase gene of *Streptomyces peucetius* subsp. caesius ATCC 27952. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 7096-7101, 1994.

HOPWOOD, D. A. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. **Annu. Rev. Genet.**, v. 40, p. 1-23, 2006.

HOPWOOD, D. A.; MALPARTIDA, F.; KIESER, H. M.; IKEDA, H.; DUNCAN, J.; FUJII, I.; RUDD, B. A.; FLOSS, H. G.; OMURA, S. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. **Nature**, v. 314, p. 642-644, 1985.

HORENSTEIN, M. S.; VANDER HEIDE, R. S.; L'ECUYER, T. J. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. **Mol. Genet. Metab.**, v. 71, p. 436-444, 2000.

HORTOBAGYI, G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. **Drugs**, v. 54 Suppl 4, p. 1-7, 1997.

HUTCHINGS, M. I.; HONG, H.-J.; LEIBOVITZ, E.; SUTCLIFFE, I. C.; BUTTNER, M. J. The  $\sigma^E$  Cell Envelope Stress Response of *Streptomyces coelicolor* Is Influenced by a Novel Lipoprotein, CseA. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 7222-7229, 2006.

HUTCHINSON, C. R. Biosynthetic Studies of Daunorubicin and Tetracenomycin C. **Chem. Rev.**, v. 97, p. 2525-2536, 1997.

IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; SHINOSE, M.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M.; OMURA, S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, p. 526-531, 2003.

ISHIKAWA, J.; HOTTA, K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 174, p. 251-253, 1999.

JANSSON, A. **Structural Enzimology of the Biosynthesis of the Polyketide Antibiotics** 2004. 57 f. Ph. D. thesis - Department of Medical Biochemistry and Biophysics / Division of Molecular Structural Biology, Karolinska Institutet, Sweden, 2004.

JANSSON, A.; NIEMI, J.; LINDQVIST, Y.; MANTSALA, P.; SCHNEIDER, G. Crystal structure of aclacinomycin-10-hydroxylase, a S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase homolog involved in anthracycline biosynthesis in *Streptomyces purpurascens*. **J Mol Biol**, v. 334, p. 269-80, 2003a.

JANSSON, A.; NIEMI, J.; MANTSALA, P.; SCHNEIDER, G. Crystal structure of aclacinomycin methylesterase with bound product analogues: implications for anthracycline recognition and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 39006-39013, 2003b.

JENSEN, P.; SORENSEN, B.; SEHESTED, M.; DEMANT, E.; KJELDSSEN, E.; FRICHE, E.; HANSEN, H. Different modes of anthracycline interaction with topoisomerase II. Separate structures critical for DNA-cleavage, and for overcoming topoisomerase II-related drug resistance. **Biochem. Pharmacol.**, v. 45, p. 2025-2035, 1993.

JULIEN, B.; TIAN, Z. Q.; REID, R.; REEVES, C. D. Analysis of the ambruticin and jerangolid gene clusters of *Sorangium cellulosum* reveals unusual mechanisms of polyketide biosynthesis. **Chem. Biol.**, v. 13, p. 1277-1286, 2006.

KALLIO, P. **Type II aromatic polyketide biosynthetic tailoring enzymes: diversity and adaptation in *Streptomyces* secondary metabolism**. 2008. 49 f. Ph. D. thesis - Department of Biochemistry and Food Chemistry University of Turku 2008.

KANTOLA, J.; KUNNARI, T.; HAUTALA, A.; HAKALA, J.; YLIHONKO, K.; MANTSALA, P. Elucidation of anthracyclinone biosynthesis by stepwise cloning of genes for anthracyclines from three different *Streptomyces* spp. **Microbiology**, v. 146 ( Pt 1), p. 155-163, 2000.

KENDREW, S. G.; KATAYAMA, K.; DEUTSCH, E.; MADDURI, K.; HUTCHINSON, C. R. DnrD cyclase involved in the biosynthesis of doxorubicin: purification and characterization of the recombinant enzyme. **Biochemistry**, v. 38, p. 4794-9, 1999.

KHAW, L. E.; BOHM, G. A.; METCALFE, S.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P. F. Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 disrupted in rapL, encoding a putative lysine cyclodeaminase. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 809-814, 1998.

KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTTENER, M. J.; CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. **Practical Streptomyces Genetics**. Norwich: The John Innes Foundation, 2000. p.

KIESER, T.; HOPWOOD, D. A. Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement. **Methods Enzymol.**, v. 204, p. 430-458, 1991.

KINKEL, L. L.; SCHLATTER, D. C.; BAKKER, M. G.; ARENZ, B. E. *Streptomyces* competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. **Research in Microbiology.**, v. 163, p. 490-499, 2012.

KOMATSU, M.; TSUDA, M.; OMURA, S.; OIKAWA, H.; IKEDA, H. Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 105, p. 7422-7427, 2008.

KORMAN, T. P.; HILL, J. A.; VU, T. N.; TSAI, S. C. Structural analysis of actinorhodin polyketide ketoreductase: cofactor binding and substrate specificity. **Biochemistry.**, v. 43, p. 14529-14538, 2004.

LANDETE, J. M.; MUÑOZ, R.; RIVAS, B. D. L.; RODRÍGUEZ, H. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. **food Chem.**, v., p. 274-285, 2008.

LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, p. 167-181, 2003.

LEE, S. Y.; CHO, J. Y.; LEE, H. J.; KIM, Y. H.; MIN, J. Enhancement of ornithine production in proline-supplemented *Corynebacterium glutamicum* by ornithine cyclodeaminase. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, p. 127-31, 2010.

LEE, S. Y.; KIM, H. U.; PARK, J. H.; PARK, J. M.; KIM, T. Y. Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. **Drug. Discov. Today**, v. 14, p. 78-88, 2009.



LEEPER, F. J.; VEDERAS, J. C.; CROTEAU, R.; DAVIS, E. M.; HARTMANN, T.; HEMSCHEIDT, T.; SANZ-CERVERA, J. F.; SHEN, B.; STOCKING, E. M.; WILLIAMS, R. M. **Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids**. Springer, 2000. 245 p.

LEIMKUHNER, C.; FRIDMAN, M.; LUPOLI, T.; WALKER, S.; WALSH, C. T.; KAHNE, D. Characterization of rhodosaminyl transfer by the AknS/AknT glycosylation complex and its use in reconstituting the biosynthetic pathway of aclacinomycin A. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 10546-10550, 2007.

LIN, Y. S.; KIESER, H. M.; HOPWOOD, D. A.; CHEN, C. W. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. **Mol. Microbiol.**, v. 10, p. 923-933, 1993.

LIU, G.; CHATER, K. F.; CHANDRA, G.; NIU, G.; TAN, H. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomyces. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 77, p. 112-143, 2013.

LOMBO, F.; ABDELFATTAH, M. S.; BRANA, A. F.; SALAS, J. A.; ROHR, J.; MENDEZ, C. Elucidation of oxygenation steps during oviedomycin biosynthesis and generation of derivatives with increased antitumor activity. **ChemBiochem.**, v. 10, p. 296-303, 2009.

LOMOVSKAYA, N.; OTTEN, S. L.; DOI-KATAYAMA, Y.; FONSTEIN, L.; LIU, X. C.; TAKATSU, T.; INVENTI-SOLARI, A.; FILIPPINI, S.; TORTI, F.; COLOMBO, A. L.; HUTCHINSON, C. R. Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 305-318, 1999.

LONGHURST, T. J.; O'NEILL, G. M.; HARVIE, R. M.; DAVEY, R. A. The anthracycline resistance-associated (*ara*) gene, a novel gene associated with multidrug resistance in a human leukaemia cell line. **Br. J. Cancer**, v. 74, p. 1331-1335, 1996.

LOWN, J. W. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. **Pharmacol. Ther.**, v. 60, p. 185-214, 1993.

LUTZ, S. W. Selektive Hydroxylierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon durch *Streptomyces* Stämme und molekulargenetische Arbeiten zur Identifizierung und Isolierung der Ionon-Hydroxylase aus *Streptomyces fradiae* Tü 27. **Institut für Technische Biochemie.**, v., p. 1999.

MA, J.; CAMPBELL, A.; KARLIN, S. Correlations between Shine-Dalgarno Sequences and Gene Features Such as Predicted Expression Levels and Operon Structures. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 5733-5745, 2002.

MALLA, S.; NIRLAULA, N. P.; LIOU, K.; SOHNG, J. K. Enhancement of doxorubicin production by expression of structural sugar biosynthesis and glycosyltransferase

genes in *Streptomyces peucetius*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 108, p. 92-98, 2009.

MALLA, S.; NIRLAULA, N. P.; LIOU, K.; SOHNG, J. K. Self-resistance mechanism in *Streptomyces peucetius*: overexpression of *drxA*, *drxB* and *drxC* for doxorubicin enhancement. **Microbiol. Res.**, v. 165, p. 259-267, 2010.

MANDELLI, F.; VIGNETTI, M.; SUCIU, S.; STASI, R.; PETTI, M. C.; MELONI, G.; MUUS, P.; MARMONT, F.; MARIE, J. P.; LABAR, B.; THOMAS, X.; DI RAIMONDO, F.; WILLEMZE, R.; LISO, V.; FERRARA, F.; BAILA, L.; FAZI, P.; ZITTOUN, R.; AMADORI, S.; DE WITTE, T. Daunorubicin versus mitoxantrone versus idarubicin as induction and consolidation chemotherapy for adults with acute myeloid leukemia: the EORTC and GIMEMA Groups Study AML-10. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, p. 5397-5403, 2009.

MEDEMA, M. H.; BLIN, K.; CIMERMANCIC, P.; DE JAGER, V.; ZAKRZEWSKI, P.; FISCHBACH, M. A.; WEBER, T.; TAKANO, E.; BREITLING, R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, p. W339-46, 2011.

MEDEMA, M. H.; TREFZER, A.; KOVALCHUK, A.; VAN DEN BERG, M.; MULLER, U.; HEIJNE, W.; WU, L.; ALAM, M. T.; RONNING, C. M.; NIERMAN, W. C.; BOVENBERG, R. A.; BREITLING, R.; TAKANO, E. The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. **Genome Biol. Evol.**, v. 2, p. 212-224, 2010.

MENDEZ, C.; SALAS, J. A. On the generation of novel anticancer drugs by recombinant DNA technology: the use of combinatorial biosynthesis to produce novel drugs. **Comb. Chem. High Throughput Screen**, v. 6, p. 513-526, 2003.

MENDEZ, C.; SALAS, J. A. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. **Res Microbiol**, v. 152, p. 341-50, 2001.

MENDEZ, C.; SALAS, J. A. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 341-350, 2001.

MENNA, P.; PAZ, O. G.; CHELLO, M.; COVINO, E.; SALVATORELLI, E.; MINOTTI, G. Anthracycline cardiotoxicity. **Expert. Opin. Drug. Saf.**, v. 11 p. S21-36, 2012.

MENZELLA, H. G.; REEVES, C. D. Combinatorial biosynthesis for drug development. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 238-245, 2007.

METSA-KETELA, M.; HALO, L.; MUNUKKA, E.; HAKALA, J.; MANTSALA, P.; YLIHONKO, K. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from

various streptomyces species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4472-4479, 2002.

METSÄ KETELÄ, M.; NIEMI, J.; MÄNTSÄLÄ, P.; SCHNEIDER, G. Anthracycline Biosynthesis: Genes, Enzymes and Mechanisms. In: **Anthracycline Chemistry and Biology I**. Springer Berlin Heidelberg; 2008. v. 282, p. 101-140.

MIN, G. S.; POWELL, J. R. Long-distance genome walking using the long and accurate polymerase chain reaction. **Biotechniques**, v. 24, p. 398-400, 1998.

MIN, Y.; LV, H.; ZHENG, Y. Fusion PCR-targeted tyICV gene deletion of *Streptomyces fradiae* for producing desmycosin, the direct precursor of tilmicosin. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 729-733, 2007.

MINOTTI, G.; RECALCATI, S.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CORNA, G.; CAIRO, G. Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. **Methods. Enzymol.**, v. 378, p. 340-361, 2004.

MIYAJIMA, T. BlastStation2. Ver. 2.72. TM Software. Inc. 2002. SOFTWARE. Disponível em: <<http://www.TMSoftware.net/en/>>.

MOORE, B. S.; HOPKE, J. N. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. **ChemBiochem.**, v. 2, p. 35-38, 2001.

MORDENTE, A.; MEUCCI, E.; MARTORANA, G. E.; GIARDINA, B.; MINOTTI, G. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. **IUBMB. Life.**, v. 52, p. 83-88, 2001.

MUSSO, M.; BOCCIARDI, R.; PARODI, S.; RAVAZZOLO, R.; CECCHERINI, I. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. **J. Mol. Diagn.**, v. 8, p. 544-550, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NIEMI, J.; KANTOLA, J.; YLIHONKO, K.; MÄNTSÄLÄ, P. Anthracycline Biosynthesis: Genes, Enzymes and Mechanisms. In: **Anthracycline Chemistry and Biology I**. Kerala, India: eds. Francisco Fierro & Juan Francisco Martin; 2002.

NIEMI, J.; MÄNTSÄLÄ, P. Nucleotide sequences and expression of genes from *Streptomyces purpurascens* that cause the production of new anthracyclines in *Streptomyces galilaeus*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 2942-2945, 1995.

NIKOLOULI, K.; MOSSIALOS, D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. **Biotechnol. Lett.**, v. 34, p. 1393-1403, 2012.

NORMARK, S.; BERGSTROM, S.; EDLUND, T.; GRUNDSTROM, T.; JAURIN, B.; LINDBERG, F. P.; OLSSON, O. Overlapping genes. **Annu. Rev. Genet.**, v. 17, p. 499-525, 1983.

OHNISHI, Y. The genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 4050-4060, 2008.

OKI, T.; MATSUZAWA, Y.; YOSHIMOTO, A.; NUMATA, K.; KITAMURA, I. New antitumor antibiotics aclacinomycins A and B. **J. Antibiot. (Tokyo)**, v. 28, p. 830-834, 1975.

OLANO, C.; MENDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor compounds from marine actinomycetes. **Mar. Drugs**, v. 7, p. 210-248, 2009.

OMURA, S.; IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; TAKAHASHI, C.; SHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; HORIKAWA, H.; NAKAZAWA, H.; OSONOE, T.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 12215-12220, 2001.

PALMU, K.; ISHIDA, K.; MANTSALA, P.; HERTWECK, C.; METSA-KETELA, M. Artificial reconstruction of two cryptic angucycline antibiotic biosynthetic pathways. **Chembiochem.**, v. 8, p. 1577-1584, 2007.

PENG, R.; VANNIEUWENHZE, M. S. A Model Study for Constructing the DEF-Benzoxocin Ring System of Menogaril and Nogalamycin via a Reductive Heck Cyclization. **Organic Letters.**, v. 14, p. 1962-1965, 2012.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiologia**. 5.ed edición. . Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2004. 1124 p.

PRICE, M. N.; ARKIN, A. P.; ALM, E. J. The life-cycle of operons. **PLoS Genet.**, v. 2, p. e96, 2006.

PROCÓPIO, R. E. D. L.; SILVA, I. R. D.; MARTINS, M. K.; AZEVEDO, J. L. D.; ARAÚJO, J. M. D. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases.**, v. 16, p. 466-471, 2012.

RATY, K.; HAUTALA, A.; TORKKELL, S.; KANTOLA, J.; MANTSALA, P.; HAKALA, J.; YLIHONKO, K. Characterization of mutations in aclacinomycin A-non-producing *Streptomyces galilaeus* strains with altered glycosylation patterns. **Microbiology**, v. 148, p. 3375-3384, 2002a.

RÄTY, K.; KANTOLA, J.; HAUTALA, A.; HAKALA, J.; YLIHONKO, K.; MANTSALA, P. Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. **Gene**, v. 293, p. 115-122, 2002b.

RÄTY, K.; KUNNARI, T.; HAKALA, J.; MANTSALA, P.; YLIHONKO, K. A gene cluster from *Streptomyces galilaeus* involved in glycosylation of aclarubicin. **Mol. Gen. Genet.**, v. 264, p. 164-172, 2000c.

RIDLEY, C. P.; LEE, H. Y.; KHOSLA, C. Evolution of polyketide synthases in bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 4595-4600, 2008.

RIX, U.; FISCHER, C.; REMSING, L. L.; ROHR, J. Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, p. 542-580, 2002.

RODRIGUEZ, A. M.; OLANO, C.; VILCHES, C.; MENDEZ, C.; SALAS, J. A. *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 8, p. 571-582, 1993.

SAENZ, C. **Estudo de genes envolvidos na via biossintética do antibiótico antitumoral cosmomicina**. 2007. 108 f. (Doutorado) - Biotecnologia USP/Instituto Butantan / IPT, São Paulo, São Paulo, 2007.

SAIER, M. H., JR.; PAULSEN, I. T.; SLIWINSKI, M. K.; PAO, S. S.; SKURRAY, R. A.; NIKAIIDO, H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. **FASEB J.**, v. 12, p. 265-274, 1998.

SANTAMARTA, I.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; PÉREZ-REDONDO, R.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. CcaR Is an Autoregulatory Protein That Binds to the ccaR and cefD-cmcl Promoters of the Cephamycin C-Clavulanic Acid Cluster in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 3106-3113, 2002.

SCHROEIJERS, A. B.; SCHEFFER, G. L.; REURS, A. W.; PIJNENBORG, A. C.; ABBONDANZA, C.; WIEMER, E. A.; SCHEPER, R. J. Detection of the Mr 110,000 lung resistance-related protein LRP/MVP with monoclonal antibodies. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 49, p. 1379-1385, 2001.

SCOTTI, C.; HUTCHINSON, C. R. Enhanced antibiotic production by manipulation of the *Streptomyces peucetius* dnrH and dnmT genes involved in doxorubicin (adriamycin) biosynthesis. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 7316-7321, 1996.

SEMÊDO, L. T.; LINHARES, A. A.; GOMES, R. C.; MANFIO, G. P.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiological Research**, v. 155, p. 291-299, 2001.

SHEN, F.; CHU, S.; BENICE, A. K.; BAILEY, B.; XUE, X.; ERICKSON, P. A.; MONTROSE, M. H.; BECK, W. T.; ERICKSON, L. C. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 324, p. 95-102, 2008.

SOFTBERRY. FGENESB: Bacterial Operon and Gene Prediction. 2010. Disponível

em: <<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>>. Acesso em: 22 fev. 2011.

SONG, D.; COUGHLIN, J.; JU, J.; ZHOU, X.; SHEN, B.; ZHAO, C.; DENG, Z. Alternative method for site-directed mutagenesis of complex polyketide synthase in *Streptomyces albus* JA3453. **Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)**, v. 40, p. 319-26, 2008.

SORENSEN, B. S.; SINDING, J.; ANDERSEN, A. H.; ALSNER, J.; JENSEN, P. B.; WESTERGAARD, O. Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. **J. Mol. Biol.**, v. 228, p. 778-786, 1992.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 380-416, 2001.

STROHL, W. R. **Biotechnology of antibiotics**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p.

STROHL, W. R. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 20, p. 961-974, 1992.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological Research**, v. 167, p. 571-580, 2012.

SULTANA, A. **Mechanistic insights into the biosynthesis of polyketide antibiotics**. 2006. 73 f. Thesis (Ph. D. Thesis Biological Science) - Institutionen för medicinsk biokemi och biofysik (MBB)/ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Stockholm, 2006.

SUN, Y.; HE, X.; LIANG, J.; ZHOU, X.; DENG, Z. Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, p. 303-310, 2009.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TATUSOV, T. ORF Finder. 2011. SOFTWARE. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>>. Acesso em: fev. 2012.

THOMAS, M. G.; CHAN, Y. A.; OZANICK, S. G. Deciphering tuberactinomycin biosynthesis: isolation, sequencing, and annotation of the viomycin biosynthetic gene cluster. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 47, p. 2823-2830, 2003.

TONOOKA, Y.; FUJISHIMA, M. Comparison and critical evaluation of PCR-mediated

methods to walk along the sequence of genomic DNA. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 85, p. 37-43, 2009.

TORKKELL, S.; KUNNARI, T.; PALMU, K.; MANTSALA, P.; HAKALA, J.; YLIHONKO, K. The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater* characterization of a 20-kb DNA region and generation of hybrid structures. **Mol. Genet. Genomics.**, v. 266, p. 276-288, 2001.

TORKKELL, S.; YLIHONKO, K.; HAKALA, J.; SKURNIK, M.; MANTSALA, P. Characterization of *Streptomyces nogalater* genes encoding enzymes involved in glycosylation steps in nogalamycin biosynthesis. **Mol. Gen. Genet.**, v. 256, p. 203-209, 1997.

TORRES-MONTANER, A.; HUGHES, D. A hypothetical anti-neoplastic mechanism associated to reserve cells. **J. Theor. Biol.**, v. 231, p. 239-248, 2004.

VASANTHAKUMAR, A.; KATTUSAMY, K.; PRASAD, R. Regulation of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius* - feed forward and feedback transcriptional control. **J. Basic. Microbiol.**, v. 53, p. 1-9, 2013.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 31, p. 3688-3691, 2003.

WANG, X.-J.; YAN, Y.-J.; ZHANG, B.; AN, J.; WANG, J.-J.; TIAN, J.; JIANG, L.; CHEN, Y.-H.; HUANG, S.-X.; YIN, M.; ZHANG, J.; GAO, A.-L.; LIU, C.-X.; ZHU, Z.-X.; XIANG, W.-S. Genome Sequence of the Milbemycin-Producing Bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 4526-4527, 2010.

WARRELL, R. P., JR. Aclacinomycin A: clinical development of a novel anthracycline antibiotic in the haematological cancers. **Drugs. Exp. Clin. Res.**, v. 12, p. 275-282, 1986.

WEBER, T.; WELZEL, K.; PELZER, S.; VENDE, A.; WOHLLEBEN, W. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. **J. Biotechnol.**, v. 106, p. 221-32, 2003.

WEISSMAN, K. J.; DAVID, A. H. Introduction to Polyketide Biosynthesis. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press; 2009. v. 459, p. 3-16.

WIERNIK, P. H.; DUTCHER, J. P. Clinical importance of anthracyclines in the treatment of acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 6, p. 67-69, 1992.

WOJTACKI, J. [Cardiac complications of antineoplastic chemotherapy]. **Pol. Arch. Med. Wewn.**, v. 100, p. 470-82, 1998.

XING, B.; RAO, J.; LIU, R. Novel beta-lactam antibiotics derivatives: their new applications as gene reporters, antitumor prodrugs and enzyme inhibitors. **Mini. Rev. Med. Chem.**, v. 8, p. 455-471, 2008.

XU, Z.; SCHENK, A.; HERTWECK, C. Molecular analysis of the benastatin biosynthetic pathway and genetic engineering of altered fatty acid-polyketide hybrids. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 6022-6030, 2007.

YANG, K.; HAN, L.; VINING, L. C. Regulation of jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: involvement of a repressor gene, jadR2. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 6111-7, 1995.

YLIHONKO, K.; TUIKKANEN, J.; JUSSILA, S.; CONG, L.; MANTSALA, P. A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway. **Mol. Gen. Genet.**, v. 251, p. 113-20, 1996.

YUAN, T.; YIN, C.; ZHU, C.; ZHU, B.; HU, Y. Improvement of antibiotic productivity by knock-out of *dauW* in *Streptomyces coeruleobidus*. **Microbiol. Res.**, v. 166, p. 539-547, 2011.

ZHANG, G.; TIAN, Y.; HU, K.; FENG, C.; TAN, H. SCO3900, co-transcribed with three downstream genes, is involved in the differentiation of *Streptomyces coelicolor*. **Curr. Microbiol.**, v. 60, p. 268-273, 2009.

ZHANG, L.; DEMAIN, A. L. **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**. Humana Press, 2005. 371 p.



## APÊNDICES

## APÊNDICE A - Seqüências obtidas com os iniciadores degenerados no genoma de *S.olindensis*

### >CycW

TCCTGCCCCGACGGCGAGTTCCTCTCGCTGGACCGGCTGAGTCTGACCACCCACACCGGCACGCACGTCGACGCGC  
 CCTCGCACTACGGCTCGAGGACGACGTACGGCACCGGCGTGCCCCGGCACATCGACGCGATGCCGCTGGAGTGGT  
 TCCTCGCCCCCGGGTGGTTCCTGGACGTCCGGGGCCGTGAGGCGGGCACGGTCGACGCGGCCGACCTGCGCAAGG  
 AGCTCGACCGGATCGGGTACGCGCTCGCCCCGTCCGACATCGTGATCCTGCACACCGGCGCCGCGCGTGGTCGG  
 GCACCAGCCGGTACTTCACCGACTTCGTCCGGTCTCGACGCGAGCGCCATCGCCTTCTGCTCGACGCGGGCATCC  
 GGGTGGTCGGCACCGACGCGTTCAGCCTG

### >CosM

GGGCACCGGGTGCTGGCGGTGGCCCGGCACCCGGCGCCCCACACCCGCCCGCACGCCTTCGTCCCCCTCGACGTC  
 GCCGGGACCGCGCCGGAGCGTCTCGCCGCGCTCCTCGACCGGTACGGCGTCACCGCGGTGGTCAATGCCACCGGC  
 GGCTGGGGCACACCGTCGAGGAGATGCGCCGGGCCACATCGACCTCCTGGAGCGCCTGGTCGACGGCTGTGCC  
 GCGACCTCCCGGCGGCTGCGGGTCGTCCAGCTGGGGTCGATCCACGAGTACGG

### >CycH

ATGCCGAACTGCGCGGCCCCGAGGCGTTCGCACTCGCGGTGAAGTGGCTGAAGCTCACGTTCTCCGAGGACGCG  
 TACCTGGAGGAGATCGGTTACGAGGAGAAAAGGCAGCTGGGTGCGGGCGAAACTCGCCCTGTACGGCCGCCAGGTG  
 GGCGAACTCGTGGGGATGCCCGCCACCGGACGCCGCTTCTCCGGGAGCAGATCCACCTCATCCGCATCGTCGAC  
 GACCTACCGCCAGCACTGGCCGGACTACCTCGGCACCTTCGGAGCAAGATCCGCGACCACCGCGACTGGCCGGAC  
 TACC

### >Keto

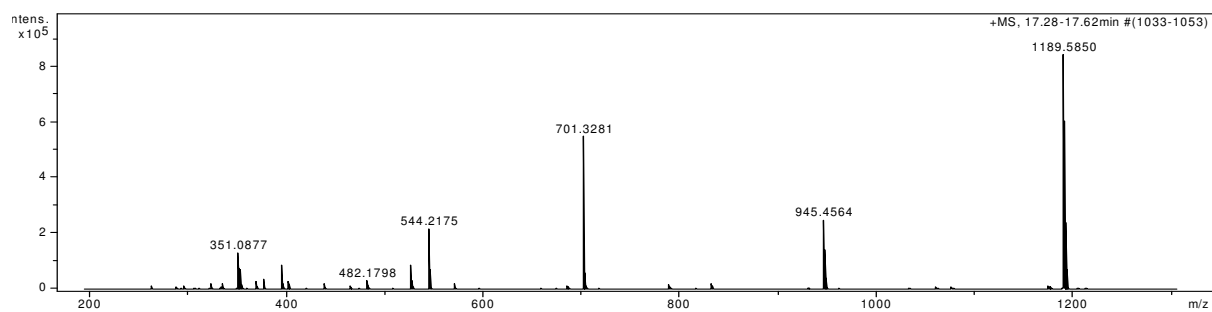
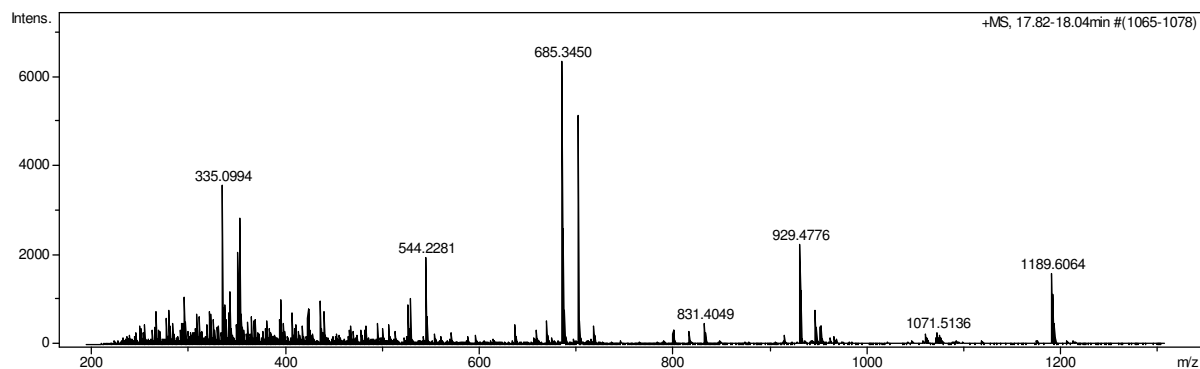
GCGTGTAACCTCTGCGCCCGGACGCCGACCGGGTTCGCGCTCACCGTCAAGGAACTGCGCGCCGAGGGCCACGAGG  
 TGGACGGCGCCGCTGCGACGTGCGCGAGGTCGCGCAGATCGAGGCCCTGATGTCCGCCCGCGTGGAGCGCCACG  
 GGCCCGTCGAGGTGCTCGTGAACAACGCCGGCCGACGCGGCGGACCGACCCACACGATCACCGACGAGCTGT  
 GGGACGACGTGATGGCCACCAACCTGGACAGCGTCTTCCGCGTCAACCGGGCCGCCCTGACCACCGGCCGCATGC  
 GGGAGGGCGGCTGGGGCCGGATCGTGAACATCGCCTCCACCGGCGGCAAGCAGGGCGTGGTGTGCGCGCCCCCT  
 ACTCCGCTCCAAGCACGGCGTCGTCGGCTTACCAAGGCCCTGGGCCTGGAGCTGGCCAAGACCGGCATCACGG  
 TCAACGCGGTCTGCCCCGTTACGTGGAGACCCCCATGGCGGAGCGGGTCCGGCAGGGCTACGCCGCCGCTGGG  
 ACACCACGGAGGAGGAGTCTCGACCGGTTCCAGGCAAGATCCCGCTCGGCCGCTACACCACGCCCGACGAGG  
 TGGCGGGCATGGTCGGCTACCTGCTGACCGACGCG

### >Met

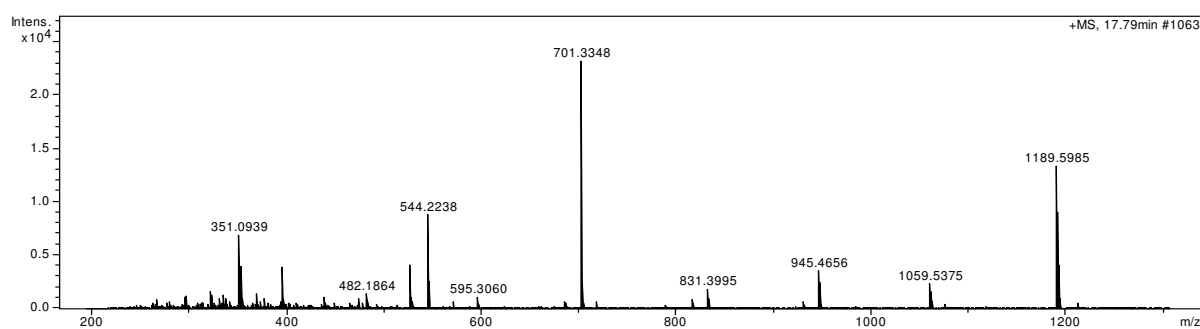
CCCGGATGGTGGAGGAGGCCCGGCGGCAGGCCGGCGCGCTCGGCGCCCGGCACGTCGAGGTCCGGGTCATGGACG  
 GCGAGCACCCCGACCTTCGCCCCGCTCGTTCGACGTGGTGACCGGCAGCTACAGCCTGATCTTCTGCCCCGACG  
 CTCCGGCCGCGCTCCCCGGTACGCGGCCCTGCTGCGGCCGGTGGCCGGATCGCCTTACCAGCCCCGTTCTCA  
 CGGAGGACACGTTCCCTTCTGCGCCCCGTGTTACGGACCTCATCCCGAGCGGCTGCTGCGCAACCTGCCGG  
 CGGACTGGCGCCCCGACGCGCTGAAGCGGCGGTTCAACAGCTGGCTGCAGGACACCGACGACCTGACCCGGACGA  
 TGGTGC CGCCGGGTTTCGACGACGTGGAGATCGCCGACGAGCACATCGATCT

## APÊNDICE B - Espectro de massas do composto cosmomicina D

FP2

(WT) *S. olindensis*

pEM4AS



pEM4AY

