NATALIA CERRONE ARAUJO

**Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições
C3'' e C6' da biossíntese de gentamicina**

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
2018

NATALIA CERRONE ARAUJO

**Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições
C3'' e C6' da biossíntese de gentamicina**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

Versão Corrigida.

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cerrone Araujo, Natalia

Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições C3" e C6' da biossíntese de gentamicina / Natalia Cerrone Araujo; orientador Marcio Vinicius Bertacine Dias. -- São Paulo, 2018.

74 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Produtos naturais. 2. Aminoglicosídeo. 3. Gentamicina. 4. Cristalografia. I. Bertacine Dias, Marcio Vinicius , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Natalia Cerrone Araujo

Título da Dissertação: Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições C3'' e C6' da biossíntese de gentamicina

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7732 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 757/15 referente ao projeto intitulado: "*Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação da posição C3" da biossíntese de gentamicina X2*" sob a responsabilidade de **Natalia Cerrone Araújo**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Márcio Vinicius Bertacine Dias**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPESH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 31 de agosto de 2015.

PROF. DR. ANDERSON DE SÁ NUNES
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M. A. ZANOTTO
Coordenador da CEPESH - ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.007.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção **757/2015**, emitido em 31/08/2015, e por solicitação do Prof. Dr. **Márcio Vinícius Bertacine Dias**, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto da aluna **Natalia Cerrone Araújo**, foi alterado para "**Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação das posições C3" e C6' da biossíntese de gentamicina**" para melhor adequação ao estudo desenvolvido.

São Paulo, 20 de outubro de 2017.

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Prof. Dra. **Camila Squarzon Dale**
Coordenadora CEP SH-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Silvana, por ter me presenteado aos 7 anos com um livro intitulado Viagem ao Mundo dos Micróbios, no qual uma menina era encolhida e se aventurava pelo mundo dos microrganismos, conhecendo a penicilina. Agradeço por ter plantado em mim a sementinha da curiosidade.

Aos meus colegas de trabalho com quem tive o enorme prazer de conviver durante estes anos: À Priscila, que dedicou o pouco do seu tempo para me ensinar toda a base necessária e também pela amizade, à Larissa que compartilhou seu vasto conhecimento sobre as técnicas e por sua doce companhia, atenção e amizade. Ao João Pimenta que sempre ofereceu ajuda com um sorriso no rosto, à Catharina por sempre me ouvir e me acalmar com sua sensatez, e também por todos os trabalhos em dupla com quem tive a sorte de compartilhar. Ao Gerardo, por sempre me lembrar sobre a importância de ser correta, ética e comprometida, ao Xiba, pelos incontáveis momentos de descontração, por toda força e por compartilhar todo seu conhecimento com a maior atenção e humildade possível. Jademilson por ampliar minha base sobre química e cristalografia e por ser um ótimo avaliador de apresentações. À querida Tábata por deixar a vida mais leve. Ao amigo Sair que sempre esteve disponível para ajudar em qualquer dificuldade que eu tivesse, desde a vida acadêmica até a pessoal, e por fim, mas não menos importante, à Fer por ser sempre tão prestativa, por toda ajuda e apoio fornecidos dentro e fora do laboratório.

Aos colegas do laboratório vizinho, Ana, Cris e Marcelo que sempre estiveram disponíveis para discutir ciência e para descontrair, e à Pam, por dividir o lab e o apê comigo, agradeço por ter podido contar com sua amizade durante esse período tão intenso das nossas vidas.

Sou muito grata ao grupo LBEA fármacos e transportadores, com quem tive a sorte de conviver esses anos, por todo o conhecimento compartilhado, sempre com carinho e atenção, este trabalho e minha jornada, sem cada um deles, não teriam sido tão ricos.

Agradeço também à toda minha família por todo apoio, toda compreensão e a enorme paciência (incluo aqui Marina, Joaquim e Alex, minha família do coração). Agradeço em especial à minha Nonna Osmil, a quem dedico este trabalho, pois sem seu apoio emocional nada disso seria possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias pela orientação e pela oportunidade de realizar este projeto.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) (número do processo: 1566475 / 2015-2017).

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro e ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB).

À Universidade de São Paulo (USP) pela infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho e também pela oportunidade de realizar Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE), onde pude aprimorar a atividade didática de graduação através de preparação Pedagógica e estágio Supervisionado em Docência.

Agradeço também ao grupo do Prof. Peter Leadlay da Universidade de Cambridge, pelos plasmídeos cedidos. Aos coordenadores e técnicos do Laboratório de Fluidos Complexos do Departamento de Física da Universidade de São Paulo e aos coordenadores e técnicos da linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e da linha P13, PETRA III, *Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESY)* na Alemanha, por toda assistência prestada.

*“Eu tenho medo de viver uma vida
onde eu poderia ter realizado algo e
não realizei.”*

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

ARAÚJO N. C. **Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições C3'' e C6' da biossíntese de gentamicina.** 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, 2018.

Antibióticos antimicrobianos são moléculas capazes de inibir o crescimento de microrganismos, na maioria, produtos naturais derivados de fungos ou bactérias que bloqueiam processos cruciais para a sobrevivência de microrganismos. A gentamicina é um aminoglicosídeo 4,6 bisubstituído que exerce papel importante no tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas; apresenta uma complexa e pouco entendida rota de biossíntese. Dessa via, a desidrogenase GenD2 e a aminotransferase GenS2 atuam sobre a posição C3'' da gentamicina A2 produzindo gentamicina X2, e a GenB2 atua na posição C6' epimerizando a molécula de gentamicina C2_a. As enzimas foram purificadas por cromatografia de afinidade e por exclusão de tamanho, no tampão composto por 50 mM de Tris HCl, 100 mM de NaCl pH 7,7. Com a intenção de compreender a rota de biossíntese da gentamicina, o objetivo deste trabalho foi estudar estruturalmente as enzimas GenD2, GenS2 e GenB2 em complexo com seus cofatores e ligantes. Cristais da enzima GenD2 difrataram, porém não foi possível determinar sua estrutura, análises biofísicas através de calorimetria de titulação isotérmica e por gel filtração analítica, puderam confirmar seu cofator, o NAD⁺, e um estado oligomérico compatível à um tetrâmero em solução. A enzima GenB2 em complexo com o cofator PMP e gentamicina X2 difratou a uma resolução de 1,7 Å e foi resolvida por substituição molecular, na qual foi identificada uma molécula na unidade assimétrica pertencente ao grupo espacial C 2 2 2₁. Essa enzima é um homodímero, seu sítio de ligação está na interface entre os protômeros com contribuições de resíduos de ambas as moléculas. A região onde se encontra o anel pirimidínico do PMP é carregada positivamente, favorecendo a interação com o cofator. A cavidade onde se encontra posicionada a gentamicina X2, é bastante ampla e eletronegativa, por seu substrato ser um aminoglicosídeo. A lisina 227 é o resíduo que realiza a clássica base de Schiff, presente em enzimas PLP/PMP dependentes, entre o anel pirimidínico do PMP e a tirosina 124. Os avanços promissores sobre a GenD2 e a compreensão estrutural da GenB2 auxiliam no entendimento da via de biossíntese de gentamicina bem como contribuem para o crescente entendimento sobre o enovelamento de enzimas PLP dependentes.

Palavras-chave: Produtos naturais. Aminoglicosídeo. Gentamicina. Cristalografia.

ABSTRACT

ARAÚJO, N. C. **Structural study of enzymes involved in the modification at the C3'' and C6' positions of gentamicin** C. 2018. 70 f. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, 2018.

Antimicrobial antibiotics are molecules capable of inhibiting the growth of microorganisms, most of them are natural products derived from fungi or bacteria that block some crucial processes to the survival of microorganisms. Gentamicin is a 4,6 disubstituted aminoglycoside that plays an important role in the treatment of severe infections caused by gram-negative bacteria. This aminoglycoside presents a complex and poorly understood biosynthesis route. From this route, GenD2 dehydrogenase and GenS2 aminotransferase have been identified to act at C3' position of gentamicin A2 producing gentamicin X2, and the enzyme GenB2 acts at the C6'' position, epimerizing the gentamicin C2_a molecule. These enzymes were purified by immobilized metal ion affinity and size exclusion chromatography in a buffer composed of 50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl pH 7,7. In order to understand the route of gentamicin biosynthesis, this work aims to study the enzymes GenD2, GenS2 and GenB2 in complex with their cofactors and ligands. Some crystals of GenD2 diffracted, however it was not possible to determine its structure. Biophysical analysis by isothermal titration calorimetry and analytical gel filtration; confirmed NAD⁺ as its cofactor, and an oligomeric state compatible with a tetramer in solution. GenB2 crystals in complex with PMP cofactor and gentamicin X2 diffracted at a resolution of 1.7 Å and its structure was resolved by molecular replacement, which presented one molecule in the asymmetric unit belonging to the space group C 2 2 2₁. This enzyme is a homodimer, the binding site is located at the interface between protomers and residues from both molecules contribute toward the formation of the active site. The region where the PMP pyrimidine ring is located is positively charged, favoring the interaction with the cofactor. The active site cavity, where gentamicin X2 is positioned, is a large groove and predominantly electronegative, compatible with the substrate of the enzyme, which is an aminoglycoside. Lysine 227 is the key residue that performs the classical Schiff base, commonly present in PLP/PMP dependent enzymes, between the PMP pyrimidine ring and tyrosine 124. Promising advances on GenD2 and the structural understanding of GenB2 aids in the understanding of the gentamicin biosynthetic pathway as well as contribute towards the knowledge about the folding of PLP dependent enzymes.

Keywords: Natural products. aminoglycosides. gentamicin. crystallography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação dos aminoglicosídeos.....	18
Figura 2. Estruturas de aminoglicosídeos apresentando o aminociclitol das duas principais classes.	19
Figura 3. Estrutura química da gentamicina, um aminoglicosídeo 4,6 bisubstituído.....	21
Figura 4. Genes relacionados da rota biossintética de aminoglicosídeos.....	22
Figura 5. Via de biossíntese da gentamicina resumida.	23
Figura 6. Alinhamento de sequências entre GenD2 e uma oxidoreductase de <i>Desulfotobacterium hafniense</i> , código PDB: 3DB2.....	24
Figura 7. Alinhamento entre GenS2 e uma aminotransferase de butirrosina, código PDB: 2C7T.	25
Figura 8. Continuação da via de biossíntese de gentamicina previamente mostrada na figura 5. A imagem mostra um dos ramos finais da via de biossíntese de gentamicina a partir da gentamicina X2.....	26
Figura 9. Alinhamento entre GenB2 e uma isomerase de <i>Thermus thermophilus</i> , código PDB: 2E7U.....	28
Figura 10. Purificação por afinidade da proteína GenD2.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 11. Purificação por exclusão molecular da proteína GenD2.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 12. Purificação por afinidade da proteína GenD2 com selenometionina. Erro! Indicador não definido.	
Figura 13. Purificação por exclusão molecular da proteína GenD2 com selenometionina.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 14. Gel filtração analítica em coluna 16/60 Superdex 200 da GenD2 (145,81 kDa) e dos marcadores moleculares:.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 15. Purificação por afinidade da proteína GenS2.	Erro! Indicador não definido.
Figura 16. Purificação por exclusão molecular da proteína GenS2.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 17. Purificação por afinidade da proteína GenB2.	Erro! Indicador não definido.
Figura 18. Purificação por exclusão molecular da proteína GenB2.	Erro! Indicador não definido.
Figura 19. Curvas de desenovelamento térmico da GenD2 realizada pelo experimento de <i>Differential Scanning fluorimetry</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 20. Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica utilizando o microcalorímetro iTC200 (Mricrocal).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 21. Tetrâmero de GenD2 gerado por operações de simetria.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 22. Dímero de GenD2 em complexo com o cofator NAD ⁺	Erro! Indicador não definido.
Figura 23. Monômero de GenD2 em complexo com o cofator NAD ⁺	Erro! Indicador não definido.
Figura 24. Molécula de GenD2 em sobreposição com a oxidoreductase de <i>Desulfotobacterium hafniense</i> PDB: 3DB2.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 25. Dímero de GenB2 evidenciando o sítio ativo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 26. Superfície de potencial eletrostático da holoenzima GenB2.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 27. Sítio ativo evidenciando os resíduos envolvidos na interação.	Erro! Indicador não definido.
Figura 28. Imagem plana do sítio ativo e as interações estabelecidas nele.	Erro! Indicador não definido.
Figura 29. Mapa de densidade eletrônica da lisina (A), Piridoxamina-5'-fosfato (B) e gentamicina X2 (C).	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cristais da enzima GenD2 e condição de cristalização. Erro! Indicador não definido.

Tabela 2. Cristais da enzima GenB2 e condição de cristalização. Erro! Indicador não definido.

Tabela 3. Dados estatísticos de coleta e refinamento cristalográfico da enzima GenD2.... Erro! Indicador não definido.

Tabela 4. Dados estatísticos de coleta e refinamento cristalográfico da enzima GenB2 em complexo com gentamicina X2..... Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Å	Ångström
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma (10^{-6} g)
µL	Microlitro (10^{-6} L)
µM	Micromolar (10^{-6} M)
APS	Persulfato de amônio
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cm	centímetro
CV	volume de coluna
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	aceleração de gravidade
g	grama
h	hora
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> (Cromatografia de afinidade por íons metálicos)
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (Calorimetria de titulação isotérmica)
K _d	Constante de dissociação
kDa	QuiloDalton (10^3 Dalton)
L	Litro
M	Molar (mol/L)
mg	miligrama (10^{-3} g)
min	minuto

mL	Mililitro (10^{-3} L)
mM	Milimolar (10^{-3} M)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
ng	Nanograma (10^{-9} g)
nm	nanômetro
OD ₆₀₀	Densidade ótica à 600 nm
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro aberto de leitura)
pb	pares de base
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PMP	Piridoxamina-5'-fosfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonilo
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis</i>
Se	selênio
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
V	Volts
v/v	Volume por volume
w/v	Massa por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
<u>1.1. Antibióticos antimicrobianos naturais</u>	17
<u>1.2. Aminoglicosídeos</u>	17
<u>1.3. Gentamicina</u>	20
<u>1.4. Enzimas que atuam na posição C3'' da biossíntese de gentamicina</u>	22
<u>1.4. Enzimas que atuam na posição C6' da biossíntese de gentamicina</u>	25
2 OBJETIVOS.....	Erro! Indicador não definido.
3 MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
<u>3.1. Expressão e purificação das proteínas</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3.1.1 Expressão e purificação com selenometionina</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3.1.2 Gel Filtração Analítica</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3.2. Confirmação da presença de proteína</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3.3. Ensaio de deslocamento térmico</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3.4. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3.5. Cristalização das proteínas</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3.6. Coleta e processamento de dados de difração por Raios X</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3.7. Resolução de estruturas e refinamento cristalográfico</u>	Erro! Indicador não definido.
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
<u>4.1 Expressão e purificação</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.1.1 GenD2</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.1.2 GenS2</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.1.3 GenB2</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.2 Ensaio de deslocamento térmico</u>	Erro! Indicador não definido.

<u>4.3 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.4 Ensaios de Cristalização</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.4.1-GenS2</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.4.2-GenD2</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.4.3-GenB2</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.5 Dados Estruturais</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.5.1-GenD2</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.5.2-GenB2</u>	Erro! Indicador não definido.
5 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1. Antibióticos antimicrobianos naturais

Os antibióticos antimicrobianos são moléculas capazes de inibir o crescimento de microrganismos. Estas moléculas podem ser produtos naturais como a penicilina e a estreptomicina, semissintéticos como amicacina ou cefalosporina, ou também produzidas sinteticamente pelo ser humano, como as sulfonamidas e quinolonas (ZHANG, 2005). A maior parte dos antibióticos são produtos naturais derivados de fungos ou bactérias, geralmente esses compostos são gerados a partir do metabolismo secundário desses microrganismos e foram selecionados evolutivamente ao longo de milhares de anos em resposta às necessidades e desafios impostos pelo ambiente. A pressão seletiva sobre os organismos produtores destes compostos gerou uma gama enorme de moléculas capazes de bloquear alguns processos cruciais na sobrevivência de microrganismos e essa propriedade é utilizada pelos seres humanos para o tratamento contra bactérias ou fungos patogênicos. Enquanto milhares de moléculas têm sido reportadas como tendo propriedades antibióticas, somente uma pequena parcela delas tem sua eficácia e segurança comprovadas para o tratamento de doenças bacterianas que acometem os seres humanos. (WALSH, 2003).

Os antibióticos antibacterianos podem ser classificados de diversas maneiras. A classificação mais comum é aquela que divide as principais classes de antibióticos de acordo com seus alvos, que podem ser: (1) Parede celular bacteriana, inibindo a sua síntese, ex. β -lactâmicos, (2) Ribossomos bacterianos, ex. aminoglicosídeos que bloqueiam a síntese de proteínas, (3) DNA bacteriano, bloqueando sua replicação e reparo, ex. quinolonas, e (4) Via de biossíntese de folato, essencial por fornecer unidades monoméricas para a síntese de DNA, que é bloqueada por sulfas (WALSH, 2003).

1.2. Aminoglicosídeos

Dentre os antibióticos que inibem a síntese proteica bacteriana, encontramos os aminoglicosídeos, tais como a estreptomicina, canamicina, gentamicina e tobramicina. O primeiro aminoglicosídeo descoberto foi a estreptomicina, isolada de *Streptomyces griseus*, em 1944 por Selman Waksman. Esta descoberta causou uma revolução na medicina, haja visto que esse foi o primeiro agente antibacteriano efetivo para o tratamento da tuberculose. Atualmente,

a estreptomicina é substituída por fármacos mais eficazes e com menos efeitos colaterais, apesar de ainda ter importância significativa como antibiótico de segunda linha (ARYA, 2006). Após esta descoberta, outros aminoglicosídeos foram descritos: neomicina (1949), canamicina (1957), paromomicina (1959), gentamicina (1963), tobramicina (1967), sisomicina (1970), butirosina (1971), lividomicina (1971), entre outros (Park, 2012). Entretanto, devido à alta nefrotoxicidade e ototoxicidade, comum aos aminoglicosídeos, a maioria não foi introduzida na clínica humana e veterinária.

Diferentemente da maioria dos antibióticos que tem ação no ribossomo bacteriano, os aminoglicosídeos são bactericidas. O mecanismo de ação destes antibacterianos se dá pela sua ligação ao RNA 16S da subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Essa ligação pode levar ao bloqueio da síntese proteica ou gerar proteínas não funcionais pela incorporação de aminoácidos incorretos. Essa ação é o que torna tal classe de antimicrobianos letal para a bactéria alvo. (Figura 1) (COX, et al., 1964, CHAMBERS, 2003, PARK 2012).

Figura 1. Mecanismo de ação dos aminoglicosídeos

O aminoglicosídeo se liga à subunidade 30S do ribossomo bacteriano podendo: A. bloquear o início da síntese de proteínas; B. levar a liberação do complexo ribossomal causando uma parada prematura da tradução ou C. levar a adição de um aminoácido incorreto à proteína.

Fonte: Chambers (2003).

Os aminoglicosídeos são produzidos principalmente por actinomicetos, são produtos do metabolismo secundário de carboidratos e podem ser descritos quimicamente por apresentarem um núcleo derivado de um aminociclitol unido a vários outros aminoaçúcares ou desoxiaçúcares por ligação glicosídica (WALSH, 2003, CHAMBERS, 2003). A combinação da ligação destas moléculas de açúcares e suas funções resultam na especificidade do fármaco

ao ribossomo bacteriano, pois sua característica protonada em pH fisiológico contribui para a ligação à região alvo do ribossomo, que é polianiônica (KUDO; EGUCHI, 2009).

Duas categorias principais de aminoglicosídeos são observadas. A primeira é representada por antibióticos que possuem o núcleo aminociclitol modificado para estreptidina, como a estreptomicina, fortimicina A e bluensomicina; e a segunda, por antibióticos que contém o grupo 2-desoxiestreptamina (2-DOS) tais como a neomicina, canamicina e gentamicina (WALSH, 2003) (Figura 2). Dentro da segunda categoria, os aminoglicosídeos também podem ser subdivididos de acordo com a posição das substituições do grupo 2-DOS, podendo ser 4,5-bisubstituídos (butirosinas e neomicinas) ou 4,6-bisubstituídos (gentamicinas e tobramicinas).

Figura 2. Estruturas de aminoglicosídeos apresentando o aminociclitol das duas principais classes.

A. Estreptomicina com seu aminociclitol modificado para estreptidina, **B.** Gentamicina C₁ com seu núcleo modificado para 2-desoxiestreptamina.

A onipresença e a localização geralmente central dos grupos estreptidina ou 2-DOS na estrutura de todos os aminoglicosídeos demonstram que esses grupos têm um papel fundamental na atividade biológica, como pôde ser observado pela estrutura cristalográfica da unidade 30S do ribossomo em complexo com alguns aminoglicosídeos (CARTER, et al., 2000). Além disso, para corroborar este fato, experimentos medindo a afinidade do composto 2-DOS isoladamente, sem qualquer decoração de aminoaçúcares, mostraram que há uma ligação na ordem de micromolar nas alças tipo *hairpin* do RNA ribossômico de bactérias (LIU, et al., 2004). Recentemente essa característica dos aminoglicosídeos de causar um erro de leitura do mRNA tem sido aplicada de forma indireta na terapia gênica; a administração de gentamicina ou compostos derivados em pacientes com fibrose cística pode causar a supressão, mesmo que parcial, desta doença genética que afeta predominantemente os pulmões, devido a uma alteração

no transporte de íons através das membranas das celulares. (AMARAL, 2015, PRAYLE; SMYTH, 2010), entretanto as bases moleculares que causam esse efeito ainda não foram completamente elucidadas.

Os genes responsáveis pela biossíntese de aminoglicosídeos geralmente estão organizados em *clusters* gênicos, que podem apresentar mais de 40 ORFs (*Open Reading Frame*) para a biossíntese de uma única molécula (ARYA, 2006). Recentemente mais de 15 *clusters* gênicos para aminoglicosídeos foram clonados e analisados (KUDO; EGUCHI, 2009). Embora esses dados genéticos não sejam suficientes para obter conclusões sobre aspectos relacionados à produção, os mesmos são cruciais para o entendimento da enzimologia da biossíntese, resistência aos aminoglicosídeos, regulação, localização genômica e vias de disseminação entre bactérias (KUDO; EGUCHI, 2009). Além disso, essas informações são essenciais para a aplicação da biologia sintética ou metabólica para obtenção de novos aminoglicosídeos que possam ser menos tóxicos se manipulados geneticamente (PARK, et al., 2011, PARK, et al., 2013).

Estreptomicina, além de ter sido o primeiro aminoglicosídeo descoberto, também foi o primeiro a ter seu *cluster* gênico determinado em *Streptomyces griseus*, o que abriu oportunidade para a descoberta de vários outros *clusters* gênicos, incluindo, tobramicina, canamicina, gentamicina, entre outros (ARYA, 2006, KUDO; EGUCHI, 2009). Entretanto a bioquímica enzimática relacionada com a biossíntese desses antibióticos não tem acompanhado a mesma velocidade que a quantidade de informações genéticas obtidas, sendo ainda muito pouco o conhecimento a respeito desse assunto.

1.3. Gentamicina

A gentamicina foi descrita por Weinstein e colaboradores em 1963 e é produto de fermentação do actinomiceto *Micromonospora echinospora* (WEINSTEIN, et al., 1963). É um antibiótico representante do grupo dos aminoglicosídeos e apresenta em seu núcleo o grupo 2-desoxiestreptamina 4,6 bissubstituído. Na posição C4 deste núcleo está ligada uma molécula de açúcar purpurosamina e na posição C6 um açúcar garosamina (Figura 3) (LLEWELLYN; SPENCER, 2006). A gentamicina é isolada da bactéria produtora como uma mistura de cinco componentes C1, C2, C1_a, C2_a e C2_b (YU et al., 2017), e em sua forma terapêutica a

gentamicina compreende três moléculas, C₁, C_{1a} e C₂ (Figura 3), que diferem somente no grau de metilação da posição C6' do açúcar ligado ao C4 do 2-DOS (PARK, et al., 2008).

Figura 3. Estrutura química da gentamicina, um aminoglicosídeo 4,6 bisubstituído.

Molécula de gentamicina evidenciando suas três porções: purpurosamina, 2-desoxiestreptamina e garosamina. No quadro os radicais das gentamicinas C₁, C_{1a} e C₂, complexo utilizado como fármaco.

Este antibiótico exerce papel importante no tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas como as dos gêneros *Pseudomonas*, *Proteus* e *Serratia*, e é utilizado com frequência em combinação com um β -lactâmico contra bactérias resistentes à antibióticos menos tóxicos (PALOMINO; PACHÓN, 2003). É também empregado no tratamento de pacientes infectados com bactérias oportunistas que acometem pacientes imunodeprimidos. Seu uso também é recorrente contra infecções causadas por algumas bactérias gram-positivas, como as representantes do gênero *Staphylococcus* (HAINRICHSON et al, 2007). Além disso, a gentamicina apresenta eficiência em algumas células cancerígenas e em determinadas doenças hereditárias associadas com a parada de leitura prematura do ribossomo (CUCCARESE, et al., 2013, HAINRICHSON, et al., 2008, LINDE; KEREM, 2008, WALSH, 2003).

A determinação do *cluster* gênico para a biossíntese de gentamicina foi realizada paralelamente por dois grupos de pesquisa que identificaram todos os genes requeridos na via. (KHAREL, et al., 2004, UNWIN, et al., 2004). A biossíntese de gentamicina apresenta algumas etapas de reação comuns a outros aminoglicosídeos como canamicina e tobramicina (Figura 4) (KUDO; EGUCHI, 2009), mas difere por apresentarem várias enzimas únicas responsáveis pela síntese de seus açúcares pouco usuais.

Figura 4. Genes relacionados da rota biossintética de aminoglicosídeos.

Clusters gênicos da canamicina (KAN), tobramicina (TOB) e gentamicina (GEN). Circuladas em vermelho estão as enzimas estudadas no presente trabalho.

Modificado de: ARYA (2006).

Nosso grupo de pesquisa em colaboração com o grupo do Prof. Peter Leadlay da Universidade de Cambridge, vêm estudando estruturalmente (grupo brasileiro) e funcionalmente (grupo britânico) várias enzimas responsáveis pela formação de gentamicina e de seu análogo estrutural sisomicina. Recentemente, o grupo do Prof. Peter Leadlay tem feito significativo avanço nos passos finais da biossíntese de gentamicina e elucidado a função de várias transaminases (GUO, et al., 2014), além de identificar as rotas finais para a produção de gentamicina X2 a partir de gentamicina A (HUANG, et al., 2015). Por outro lado, nosso grupo determinou a estrutura de uma N-metiltransferase que metila a posição C3'' e é relacionada com o passo final da biossíntese da gentamicina A (BURY et al., 2017).

1.4. Enzimas que atuam na posição C3'' da biossíntese de gentamicina

A Gentamicina A2 é um intermediário na biossíntese do complexo C da gentamicina (PARK, et al., 2008) e dentre as enzimas que participam da via de biossíntese deste aminoglicosídeo, foi confirmada a atuação das enzimas GenD2 e GenS2 sobre a gentamicina A2 (Figura 5).

A enzima GenD2 realiza inicialmente a oxidação do grupo hidroxil da posição C3'', e a GenS2 a posterior aminação dessa mesma posição. Essas enzimas exercem contribuições catalíticas essenciais nas etapas de biossíntese, sendo cruciais para a transformação de gentamicina A2 em gentamicina X2 (Figura 5). Existem várias evidências de enzimas da biossíntese de aminoglicosídeos que se apresentam promíscuas ou exercem dupla função

(HUANG et al., 2007, PARK et al., 2011) porém as enzimas GenD2 e GenS2 parecem ser as únicas envolvidas nas etapas de oxidação e aminação da posição C3'' da gentamicina A2 e não são requeridas para outras etapas da mesma via. Essas duas enzimas também foram testadas em relação à sua promiscuidade a substratos de outras vias e foram capazes de oxidar e aminar a canamicina B e a tobramicina, assim como ocorre na gentamicina A2 (HUANG, et al., 2015).

Figura 5. Via de biossíntese da gentamicina resumida.

A partir de D-glucose-6 fosfato dá-se o início da biossíntese do aminoglicosídeo até a formação de (1) – gentamicina A2, onde atua a enzima GenD2 na posição C3'' (evidenciada em amarelo). (2) – 3''-desidro-3''-oxi-gentamicina A2 onde atua a enzima GenS2 na posição em amarelo. (3) – 3''-desidro-3''-amino-gentamicina A2. Após etapas enzimáticas realizadas por outras enzimas há a formação de (4) – gentamicina X2. (5) – G418.

Modificado de: HUANG et al, (2015).

A enzima GenD2 (Uniprot: Q70KD1) apresenta 341 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 36507.20 Da. Acredita-se que a GenD2 seja uma desidrogenase NAD dependente, com significativa identidade com Sis12, KanD2 e TobD2 da biossíntese de sisomicina,

canamicina e tobramicina respectivamente. A função desta enzima tem sido validada tanto *in vitro* quanto *in vivo* por HUANG et al, (2015). A mesma atua na oxidação da posição C3'' da gentamicina A2 possibilitando a posterior atuação da enzima GenS2. A GenD2 apresenta aproximadamente 27% de identidade em 77% de cobertura com a oxidoreductase dependente de NAD de *Desulfitobacterium hafniense* (Código PDB: 3DB2), depositada no *Protein Data Bank*, que teve sua estrutura tridimensional determinada por consórcio de biologia estrutural e não apresenta função definida até o presente momento (Figura 6).

Estruturalmente enzimas desidrogenases NAD dependentes apresentam enovelamento do tipo *Rossmann fold*, possuem uma região de ligação com a coenzima conservada em várias outras proteínas da mesma família. Esse tipo de enovelamento caracteriza-se por conter uma série de α -hélices e fitas- β alternadas. (EVENTOFF; ROSSMANN, 1976, HANUKOGLU, 2015). É o único motivo $\beta \alpha \beta \alpha \beta$ que se liga a um mononucleotídeo (BOTTONS, 2002).

Figura 6. Alinhamento de sequências entre GenD2 e uma oxidoreductase de *Desulfitobacterium hafniense*, código PDB: 3DB2. Foi utilizado o programa ESPrpt 3. Os resíduos em branco emoldurados em vermelho são resíduos idênticos; os resíduos em preto com fundo amarelo são diferentes, porém apresentam a mesma propriedade química, apresentando mais de 70% de similaridade; e os não emoldurados são diferentes.

A enzima GenS2 tem ação de aminotransferase, como o nome já sugere, essa enzima transfere um grupo amina para a posição do carbono 3'' da gentamicina A2, a mesma posição da anterior atuação da enzima GenD2 na etapa de formação da gentamicina X2. A enzima GenS2 (Uniprot: Q70KD4) apresenta 418 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 46794.25 Da. GenS2 é predita ser uma aminotransferase dependente de PLP com alta identidade à Sis15, KanS2 e TobS2 das vias de biossíntese de sisomicina, canamicina e

Estudos apontam que a gentamicina A2 é o primeiro pseudo-trissacarídeo precursor do complexo gentamicina C (PARK, et al., 2008, GUO, et al., 2014). Após a ação de algumas enzimas, dentre elas GenD2 e GenS2, há a formação de gentamicina X2 que será o substrato precursor para duas vias biossintéticas paralelas. Em um dos ramos, há a formação final das gentamicinas C1_a e C2_b, por outro lado, a gentamicina X2 pode ser metilada na posição C6'

pela GenK gerando G418, que é substrato para outra possível rota da mesma via biossintética e que, ao final, gerará as gentamicinas C1, C2 e C2_a (GUO, et al., 2014, YU Y et al. 2017) (Figura 8). Essa etapa da via onde o G418 é o substrato precursor, ainda não está muito bem compreendida com relação à ordem e a função de algumas das enzimas desta etapa. Através de estudos de deleção gênica e verificação por espectrometria de massas, foi identificado que a enzima GenB2, PLP dependente, age na posição C6' da gentamicina C2_a como uma epimerase sendo capaz de catalisar a conversão estereoquímica para a formação de gentamicina C2 (Figura 8).

Figura 8. Continuação da via de biossíntese de gentamicina previamente mostrada na figura 5. A imagem mostra um dos ramos finais da via de biossíntese de gentamicina a partir da gentamicina X2. A partir da gentamicina X2 se separam dois ramos, um formará as gentamicinas C1_a e C2_b e o outro ramo as gentamicinas C2_a, C2 e C1, todas evidenciadas em azul. A enzima GenB2 atua nas gentamicinas C2_a e C2. Modificado de: GUO et al, (2014).

Esse ramo da via de biossíntese de gentamicina ainda não está completamente elucidado e a posição de atuação de quatro enzimas PLP dependentes (GenB1, GenB2, GenB3 e GenB4) está sendo desvendada a partir de estudos funcionais deletérios (GUO, et al., 2014 e dados não publicados do grupo do Prof. Peter Leadlay, Universidade de Cambridge, UK). Aparentemente, apenas a GenB2 tem função de epimerase. Há também um baixo nível de promiscuidade das outras enzimas GenB em substituir a GenB1 na aminação do composto 6'-desidro-oxi-G418, mas ainda não se sabe como e se a GenB2 poderia atuar nesta etapa. A informação estrutural destas enzimas acrescentará informação aos estudos funcionais e contribuirá para o entendimento total da etapa final de biossíntese dos principais componentes do complexo clínico da gentamicina.

Essas proteínas também têm sido estudadas em conjunto com o grupo de pesquisa do Prof. Peter F. Leadlay. Os protocolos para expressão heteróloga e para purificação, bem como a condição de cristalização da enzima GenB2 foram enviados para que pudessemos reproduzi-los em nosso laboratório.

A enzima GenB2 (Uniprot: Q70KE6) apresenta 414 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 44589.40 Da. Acredita-se que a GenB2 seja uma epimerase aminotransferase PLP dependente, apresentando baixa similaridade com as enzimas Sis5 e GenB1.

GenB2 apresenta identidade de 29% em 83% de cobertura com uma isomerase de *Thermus thermophilus* (Código PDB: 2E7U), sem função biológica definida (Figura 9).

GenB2	1	M	I	I	A	N	A	D	G	C	T	P	Y	E	V	A	R	C	...	V	T	L	V	R	G	E	G	A	Y	V	D	A	E	C	R	G	L	I	D	L	S	N	S																		
2E7U	1	M	E	R	P	I	S	E	A	Y	F	Q	E	A	K	R	H	I	P	G	G	V	S	S	P	V	R	A	F	K	A	V	G	T	P	P	F	L	V	R	G	E	G	A	Y	W	D	A	D	C	N	R	Y	L	D	Y	V	M	S		
GenB2	43	F	C	S	V	M	L	G	H	Q	D	P	V	V	T	E	A	V	L	K	T	V	R	S	C	V	P	A	A	S	L	D	L	Q	N	H	L	A	E	Q	I	A	G	D	L	D	G	D	Q	R	V	A	F	F	K	T	G	T	A	A	
2E7U	61	W	C	P	L	I	L	G	H	A	H	P	K	V	L	A	R	V	R	E	T	L	R	G	L	T	F	G	A	P	S	P	L	E	V	A	L	A	K	K	V	K	R	A	Y	P	F	V	D	I	V	R	E	V	N	S	G	T	E	A	
GenB2	103	T	R	A	A	S	A	A	R	Q	V	T	G	K	R	L	I	A	S	C	G	..	Y	H	C	Y	D	L	M	W	E	F	T	P		P	G	Q	P	N	S	E	D	V	L																
2E7U	121	T	M	S	A	L	R	L	A	R	G	Y	T	C	R	P	Y	I	V	K	F	R	G	N	Y	H	C	H	A	D	G	L	L	V	E	A	G	S	G	A	L	T	L	G	V	P	S	S	A	G	V	P	E	E	Y	A	K	L	T	L	V
GenB2	146	H	C	Y	H	L	P	E	L	I	D	Q	V	L	D	K	H	A	H	E	L	A	A	V	I	I	A	P	D	Y	...	I	H	V	S	P	E	Y	I	A	D	L	F	E	R	C	E	R	V	C	V	V	T	I	A	D	E	V			
2E7U	181	L	E	Y	N	D	P	E	G	L	R	E	V	L	K	R	R	G	E	E	I	A	A	I	I	F	E	P	V	V	G	N	A	G	V	I	V	P	T	E	D	F	L	K	A	L	H	E	A	K	A	C	V	L	L	I	A	D	E	V	
GenB2	202	K	H	G	Y	R	L	R	Q	G	A	S	V	T	E	A	S	V	A	D	M	Y	T	Y	A	K	G	I	S	N	G	W	P	L	S	C	V	A	G	D	E	R	F	L	K	P	L	A	E	F	...	V	S	T	L	T					
2E7U	241	M	T	G	F	R	L	A	F	G	G	A	T	E	L	L	C	L	K	P	D	L	V	T	L	G	K	I	L	G	G	L	P	A	A	Y	A	G	R	R	E	I	M	E	K	V	A	P	L	G	P	V	Y	Q	A	G	T	L	S		
GenB2	257	F	E	A	P	S	F	A	A	S	A	T	L	D	R	L	F	A	E	L	D	..	V	Q	A	L	A	I	D	G	A	R	F	V	S	E	A	A	K	M	I	S	T	R	D	L	P	I	E	M	A	G	T	C	A	A	F	Q	F	V	
2E7U	301	G	N	P	L	A	M	A	A	G	L	A	T	L	E	L	I	E	N	P	G	Y	Y	A	Y	L	E	D	L	G	A	R	L	E	A	G	L	K	E	V	L	K	E	K	G	L	P	H	T	V	N	R	V	C							
GenB2	316	C	A	E	E	V	E	V	L	L	P	H	A	L	A	E	C	L	I	L	E	P	S	D	Q	Q	Y	P	S	A	C	F	R	G	E	V	V	D	D	A	L	E	R	L	D	R	A	L	T	T	M	A	A	A	R	P	D	L	V	G	
2E7U	355		S	M	I	T	V	F	F	T	E	C	P	V	V	T	F	Q	D	A	R	R	T	D	T	E	L	F	K	R	F	F	H	G	L	L	D	R	G	I	Y	W	P	P	S	N	F	E	A	A	F	L	S	V	A						
GenB2	376	R	E	V	T	Q	L	D	R	V	N	A	A	F	C	Q	M	D	G	L	P	G	R	P	D	G	W	S	L	D	Q	C	V	E	Y	V	T	A	Q	L																					
2E7U	408	H	R	E	E	D	V	E	K	T	L	E	A	L	R	K	A	L																																											

Figura 9. Alinhamento entre GenB2 e uma isomerase de *Thermus thermophilus*, código PDB: 2E7U.

Foi utilizado o programa ESPrpt 3. Os resíduos em branco emoldurados em vermelho são resíduos idênticos; os resíduos em preto com fundo amarelo são diferentes, porém apresentam a mesma propriedade química, apresentando mais de 70% de similaridade; e os não emoldurados são diferentes.

5 CONCLUSÃO

Apesar de muitas tentativas, não foi possível obtenção de cristais da enzima GenS2.

Foi determinada a estrutura da enzima GenD2 em complexo com seu cofator NAD^+ , a 2,4 Å, foi comprovada ser um tetrâmero com quatro moléculas de NAD^+ por tetrâmero e sua seletividade pelo cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo. A enzima apresenta dois domínios, um rico em fitas- β que realizará a ligação ao outro protômero e outro com o enovelamento Rossmann Fold que mantem o padrão de lisinas conservadas onde se liga o cofator.

A enzima GenB2 em complexo com o cofator piridoxamina-5'-fosfato e com a gentamicina X2 foi resolvida com a resolução de 1,7 Å, foi observada ser um homodímero obrigatório, com dois sítios ativos e resíduos de ambos os protômeros interagindo com os ligantes. A gentamicina X2 se encontrou posicionada em um largo bolsão catalítico carregado negativamente. Os avanços obtidos na caracterização de seu sítio ativo contribuem para o entendimento da atividade da enzima uma vez que foi localizado seu sítio ativo e sua interação com um substrato bastante semelhante ao substrato natural da enzima.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P.D., et al. (2011) The Phenix software for automated determination of macromolecular structures, **Methods**, 55, 94-106.
- AMARAL, M.D. (2015) Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients, **J Intern Med**, 277, 155-166.
- AMERSHAM BIOSCIENCES. GE: Gel Filtration Principles and Methods. 18-1022-18 ed. England: Rak Design Ab, 2002. Disponível em: <file:///C:/Users/natal/Downloads/GE_gelfiltration Principles and methods.pdf>.
- ARYA, D.P. (2006) AmiAminoglycoside antibiotics: from chemical biology to drug discovery. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA.
- AWDA, R., et al. (2017) Structural insights into the substrate recognition and reaction specificity of the PLP-dependent fold-type I isoleucine 2-epimerase from *Lactobacillus buchneri*, **Elsevier, Biochimie** 137 (2017) 165-173.
- BLUNDELL, T. L. & Johnson, L. N. Preparation of heavy atom derivatives. In Protein Crystallography (**Academic Press**, London, 1976), pp. 183–239.
- BOTTOMS, C.A., Smith, P.E., Tanner, J.J. (2002). A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. **Protein Sci.** 11, 2125–2137.
- BRÜNGER, A.T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, **Nature**, 355, 472-475.
- CARTER, A.P., et al. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, **Nature**, 407, 340-348.
- CIULLI, A.; ABELL, C. Fragment-based approaches to enzyme inhibition. **Curr Opin Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 489-96, Dec 2007. ISSN 0958-1669.
- Collaborative Computational Project, N.m. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 50, 760-763.
- CHOTHIA, C. & Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **EMBO J.** 5, 823–826.
- COX, E.C., WHITE, J.R. and FLAKS, J.G. (1964) STREPTOMYCIN ACTION AND THE RIBOSOME, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 51, 703-709.
- CHRISTOPHER A., et al. A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. **Protein Science** (2002), 11:2125–2137.
- CUCCARESE, M.F., et al. (2013) A novel use of gentamicin in the ROS-mediated sensitization of NCI-H460 lung cancer cells to various anticancer agents, **ACS Chem Biol**, 8, 2771-2777.

* De acordo com:

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

- DeLANO, W.L. (2002) Pymol Molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. A.C. Eliot, J.F. Kirsch, Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 383-415,
- DAJNOWICZ, Steven et al. (2017) Direct visualization of critical hydrogen atoms in a pyridoxal 5'-phosphate enzyme, *Nature Communications*, 955.
- EMSLEY, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 2126-2132.
- EVANS, P. (2006) Scaling and assessment of data quality, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 62, 72-82.
- EVANS, P.R. and Murshudov, G.N. (2013) How good are my data and what is the resolution?, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69, 1204-1214.
- EVENTOFF, W., M. G. Rossmann. 1976. The structure of dehydrogenases. *Trends Biochem. Sci.* 1:227-230.
- LONG, F, A.Vagin, P.Young and G.N.Murshudov "BALBES: a Molecular Replacement Pipeline " *Acta Cryst.* D64 125-132(2008)
- FITZGERALD, R.J. and BERNHEIM, F. (1948) The reversal of the bacteriostatic action of streptomycin by urea, *J Biol Chem*, 172, 845.
- FUSINITA van den Ent & Jan Löwe (2003) Expression of selenomethionine substituted proteins in non-methionine auxotrophic E. coli. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 2QH, disponível em: <<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/JYL/methods/SeMet%20recipe.doc.pdf>>
- GUO, J., et al. (2014) Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis, *Chem Biol*, 21, 608-618.
- HAINRICHSON, M., Nudelman, I. and Baasov, T. (2008) Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases, *Org Biomol Chem*, 6, 227-239.
- HONG, W.R., et al. (2009) Molecular cloning and sequence analysis of the sisomicin biosynthetic gene cluster from *Micromonospora inyoensis*, *Biotechnol Lett*, 31, 449-455.
- HUANG, C., et al. (2015) Delineating the biosynthesis of gentamicin x2, the common precursor of the gentamicin C antibiotic complex, *Chem Biol*, 22, 251-261.
- HANUKOGLU , Israel (2015). Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, February 2015
- KABSCH, W. (2010) XDS, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66, 125-132.
- KEEGAN R.M., Winn M.D. MrBUMP: An automated pipeline for molecular replacement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2008;64:119-124. doi: 10.1107/S0907444907037195.
- KHAREL, M.K., et al. (2004) Molecular cloning and characterization of a 2-deoxystreptamine biosynthetic gene cluster in gentamicin-producing *Micromonospora echinospora* ATCC15835, *Mol Cells*, 18, 71-78.

- KUDO, F. and Eguchi, T. (2009) Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics, **J Antibiot** (Tokyo), 62, 471-481.
- LAKSHMI, N. and Kumar, A.G. (1989) In vitro comparative activity of kanamycin, gentamicin and sisomicin--a new aminoglycoside, against clinical isolates, **Indian J Pathol Microbiol**, 32, 207-212.
- LERNER S. A., Seligsohn R., Matz G. J. (1977) Comparative clinical studies of ototoxicity and nephrotoxicity of amikacin and gentamicin **The American Journal of Medicine**, 62: 919–923.
- LESLIE, A.G. (2006) The integration of macromolecular diffraction data, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 62, 48-57.
- LINDE, L. and Kerem, B. (2008) Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases, **Trends Genet**, 24, 552-563.
- LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct measurement of protein binding energetic by isothermal titration calorimetry. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 5, p. 560-566, 2001.
- LIU, X., Thomas, J.R. and Hergenrother, P.J. (2004) Deoxystreptamine dimers bind to RNA hairpin loops, **J Am Chem Soc**, 126, 9196-9197.
- LLEWELLYN, N.M. and Spencer, J.B. (2006) Biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics, **Nat Prod Rep**, 23, 864-874.
- MAAROUF, M., et al. (1995) Ribosomes of Leishmania are a target for the aminoglycosides, **Parasitol Res**, 81, 421-425.
- MCCOY A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., and Read R.J. J Appl. Phaser crystallographic software. **Crystallogr** 40, 658-674 (2007).
- MCCOY, A.J. (2007) Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 63, 32-41.
- MCPHERSON, Alexander, and Jose A. Gavira. "Introduction to Protein Crystallization." **Acta Crystallographica. Section F**, Structural Biology Communications 70.Pt 1 (2014): 2–20.
- MIZUTANI, R. et al. Spatiotemporal development of soaked protein crystal. **Sci. Rep.** 4, 5731; DOI:10.1038/srep05731 (2014).
- MURSHUDOV, G.N., et al. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 67, 355-367.
- NAGEM, R. A. P., Dauter, Z. & Polikarpov, I. (2001). **Acta Cryst.** D57, 996-1002.
- Navaza, J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 57, 1367-1372.
- OGLE, J.M., Carter, A.P. and Ramakrishnan, V. (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures, **Trends Biochem Sci**, 28, 259-266.
- PALOMINO J, PACHÓN P. Aminoglucósidos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 21: 105-115, 2003. Links to: CrossRef. Try link to: Google. Similar in: SciELO Network.

- PARK, J.W., et al. (2008) Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, 8399-8404.
- PARK, J.W., et al. (2011) Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation, **Nat Chem Biol**, 7, 843-852.
- PARK, S.R., et al. (2013) 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways, **Nat Prod Rep**, 30, 11-20.
- PATRO, S. Y., & Przybycien, T. M. (1996). Simulations of reversible protein aggregate and crystal structure. **Biophysical Journal**, 70(6), 2888–2902.
- POPOVIC, B., et al. (2006) Crystal structures of the PLP- and PMP-bound forms of BtrR, a dual functional aminotransferase involved in butirosin biosynthesis, **Proteins**, 65, 220-230.
- PRAYLE, A. and Smyth, A.R. (2010) Aminoglycoside use in cystic fibrosis: therapeutic strategies and toxicity, **Curr Opin Pulm Med**, 16, 604-610.
- REINHARD, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., & Weiss, M. S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, 69(Pt 2), 209–214.
- TAYLOR, G. L. Introduction to phasing. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** 66, 325–338 (2010).
- SAMBROOK J, Russell D (2001) Molecular Cloning: **A Laboratory Manual**, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCAPIN, Giovanna. Molecular replacement then and now. International Union of Crystallography, **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 11(69), p. 2266-2275. (2013).
- SCHNEIDER G., Käck H., Lindqvist Y. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. **Structure**. 2000; 8(1):R1–R6.
- UNWIN, J., et al. (2004) Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex, **J Antibiot** (Tokyo), 57, 436-445.
- VAGIN, A. and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 66, 22-25.
- VAGUINE, A.A., Richelle, J. and Wodak, S.J. (1999) SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 55, 191-205.
- WALDEN, Helen. “Selenium Incorporation Using Recombinant Techniques.” **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography** 66.Pt 4 (2010): 352–357. PMC. Web. 14 Apr. 2016.
- WALSH, C. (2003) Antibiotics: actions, origins, resistance. **American Society for Microbiology**, Washington.
- WEINSTEIN, M.J., et al. (1963) GENTAMICIN, A NEW BROAD-SPECTRUM ANTIBIOTIC COMPLEX, **Antimicrob Agents Chemother** (Bethesda), 161, 1-7.

WINN M. D. et al. *Acta. Cryst. D*67, 235-242 (2011) **Overview of the CCP4 suite and current developments** [doi:10.1107/S0907444910045749]

XAVIER Robert, Patrice Gouet; Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server, **Nucleic Acids Research**, Volume 42, Issue W1, 1 July 2014, Pages W320–W324, <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>

YU Y, Zhang Q and Deng Z. Parallel pathways in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics *F1000Research* 2017, 6(F1000 Faculty Rev):723 (doi: 10.12688/f1000research.11104.1)