

CHARLOTTE CESTY BORDA DE SAENZ

**ESTUDO DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA
BIOSSINTÉTICA DO ANTIBIÓTICO
ANTITUMORAL COSMOMICINA.**

**ESTUDO DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA
BIOSSINTÉTICA DO ANTIBIÓTICO
ANTITUMORAL COSMOMICINA**

CHARLOTTE CESTY BORDA DE SAENZ

Tese (Doutorado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /
IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo
2007

**ESTUDO DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA
BIOSSINTÉTICA DO ANTIBIÓTICO
ANTITUMORAL COSMOMICINA**

CHARLOTTE CESTY BORDA DE SAENZ

Tese (Doutorado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /
IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla

São Paulo
2007

AGRADECIMENTO

Gostaria de aproveitar estas linhas para agradecer a muitas pessoas que formaram parte desta história que está acabando. Se por acaso eu não escrever o nome de algum de vocês me perdoem, pois é muita a emoção que estou sentindo e muitos são os rostos que estou vendo nestes momentos; desde as amigas que encontrava no corredor até os amigos que encontrava na hora do café. Todos, todos aqueles momentos fazem parte destes três anos que compartilhei aqui no Laboratório de Genética de Microrganismos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Gabriel Padilla, pela oportunidade de trabalhar com ele e com sua equipe de pesquisa, sempre preocupado pela nossa formação profissional e também pessoal. Sinto que a partir que cheguei ao seu laboratório muitas coisas começaram a mudar na minha vida... Muchas gracias Gabriel!!! Não posso deixar de mencionar a minha amiga e companheira de trabalho Renatinha que sempre esteve lá para me ajudar e me escutar sempre que precisei.

A Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva e aos demais professores e amigos, que sempre estiveram presentes quando precisei deles, em especial ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gómez e Dr. Leandro Garrido pelo tempo, amizade e contribuição neste trabalho.

Aos secretários de Biotecnologia Eliane, Fábiana e Marcos pela amizade, prontidão e jeito com que sempre me trataram.

A Norma, Leninha e Kazui que me apoiaram nesses dias de correria me socorrendo no que precisava.

Aos amigos do laboratório Karencita, Juanito, Sileine, Fabiana, Sandrita, Carolina, Babi, Andrés e Márcia pelo astral que sempre me fizeram sentir em cada

um dos dias que compartilhamos. Sempre pense que vocês são um grupo muito legal onde qualquer um gostaria de trabalhar junto.

Também gostaria de mencionar a uns amigos que apesar de não pertencer a este laboratório sempre mantemos contato: Cinthia Cristina, Claudete, Vanildo, Carminha, Bete... são muito boas amizades que eu colhi no começo deste doutorado.

Aos meus amigos peruanos que nos nossos encontros nos dias dos churrascos me ajudaram a relaxar e esquecer quando algum resultado não estava dando certo.

Gostaria de agradecer também a minha família que apesar de ficar longe na distancia sempre acompanhou por perto cada conquista. Muchas gracias papito Luchito, mamá Candy, Amorcito, tio Alberto, Frank, Paulo, Nena, Diaguito, Guillermito, Alicia Martín, Charito e a minha outra família do coração Olga, Nicolás, Lenin, Jeannet, Nicolacito, Alex e Christian.

Quanto daria porque duas pessoas estivessem presentes neste momento, me escutando, me vendo. Tenho certeza que seriam as pessoas mais felizes do mundo ao saber que o fruto do seu esforço esta dando o passo mais importante da sua vida acadêmica. Mamá Olguita y papá Emilio esto va para ustedes!!!! Sei que desde lá nas alturas vocês conseguem me sentir: Os amo!!!!

A mis minha vida Dioguito, obrigada por teu carinho incondicional, por teus sorrisos, por teu olhar, por tua compreensão e por tua paciência de sempre, por fazer que toda escuridão sempre tenha uma luz no final do caminho.

Ao meu amor Erik, obrigada por me escutar até quando não falo, por me entender até quando tudo é um caos, por me agüentar naqueles dias difíceis, por estar presente em cada minuto até na minha vida acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida.

Ofereço

A meus pais Olga e Emilio in memória que pela sua presença, apoio, força, amor que me brindaram em todos os momentos da minha vida.

Dedico

Aos amores da minha vida Erik e Dioguito pela força, motivação, amor eternos que recebo em cada uma das coisas que compartilhamos juntos.

Agradeço

A Deus por me fazer feliz com as coisas que faço, por fazer realidade este sonho e por fazer que acredite em elas.

Começar já é a metade de toda ação
Provérbio grego.

A esperança torna as grandes coisas pequenas,
e as pequenas, grandes.
Catão

Resumo

Borda, C. C. Estudo de genes envolvidos na via biossintética do antibiótico antitumoral

Cosmomicina. [Tese de doutorado (Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Cosmomicina é um antibiótico antitumoral produzido pela bactéria *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622. Estudos de expressão gênica demonstraram que genes cuja expressão está relacionada a condições de estresse (*dnaJ* e *18hsp*), assim como genes associados a via biossintética de cosmomicina, são expressos sob condições de produção do antibiótico. Genes que ainda tinham a função desconhecida foram selecionados (*cosS* e *cosY*) e foram realizadas análises bioinformáticas destes atribuindo-lhes a função de regulador transcricional e ornitina ciclodesaminase, respectivamente. Um cassete para inativação desses genes foi construído visando a futura obtenção de mutantes nulos. Genes de glicosiltransferase (*cosK* e *cosG*) também apresentaram diferenças na expressão na presença do antibiótico. Neste trabalho, foi revelada a presença de uma hipotética glicosiltransferase que tem homologia com a B-daunosamine daunomy, glicosiltransferase envolvida na transferência de açúcares na biossíntese do antibiótico daunomicina.

Palavras chaves: antibióticos, *Streptomyces olindensis*, glicosiltransferases, genes reguladores, biblioteca genômica, policetídeos.

Abstract

Borda, C. C. Genes study involved in biosynthetic pathway of antitumoral antibiotic Cosmomycin. [Ph.D. Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Cosmomycin is an antitumoral antibiotic produced by the soil bacteria *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622. Gene expression studies established that stress condition genes like *dnaJ* and *18hsp*, and cosmomycin biosynthetic pathways genes are expressed under antibiotic production. Also the genes *cosS* and *cosY* (unknowns function), were selected and analyzed by bioinformatics techniques attributing a transcriptional regulator and ornithine cyclodeaminase functions, respectively. A cassette was constructed in order to inactivate these two selected genes and generating void mutants. Another gene *cosK*, with glycosyltransferase function, also presented differences in its expression when the antibiotic is produced. We described in this work the presence of a hypothetical glycosyltransferase related with B-daunosamine daunomy, which transfers sugar molecules in the biosynthesis of daunomycin antibiotic.

Key words: antibiotics, *Streptomyces olindensis*, glycosyltransferase, regulator genes, genomic library, polyketide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química das cosmomicinas produzidas por <i>Streptomyces olindensis</i> : Cosmomicina D (Furlan et al., 2004).	3
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i> (Adaptado por Garrido, 2005).	6
Figura 3: Via básica de biossíntese de ácidos graxos e policetídeos.	9
Figura 4: Estrutura química de algumas moléculas de policetídeos do tipo I, II e III.	10
Figura 5: Genes envolvidos na síntese da cadeia do PKS tipo II, na redução, ciclização ou aromatização.	12
Figura 6: Estrutura química das cosmomicinas produzidas por <i>Streptomyces olindensis</i> . Frações químicas das moléculas produzidas por <i>S. olindensis</i> (Garrido et al., 2006)	14
Figura 7: Estrutura da interação das subunidades da cetosintase, mostrando o canal que determina o tamanho da cadeia policetídea.	15
Figura 8: Etapas da biossíntese de cosmomicinas.	18
Figura 9: Biossíntese dos açúcares das cosmomicinas.	20
Figura 10: Organização gênica do cosmídeo p5E11, indicando os genes elucidados nos 14 Kb já seqüenciados.	21
Figura 11: Arquitetura dos domínios das respostas reguladoras mais comuns em bactérias. Destaquem-se os domínios OmpR-like.	24
Figura 12: Conversão enzimática de L-ornitina a L-prolina e amônia pela enzima bacteriana ornitina ciclodesaminase.	25
Figura 13: Genes pertencentes ao agrupamento gênico da biossíntese dos peptídeos.	26
Figura 14: Possível via de glicosilação na biossíntese da cosmomicina D.	29
Figura 15. Procedimento do crescimento micelial da cepa selvagem de <i>S. olindensis</i> . A comparação da expressão gênica na via biossintética da cosmomicina foi realizada em culturas com e sem produção do antibiótico	43

Figura 16. Procedimento do crescimento micelial da cepa selvagem de <i>S. olindensis</i> . Para realizar a cinética transcricional durante a produção do antibiótico foram avaliados a expressão gênica, o de espectro de absorção, a concentração de glicose e a atividade antimicrobiana nos tempos 0, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, e 36 horas com os genes <i>cosS</i> , <i>cosY</i> , <i>cosK</i> , <i>cosG</i> , <i>cosK</i> , <i>hsp18</i> , <i>dnaJ</i> e <i>ks</i> .	44
Figura 17. Análise transcricional dos genes durante a presença ou ausência do antibiótico cosmomicina.	48
Figura 18. Espectro de absorção da cosmomicina na faixa de 400-650nm.	49
Figura 19: Análise do antibiótico Cosmomicina. A. Corrida de HPLC do extrato de cultivo líquido de <i>S.olindensis</i> em meio R5M. B. Espectrometria de massa dos picos referentes aos compostos produzidos pela <i>S. olindensis</i> .	50
Figura 20. Cinética de crescimento da cepa selvagem de <i>S. olindensis</i> durante a produção do antibiótico cosmomicina no meio R5M.	51
Figura 21. Espectro de absorção do antibiótico cosmomicina na faixa de 450-650nm, das diferentes alicotas (0, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 e 36 horas) da cinética de produção do antibiótico.	52
Figura 22. Análise da atividade biológica do antibiótico cosmomicina.	52
Figura 23. Cinética transcricional dos genes <i>cosS</i> , <i>cosY</i> , <i>cosK</i> , <i>cosG</i> , <i>ks</i> , <i>hsp18</i> e <i>dnaJ</i> com relação ao tempo.	53
Figura 24: Análise bioinformático da seqüência do <i>cosY</i> de <i>S. olindensis</i> .	55
Figura 25: Estratégia de trabalho para a subclonagem do gene <i>cosY</i> e interrupção deste com o gene de resistência apramicina.	56
Figura 26: Hibridação por “colony-blot” de clones carregando o gene <i>cosY</i> . Destaca-se o subclone pBS5G.	57
Figura 27: Análise de restrição do plasmídeo pBS5G.	57
Figura 28: Mapa físico da subclonagem pBS5G (7542 pb).	58
Figura 29: Representação esquemática do cassete de integração <i>cosY/apra</i> .	58

Figura 30: Amplificação por PCR do fragmento <i>aclSF/apra</i> , indicando a orientação do cassete de interrupção inserido no gene <i>cosY</i> .	59
Figura 31: Confirmação da construção do plasmídeo pHZ5G.	59
Figura 32: Mapa físico do clone pEM4Y (aproximadamente 9.0 Kb).	62
Figura 33: Amplificação do fragmento correspondente ao gene <i>cosY</i> (aprox. 1100pb) amplificado com os oligonucleotídeos <i>ocdF</i> e <i>ocdR</i> , confirmando a inserção do gene no plasmídeo pEM4.	62
Figura 34: Análise bioinformática da seqüência do <i>cosS</i> de <i>S. olindensis</i> .	63
Figura 35: Estratégia de trabalho para a subclonagem do gene <i>cosS</i> e interrupção do com o gene de resistência a pramicina.	64
Figura 36: Confirmação da perda do sítio <i>PvuI</i> no plasmídeo pBC.	65
Figura 37: Mapa físico da subclonagem pBC~P - <i>cosS</i> (aprox. 8,0 Kb).	65
Figura 38: Amplificação do gene <i>cosS</i> dos clones pBC – EcoRI/BamHI usando os oligonucleotídeos <i>aclSF</i> e <i>aclSR</i> .	66
Figura 39: Segunda estratégia de trabalho para a subclonagem do gene <i>cosS</i> e interrupção com o gene de resistência a pramicina (aproximadamente. 8.3 Kb).	67
Figura 40: Confirmação do produto de PCR de 6.8 Kb amplificado com a enzima High Fidelity (Invitrogen) usando oligonucleotídeos internos (<i>ocdF</i> e <i>ocdR</i>).	68
Figura 41: Amplificação do fragmento correspondente ao gene <i>apra</i> (~1100pb) com os oligonucleotídeos <i>apraF</i> e <i>apraR</i> , confirmando a inserção do gene.	68
Figura 42: Mapa físico do clone pEM4S (aproximadamente 8.5 Kb).	69
Figura 43: Amplificação do fragmento correspondente ao gene <i>cosS</i> amplificado com os oligonucleotídeos <i>aclSF</i> e <i>aclSR</i> , confirmando a inserção do gene no plasmídeo pEM4.	69
Figura 44. Análise comparativo entre as seqüências dos genes <i>cosK</i> , <i>cosG</i> e C6B3 (possível nova glicosiltransferase. O alinhamento foi realizado através do programa Clustal W (http://npsa-pbil.ibcp.fr).	72
Figura 45: Vetor linear pCR*4 Blunt-TOPO* (4 Kb) (Invitrogen).	73

Figura 46: Amplificação do fragmento gtr1 e gtr2 (~ 1.1 Kb) confirmando a inserção do fragmento. A canaleta 1 corresponde ao padrão de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).	73
Figura 47: Análise do provável gene de glicosiltransferase (GTr) de <i>Streptomyces olindensis</i> , através do programa SEARCHGTr.	74
Figura 48: Análise comparativa da seqüência do provável gene de glicosiltransferase (GTr) no programa SEARCHGTr.	75
Figura 49: Análise comparativa entre as seqüências de aminoácidos do provável GTr (C6B3) e a glicosiltransferase da Daunorubicina.	76
Figura 50: Análise comparativa entre as seqüências de aminoácidos do provável GTr (C6B3) e as glicosiltransferases <i>cosK</i> e <i>cosG</i> já descrita em <i>Streptomyces olindensis</i> .	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das Cosmomomicinas A, B,C e D.	13
Tabela 2: Maiores homologias encontradas pelos genes <i>cos</i> de <i>S. olindensis</i> com outras espécies de <i>Streptomyces</i> (Garrido, 2005).	22
Tabela 3: Linhagens utilizadas no desenvolvimento das técnicas de clonagem e conjugação de <i>S. olindensis</i> .	34
Tabela 4: Plasmídeos e cosmídeos utilizados para a clonagem e subclonagem em <i>E. coli</i> e <i>S. olindensis</i> .	34
Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de glicosiltransferase, <i>cosS</i> , <i>cosY</i> e <i>apra</i> e para a confirmação das subclonagens.	53
Tabela 6: Concentrações dos reagentes utilizados para amplificação por PCR utilizando DNA plasmidial ou bactérias lisadas.	37
Tabela 7: Programas utilizados para amplificar fragmentos de DNA com as enzimas: A. <i>Taq</i> DNA polimerase. B. <i>Pfu</i> DNA polimerase, Platinum <i>Taq</i> DNA Polimerase, High Fidelity PCR. C. Long PCR e respectivamente.	37

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. <i>Streptomyces</i>	4
2.1.1. Características gerais	4
2.1.2. Ciclo de vida	4
2.1.3. Organização genômica.	5
2.2. Antibióticos	6
2.2.1. Policetídeos	7
2.2.2. Tipos de PKSs	8
2.2.3. Policetídeos tipo II	10
2.3. Cosmomicina sintetizada por <i>Streptomyces olindensis</i>	11
2.3.1. Biossíntese das cosmomicinas	13
2.3.2. Genes da via biossintética da cosmomicina	14
2.3.2.1. Gene <i>cosS</i> : genes reguladores.	20
2.3.2.2. Gene <i>cosY</i> (ornitina ciclodesaminase).	22
2.3.2.3. Glicosiltransferases	24
3. OBJETIVO	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Meios de cultura utilizados e condições padrão de cultivo.	31
4.1.1 Meios de Cultura	31
4.1.2. Soluções	33
4.2. Linhagens, vetores e oligonucleotídeos utilizados neste estudo.	33
4.3. Inserção de DNA em <i>E. coli</i> por transformação	35

4.4. Imobilização do DNA de colônias em membrana de nylon para “colony-blot”	36
4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	36
4.6. Seqüenciamento de DNA	38
4.7. Conjugação bacteriana <i>E.coli</i> – <i>Streptomyces</i>	39
4.8. Preservação de linhagens	40
4.9. Extração de antraciclinas do meio de cultivo	40
4.10. Teste de atividade antimicrobiana frente a <i>Bacillus subtilis</i>	41
4.11. Determinação de glicose	41
4.12. Análises da biossíntese de cosmomicina	41
4.12.1. Condições de cultura na produção de cosmomicina	41
4.12.2. Extração de RNA e análises da Expressão Gênica por RT-PCR	42
4.12.3. Extração e análise da cosmomicina	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Expressão gênica de genes da via biossintética da cosmomicina.	46
5.2. Análise do antibiótico Cosmomicina	47
5.2.1. Espectro de Absorção	47
5.2.2. HPLC e espectrometria de massa	49
5.2.3. Análise transcricional de genes durante a ativação da via biossintética de Cosmomicina D.	50
5.3 Gene <i>cosY</i> .	54
5.3.1. Análise através do programa Blast da seqüência do gene <i>cosY</i>	54
5.3.2. Subclonagem do locus genômico de <i>cosY</i> e construção de cassete de interrupção.	55
5.3.3. Construção do plasmídeo conjugativo com o gene <i>cosY</i> .	59
5.3.4. Conjugação	60

5.3.5. Subclonagem do gene <i>cosY</i> no vetor de expressão pEM4.	67
5.4. Gene <i>cosS</i>	62
5.4.1. Análise através do programa Blast da seqüência do gene <i>cosS</i>	62
5.4.2. Subclonagem do locus genômico de <i>cosS</i>	64
5.4.3. Nova estratégia para a subclonagem do gene <i>cosS</i>	66
5.4.4. Subclonagem do gene <i>cosS</i> no vetor de expressão pEM4.	69
5.5. Triagem de prováveis novas enzimas de glicosiltransferases em <i>Streptomyces olindensis</i> .	70
6. DISCUSÃO	78
6.1. Análises bioinformáticas dos genes <i>cosS</i> e <i>cosY</i>	79
6.2. Produção do antibiótico cosmomicina e análise transcricional de genes durante a ativação da via biossintética	80
6.3. Triagem de prováveis novas enzimas glicosiltransferases	84
6.4. Construção de cassetes de interrupção dos genes <i>cosS</i> e <i>cosY</i>	85
7. CONCLUSÕES	88
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	90
9. BIBLIOGRAFIA	91
Apêndice	107

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, existe grande quantidade de compostos comercializados por empresas farmacêuticas e extraídos a partir de produtos naturais produzidos por microrganismos ou plantas. No caso dos antibióticos, estes têm sido muito utilizados contra infecções bacterianas e fúngicas, no entanto, têm sido comercializados para medicina com outros alvos como antitumorais, imunossupresores, hipocolesterolêmicos, inibidores enzimáticos, anti-enxaquecas e antiparasitários. Dos 12.000 antibióticos conhecidos em 1995, 55% eram produzidos por bactérias filamentosas (actinomicetos) do gênero *Streptomyces*, 11% por outros actinomicetos, 12% por bactérias não filamentosas e 22% por fungos filamentosos (Berdy 1995; Strohl 1997).

Entre os antibióticos produzidos pelo gênero *Streptomyces*, destacam-se as antraciclinas, compostos policetídeos aromáticos que consistem de um esqueleto aglicônico e moléculas de açúcar que são sintetizadas pelo conjunto enzimático conhecido como PKS tipo II (policetídeo sintase). As antraciclinas são largamente empregadas por suas propriedades antitumorais nos tratamentos clínicos e terapias contra diversos tipos de câncer. As mais utilizadas em quimioterapia são: a doxorrubicina e a daunorrubicina. Embora estes antibióticos tenham um potente efeito quimioterápico em uma ampla variedade de tumores especialmente adenocarcinomas mamários, leucemias, linfomas e sarcomas; a desvantagem é a cardiotoxicidade e hepatotoxicidade.

A partir desta problemática surge a necessidade de procurar novas moléculas que possam aumentar o repertório destes compostos. A química combinatória foi uma das abordagens utilizada, porém, nas moléculas complexas como agentes redutores de colesterol (lovastatina), imunossupresores (ciclosporina e FK506) e antibacterianos (tetraciclina, eritromicina e vancomicina), não foram obtidos avanços esperados (Reeves, 2003)..

Uma alternativa metodológica de sucesso tem sido o estudo da biosíntese combinatória, considerada como uma ferramenta da engenharia metabólica. Com esta técnica, muitos genes responsáveis por reações metabólicas individuais, provenientes de vias biossintéticas de metabólitos secundários e de diferentes organismos, são combinados racionalmente para gerar vias metabólicas que são inacessíveis ou difíceis de obter (Sanchez *et al.*, 2005). Uma das enzimas que se utiliza muito nesta metodologia são as glicosiltransferases, responsáveis pela transferência dos açúcares ao núcleo aglicônico e pela biodiversidade dos policetídeos.

Com estes e outros avanços muitas pesquisas têm surgido visando a analisar os genes e sua função, produção do antibiótico e análises das novas estruturas produzidas. O estudo destes genes permite conhecer de forma mais precisa as vias biossintéticas, possibilitando a manipulação dos microrganismos produtores, entre eles temos a linhagem *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622, que produz três estruturas químicas determinadas, cosmomicina C, cosmomicina D e citorrodina N. Estas moléculas se assemelham pois possuem um padrão de glicosilação característico, com dois radicais trissacarídeos ligados aos carbonos 7 e 10 da aglicona, e se diferenciam pela classe de glicídeo adicionado, podendo ser a rodosamina, desoxifucose ou rodinose.

Garrido e colaboradores (2006) construíram uma biblioteca genômica de *S. olindensis* e isolaram o cosmídeo p5E11 com sondas para policetídeos. O seqüenciamento deste cosmídeo revelou a presença de 14 genes implicados na via biossintética da cosmomicina. Entre eles podemos citar as duas subunidades da policetídeo sintase, genes de biossíntese de açúcares, genes de resistência, duas glicosiltransferases, entre outros. Para se determinar a função destas glicosiltransferases, foram construídos dois mutantes nocauteados nos genes que codificam as enzimas CosG e CosK. Nesse trabalho, elaborou-se a hipótese que poderiam existir outras glicosiltransferases participando desta via.

No presente trabalho, por estudos de expressão gênica foi determinado que alguns genes presentes na via biossintética da cosmomicina só estão ativos durante a produção do antibiótico e que genes como *dnaJ* e *18hsp*, expressos em situações de estresse, também são expressos. Partindo destes resultados e da elucidação dos genes anteriormente mencionados, no presente trabalho foram selecionados os genes *cosS* e *cosY*, com o intuito de caracterizá-los, sendo que o gene *cosS* é

descrito como possível regulador, enquanto, o gene *cosY* ainda apresenta uma função desconhecida.

Outro objetivo deste trabalho foi responder a hipótese de Garrido e colaboradores (2006), sobre a existência de 4 glicosiltransferases presentes na via biossintética da cosmomicina. Duas destas enzimas (GTR 1 e CosG) estariam adicionando especificamente o aminoaçúcar nas posições 7 ou 10 da aglicona. A terceira enzima a atuar seria a CosK, que adicionaria L-2-desoxifucose ou L-rodinose, nas duas cadeias na molécula e, finalmente, uma quarta enzima (GTR 4) encarregada de adicionar a rodinose na terceira posição das cadeias do carbono 7 ou 10 da aglicona (Figura 1).

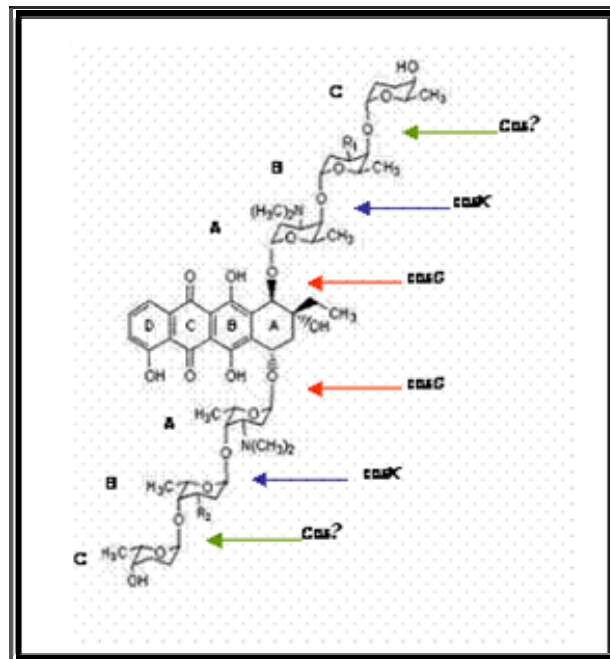


Figura 1: Estrutura química das cosmomicinas produzidas por *Streptomyces olindensis*: Cosmomicina D (Furlan *et al.*, 2004). A: rodosamina. B: L-2-desoxifucose. C: rodinose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Streptomyces*

2.1.1. Características gerais

O gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae e à ordem dos Actinomycetales. Estas bactérias são filamentosas, miceliares, Gram-positivas, aeróbias e têm capacidade de utilizar um grande número de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, possuem um elevado conteúdo de guaninas e citosinas (G+C 74%) em seu genoma (Bentley *et al.*, 2002). Estas bactérias estão amplamente distribuídas na natureza, sendo o solo o habitat mais comum.

Sua morfologia é muito parecida a dos fungos por serem pleomórficos e produzir micélio diferenciado em micélio vegetativo e micélio aéreo, mas apresentam características típicas dos procariontes, ausência de membrana nuclear, mitocôndrias e cloroplastos (Stackebrandt *et al.*, 1992).

A importância destes organismos está na capacidade de produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários, a maioria deles com atividade biológica. Dentre estes metabólitos secundários, encontram-se desde análogos de metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos e polipeptídeos) até antibióticos. As bactérias do gênero *Streptomyces* são produtoras de mais da metade dos antibióticos conhecidos. Dos 12.000 antibióticos caracterizados em 1995, 55% eram produzidos por actinomicetos do gênero *Streptomyces*, 11% por outros actinomicetos, cerca de 12% por bactérias não filamentosas e os 22% restantes por fungos filamentosos (Berdy, 1995). As bactérias do gênero *Streptomyces* também são produtoras de uma grande quantidade de enzimas extracelulares de grande interesse no setor industrial. Dentre as que se destacam temos as proteases (Henderson *et al.*, 1987), celulasas, nucleases, amilases (Long *et al.*, 1987), quitinases e xilanases (Morosoli *et al.*, 1986).

2.1.2. Ciclo de vida

Os estreptomicetos apresentam um ciclo de vida complexo que implica em processos de diferenciação morfológica e fisiológica. Estas bactérias são capazes de colonizar substratos relativamente secos com restos de matéria orgânica, formando uma rede de hifas ramificadas que formam o micélio de substrato. Estas hifas obtêm os nutrientes da degradação do material orgânico insolúvel pela ação de numerosas enzimas hidrolíticas (Chater e Bruton, 1985). Na primeira etapa do ciclo de vida, inicia-se um processo de acumulação de nutrientes de reserva (lipídeos, glicogênio e polifosfatos). Quando estes nutrientes acabam e a carência nutricional aumenta, enviam-se sinais que ativam a expressão de genes envolvidos na formação do micélio aéreo. Nesta etapa, se inicia o desenvolvimento das hifas que emergem do micélio de substrato para produzir o micélio aéreo. Estas hifas vão se nutrir dos produtos de degradação do micélio de substrato e, numa segunda etapa, vão sofrer um processo de enrolamento, formação de septos e engrossamento da parede celular para produzir uma cadeia de esporos unicelulares, que são liberados e em condições adequadas, podendo germinar e desenvolver um novo micélio de substrato (Kieser *et al.*, 2000) (Figura 2).

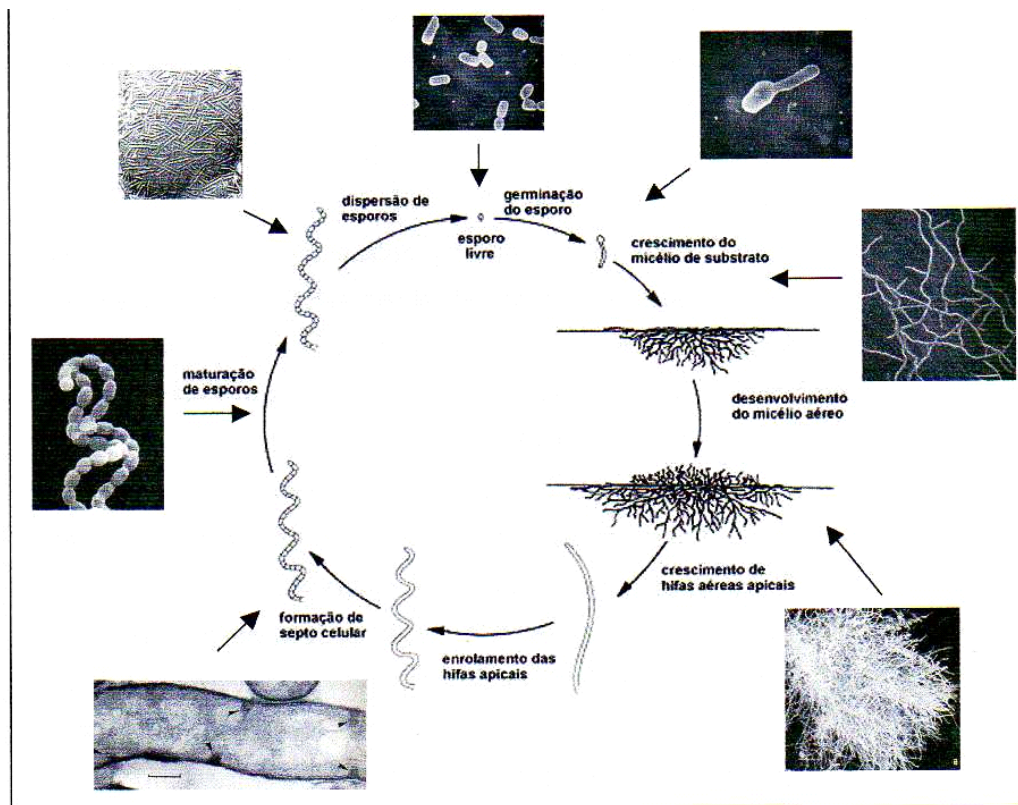


Figura 2: Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* (Adaptado por Garrido, 2005)

2.1.3. Organização genômica.

Segundo os estudos feitos com eletroforese de campo pulsado de diferentes cromossomos de espécies de *Streptomyces* como *S. coelicolor* (Kieser *et al.*, 1992), *S. ambofaciens* (Leblond *et al.*, 1990), *S. lividans* (Leblond *et al.*, 1993), *S. griseus* (Lezhava *et al.*, 1995) e *S. rimosus* (Pandza *et al.*, 1997), observou-se que o genoma de *Streptomyces* tem um tamanho aproximado de 8 Mb e que apresenta seqüências repetidas invertidas nos extremos dos cromossomos, podendo ser muito instáveis e sofrer deleções de até 2 Mb. Acredita-se que estas regiões tenham uma função de evitar a deleção de outras regiões do cromossomo que sejam essenciais (Redenbach *et al.*, 1996).

Na atualidade, encontram-se seqüenciados o genoma completo de *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002) e de *Streptomyces avermitilis* (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003).

S. coelicolor possui um cromossomo linear de 8.667.507 pb com 7.825 genes hipotéticos e aproximadamente 20 agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de

metabólitos secundários. No caso de *S. avermitilis*, o genoma também possui um cromossomo linear de 9.025.608 pb que codifica aproximadamente 7.574 fases abertas de leitura (ORF), com aproximadamente 30 agrupamentos gênicos relacionados com o metabolismo secundário. Uma comparação global entre os dois genomas determinou que a distribuição gênica não é aleatória, pois os genes essenciais, como aqueles envolvidos na divisão celular, na replicação do DNA, transcrição, tradução e biossíntese de aminoácidos, encontram-se na região centromérica, mas os genes relacionados ao metabolismo secundário ou enzimas hidrolíticas localizam-se nos extremos do cromossomo. Acredita-se que é uma forma de evitar a perda de genes essenciais por causa das deleções que podem acontecer nos extremos dos cromossomos.

Os elementos extracromossomais são freqüentes em *Streptomyces*. Já foram descritos plasmídeos circulares fechados de tamanho e número de cópias muito variável (Hopwood *et al.*, 1985) e plasmídeos lineares com proteínas associadas a seus extremos (Kinashi e Shimaji-Murayama, 1991). Também tem sido reportada a existência de plasmídeos capazes de se integrar em sítios específicos do cromossomo de *Streptomyces* (Brown *et al.*, 1988; Mazodier *et al.*, 1990; Combes *et al.*, 2002). Os plasmídeos servem como ferramenta para estudos genéticos e experimentos de biossíntese combinatória em *Streptomyces*.

2.2. Antibióticos

Os antibióticos são metabólitos secundários de baixo peso molecular, cuja atividade biológica consiste basicamente em inibir o crescimento de microrganismos diferentes a dos produtores e em baixas concentrações, conferindo uma vantagem seletiva para estes.

Além desta atividade antibiótica, alguns desses metabólitos secundários podem apresentar outras atividades de grande interesse farmacológico (Demain, 1989; Demain, 1999). Existem metabólitos com atividade imunossupressora, como o macrolídeo FK506 (Kino *et al.*, 1987), metabólitos capazes de induzir a motilidade gástrica em problemas digestivos, como a eritromicina (Itoh *et al.*, 1984); e metabólitos secundários que apresentam propriedades hipocolesterolêmicas como as estatinas (Endo e Hamusami, 1992), entre outros.

Dentre os principais antibióticos produzidos por fungos e bactérias temos os policetídeos, que são compostos sintetizados pelas bactérias Gram positivas *Streptomyces*.

2.2.1. Policetídeos

Os policetídeos são metabólitos secundários, produzidos pela maioria dos actinomicetos, que englobam um grande número de compostos com estruturas químicas muito diversas apesar de ter um padrão de biosíntese em comum. As enzimas encarregadas da síntese destes compostos são conhecidas como policetídeo sintase (PKSs) e atuam pela adição sucessiva de unidades de ácido carboxílico para construir uma cadeia carbônica. As unidades iniciais de construção podem ser de várias classes: acetato, propionato e butirato, principalmente. O fato que o processo de biossíntese gera grupos ceto alternados dão lugar ao nome policetídeos para esta família de compostos. Todos os compostos policetídeos têm em comum uma via biossintética que a partir de uma unidade iniciadora, e por sucessivas incorporações de unidades de alongação, gera-se uma cadeia policetídea linear na qual os grupos cetos podem se apresentar parcialmente reduzidos. Posteriormente, esta cadeia sofrerá ciclizações seguida de uma série de modificações pós-PKS para dar origem à estrutura característica de cada policetídeo.

A enzima chave na biossíntese destes compostos é a policetídeo sintase (PKS). Trata-se de uma atividade muito parecida as sintases de ácidos graxos de cadeia longa (FASs), na qual participam diferentes enzimas como aciltransferase (AT), cetosintase (KS), proteína transportadora de acilas (ACP), cetorredutase (KR), desidratase (DH) e enoilredutase (ER) (Hopwood e Sherman, 1990).

O esquema básico para a formação dos ácidos graxos de cadeia longa em animais é um dos mais estudados e consiste de uma incorporação sucessiva de unidades de alongação a partir de uma unidade iniciadora de acetato, ambas unidades em forma de tioésteres ligados à CoA (Coenzima A). A molécula de acetato, unidade iniciadora, é transferida inicialmente pela ação de uma AT desde a CoA ao grupo tiol da molécula 4'-fosfopantoteína do domínio ACP para sua posterior condensação. Por sua vez, a unidade alongadora após ativar-se em forma de malonil-CoA é transferida a unidade iniciadora. Em seguida, ocorre a condensação

entre ambas as moléculas pelo domínio KS, condensação que se realiza com a concomitante perda de um carbono por decarboxilação da unidade elongadora. O resultado é a formação de um resíduo policetídeo de 4 carbonos contendo um grupo ceto ligado ao carbono β e unido à molécula de 4'-fosfopantoteína do domínio ACP. O carbono ligado ao grupo ceto sofrerá reações de β -cetoredução, desidratação e enoilredução que levarão à formação de um ácido graxo saturado. No caso da síntese de policetídeos, por sucessivas condensações de unidades de elongação seguidas de diferentes níveis de redução do carbono ligado ao grupo ceto, obtêm-se uma cadeia policetídea (Figura 3).

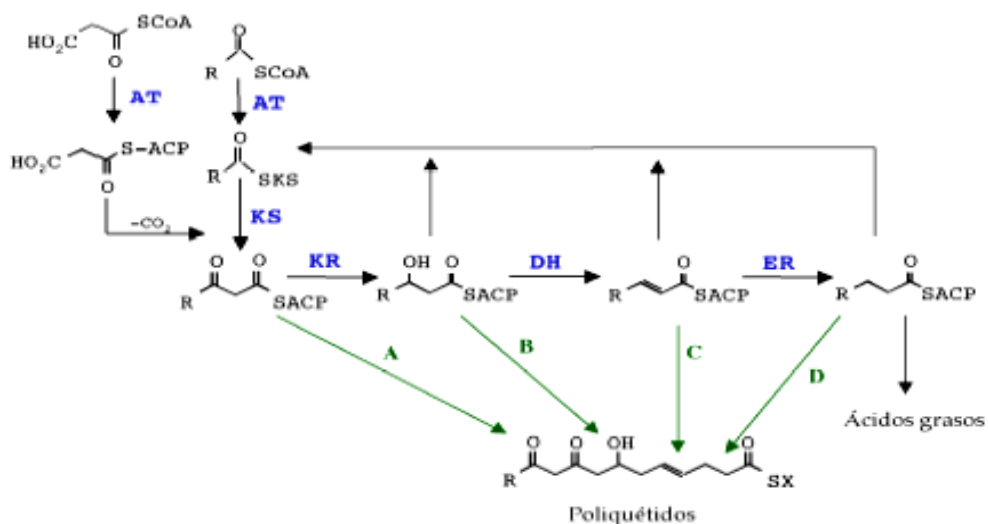


Figura 3: Via básica de biossíntese de ácidos graxos e policetídeos. As letras A, B, C e D, correspondem aos distintos graus de redução que pode sofrer a cadeia policetídea. Aciltransferase (AT), cetosintase (KS), proteína transportadora de grupos acilo (ACP), cetoredução (KR), desidratase (DH) e enoilredução (ER) (Lopez, 2005).

Deve-se lembrar que apesar dos mecanismos biossintéticos dos ácidos graxos de cadeia longa e dos policetídeos serem parecidos, possuem algumas diferenças (Katz e Donadio, 1993). A unidade iniciadora em ambos os casos pode ser acetil-CoA ou outro tioéster-CoA, enquanto a unidade elongadora para ácidos graxos será malonil-CoA. Em policetídeos aromáticos, pode variar no caso dos policetídeos complexos, nos quais se pode incorporar metilmalonil-CoA ou etilmalonil-CoA, originando-se cadeias laterais ou etil na estrutura do policetídeo.

Outra diferença, nos policetídeos, é no processamento dos grupos ceto quando são adicionados, estes não são constantes, podendo dar lugar à formação do grupo ceto, hidroxil, enoil ou ligações C-C totalmente saturados devido aos níveis de redução que o carbono ligado ao grupo ceto pode sofrer. Além disso, uma vez sintetizada a cadeia, esta sofre processos de condensação e ciclização que dão lugar aos policetídeos aromáticos ou macrocíclicos, e podem ainda sofrer outras modificações como: glicosilações, amidações, etc.

2.2.2. Tipos de PKSs

É proposto que as PKSs podem ter uma origem evolutiva comum a partir das FASs (fatty acid synthases), enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos, as quais são divididas em dois grupos: FASs tipo I (fungos e vertebrados) e FASs tipo II (bactérias e plantas) Sendo assim, por analogia com as mesmas, as PKSs também se classificam em PKS tipo I e tipo II (Hutchinson e Fujii, 1995). Recentemente, foi identificada a PKS tipo III como um sistema intermediário (Izumikawa *et al.*, 2003) (Figura 4).

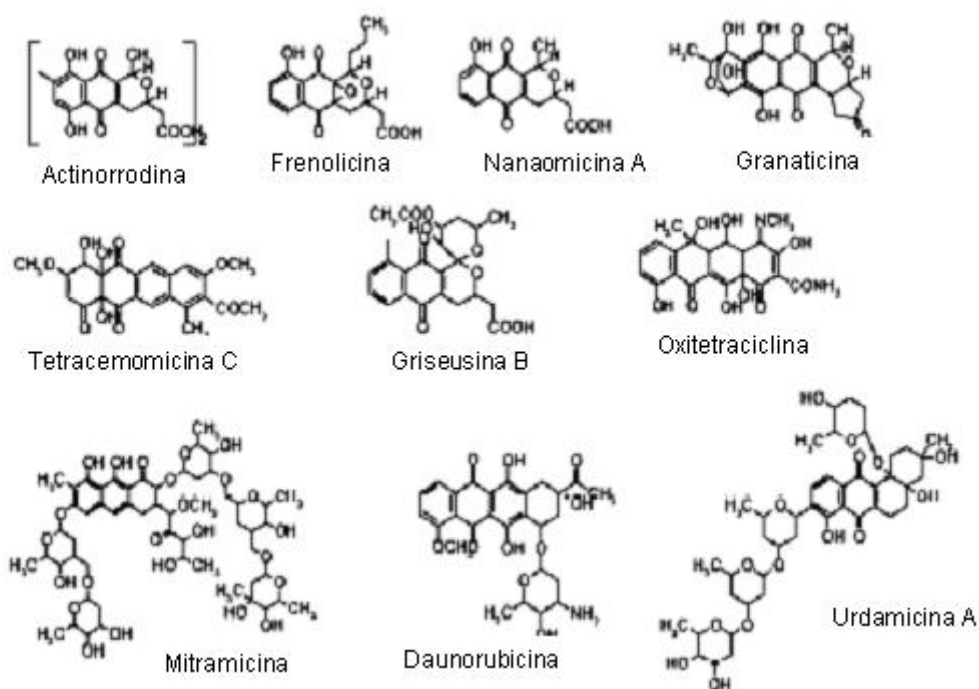


Figura 4: Estrutura química de algumas moléculas de policetídeos do tipo I, II e III.

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 policetídea (Cortés *et al.*, 1990; Donadio *et al.*, 1991; Aparicio *et al.*, 1996). As PKSs tipo II correspondem a um complexo multienzimático formado por várias proteínas que vão agir de forma reiterada para originar a cadeia policetídea. 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 e Hopke, 2001; Saxena *et al.*, 2003). Além do que, existe uma diferença estrutural e uma grande complexidade genética.

2.2.3. Policetídeos tipo II

Este tipo de policetídeo diverge dos PKs tipo I por apresentarem um anel aromático na sua estrutura química. Estas estruturas são muito diversas. A via biossintética dos policetídeos aromáticos que melhor foi elucidada é a síntese da actinorodina, produzida por *S. coelicolor* A3(2) (Wright e Hopwood, 1976) (Figura 5). Este foi o primeiro agrupamento gênico caracterizado. A PKS mínima é formada pelo heterodímero (KS α , KS β) e ACP, sendo que a proteína KS α realiza a condensação e apresenta os centros ativos para as atividades KS e AT (Fernández-Moreno *et al.*, 1992), e a proteína KS β é homóloga mas não possui os sítios ativos e parece ser a determinante do comprimento da cadeia policetídea (McDaniel *et al.*, 1995). Por este motivo, foi dado o nome de fator determinante da elongação ou CLF (Chain Length Factor), necessária para a biossíntese da cadeia policetídea (Bisang *et al.*, 1999). A outra proteína que forma parte da PKS mínima é a proteína transportadora do radical acila (ACP). A atividade AT transfere as diferentes unidades implicadas na montagem da cadeia policetídea ao grupo tiol 4'-fosfopantoteína e se encarrega de aproximá-la ao centro ativo das KS, para a condensação. A biossíntese da maioria dos policetídeos aromáticos começa com o acetato como unidade iniciadora, exceto no caso de oxitetraciclina que começa com malonamida e da daunomicina que começa com propionato. Outras atividades enzimáticas envolvidas na formação dos policetídeos aromáticos são a ceto redutase (KR), que catalisa a cetoredução da cadeia policetídea crescente, a aromatase (ARO), que catalisa a aromatização da cadeia nascente e a ciclase (CYC), envolvida na correta ciclização da cadeia

policetídea. Estas últimas atividades (ARO e CYC) costumam aparecer juntas na mesma proteína.

A PKS tipo II atua em todos os passos da síntese de modo reiterativo, num processo em que os grupos β -carbonil formados ficam na sua maioria sem reduzir.

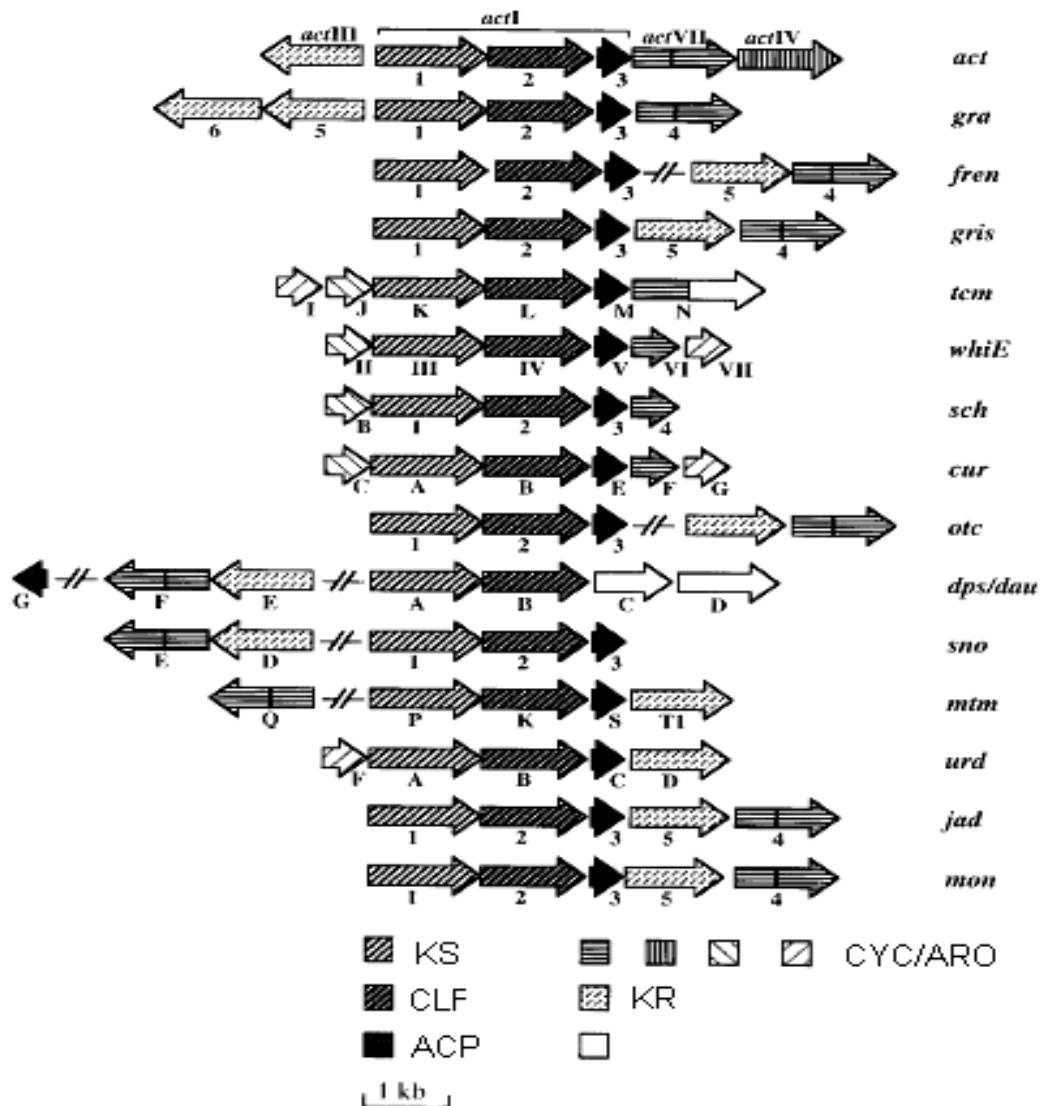


Figura 5: Genes envolvidos na síntese da cadeia do PKS tipo II, na redução, ciclização ou aromatização (Hopwood, 1997). *act* (actinorodina), *gra* (granaticina), *fren* (frenolicina), *gris* (griseofulvina), *tcm* (tetracenomicina), *whiE* (pigmento de esporo de *S. coelicolor*), *sch*, *cur* (pigmento de esporo de *S. curacoï*), *otc* (oxitetraciclina), *dps/dau* (daunorubicina), *sno* (nogalamicina), *mtm* (mitramicina), *urd* (urdamicina), *jad* (jadomicina), *mon* (monensina). KS (cetosintase), CLF (fator determinante do tamanho da cadeia ou subunidade β da cetosintase), ACP (proteína carregadora de acilas), CYC (ciclase), ARO (aromatase), KR (cetoreductase) (Hopwood, 1997).

2.3. Cosmomicina sintetizada por *Streptomyces olindensis*

Estudos feitos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE), permitiram isolar várias linhagens de *Streptomyces* produtoras de antraciclinas. Dentre elas pode-se destacar a *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622, que produz um complexo policetídeo de cor roxa pertencente ao grupo das antraciclinas (Furlan *et al.*, 2004). Na época, este complexo policetídeo foi denominado de retamicina, molécula que possuía 3 açúcares no carbono 10 da aglicona, evento inédito nas antraciclinas. Estudos posteriores determinaram que a molécula ainda estava ligada a 3 açúcares no carbono 7 e 3 açúcares no carbono 10 (Furlan *et al.*, 2004). Esta molécula foi denominada cosmomicina. Estudos prévios feitos em *Streptomyces cosmosus* nov. sp. determinaram que este organismo produzia 4 compostos denominados cosmomicina A, cosmomicina B, cosmomicina C e cosmomicina D (Tabela 1), os quais diferiam no número de açúcares incorporados na aglicona e no açúcar propriamente dito (Morioka *et al.*, 1985).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das Cosmomicinas A, B,C e D.

	Cosmomicina A	Cosmomicina B	Cosmomicina C	Cosmomicina D
Peso molecular	756	772	1173	1189
Fórmula molecular	$C_{40}H_{33}O_{13}N$	$C_{40}H_{33}O_{14}N$	$C_{40}H_{39}O_{21}N_2$	$C_{40}H_{39}O_{22}N_2$

As cosmomicinas pertencem a um grupo muito interessante de moléculas que apresentam um dos mais complexos padrões de glicosilação presentes entre as antraciclinas, com duas cadeias trissacarídicas localizadas no carbono 7 e no carbono 10 da aglicona γ -rodomicinona (Furlan *et al.*, 2004). A partir de estudos de espectroscopia de massa foram determinadas diferenças entre as frações de trissacarídeos destas moléculas, variando na posição dos açúcares: L-rodosamina, 2-desoxi-L-fucose e L-rodinose na aglicona (Figura 6).

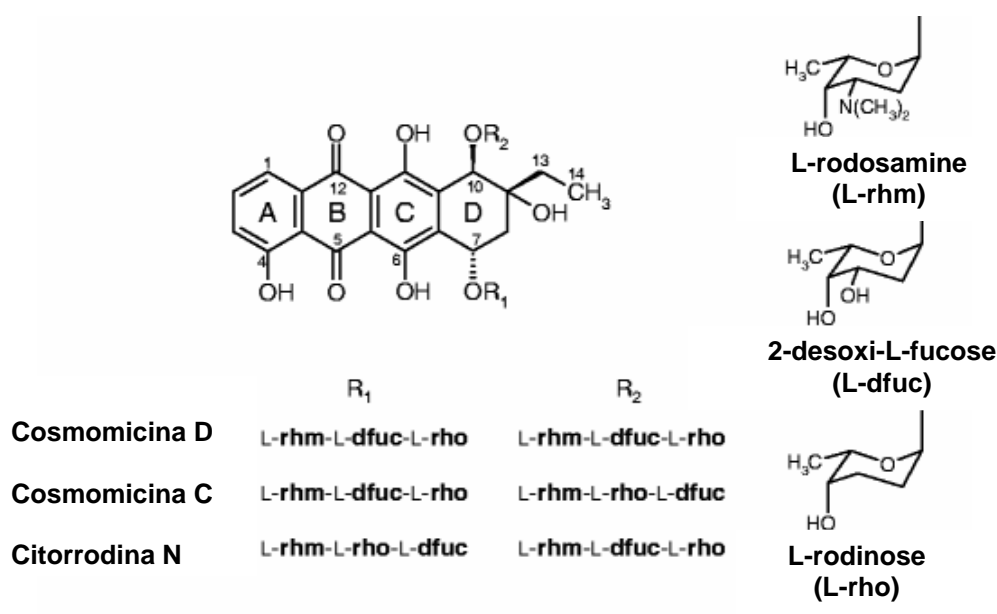


Figura 6: Estrutura química das cosmomicinas produzidas por *Streptomyces olindensis*. Frações químicas das moléculas produzidas por *S. olindensis* (Garrido *et al.*, 2006)

2.3.1. Biossíntese das cosmomicinas

As cosmomicinas são antibióticos do grupo das antraciclinas formadas a partir da condensação de um propionil-CoA, e 9 acetatos provenientes de malonil-CoA. As enzimas envolvidas neste processo de condensação são as cetosintase (KS α e KS β), proteínas carregadoras de acilas (ACP) e aciltransferases (AT).

A síntese da aglicona inicia-se com a incorporação de uma molécula de propionato na cetosintase, com o auxílio da unidade iniciadora e da aciltransferase da via, a partir deste momento a formação do esqueleto policetídeo será formado pela cetosintase em forma de heterodímero (KS α e KS β) e ACP.

Uma hipótese é que os monômeros dos policetídeos tipo II são os malonatos, os quais são carregados às ACPs provavelmente por uma malonil transferase da via de ácidos graxos (Keatinge-Clay *et al.*, 2004). Outra hipótese é que o próprio ACP possua a atividade aciltransferase e se junte à molécula de malonato, e em seguida a ACP entrega o malonato à cetosintase.

Nas antraciclinas que não possuem unidade iniciadora especial, e que são sintetizadas exclusivamente a partir de um malonato, ocorre uma descarboxilação do malonato ao acetato antes de ser carregado na KS α . Segundo a hipótese de Bisang e colaboradores (1999), esta ação ocorre através da KS β , posteriormente esta hipótese foi contestada por estudos cristalográficos conduzidos por Keatinge-Clay *et al* (2004).

Uma vez carregada com a unidade iniciadora (propionato ou acetato), iniciam-se os ciclos de alongação da cadeia. Nas antraciclinas, são incorporados nove acetatos à unidade iniciadora. A subunidade α possui a cisteína catalítica que ativa o carbono β do malonato, unindo o acetato à cadeia nascente e liberando gás carbônico. Na interface entre as subunidades do heterodímero existe um canal logo após a cisteína catalítica por onde entra a cadeia nascente (Figura 7). O tamanho do canal determina o tamanho da cadeia nascente (Keatinge-Clay *et al.* 2004).

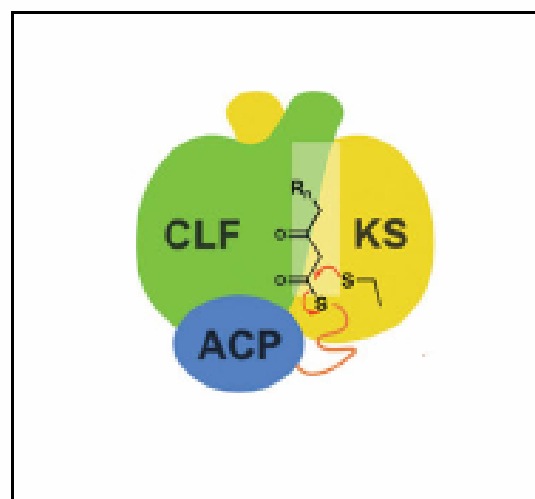


Figura 7: Estrutura da interação das subunidades da cetosintase, mostrando o canal que determina o tamanho da cadeia poliketídica (Adaptado por Garrido, 2005). CLF: Fator da cadeia alongadora ou subunidade da β -cetossintase. KS: Subunidade da α -cetossintase. ACP: Proteína transportadora de grupos acilas.

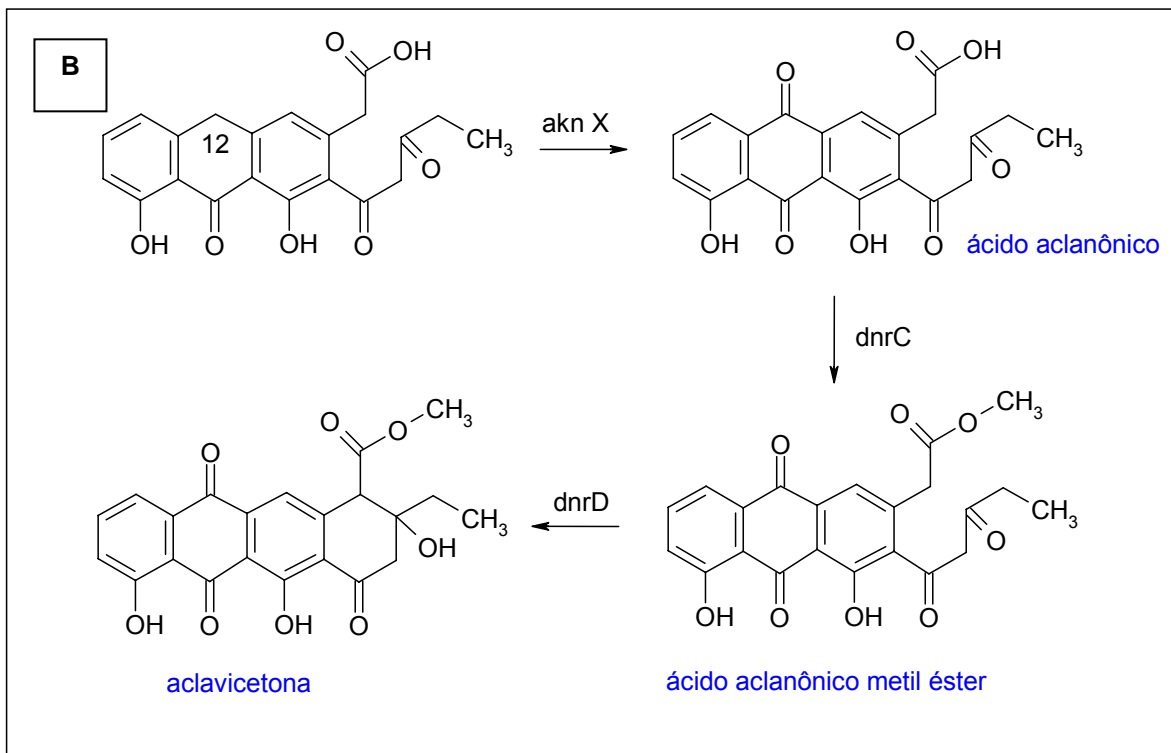
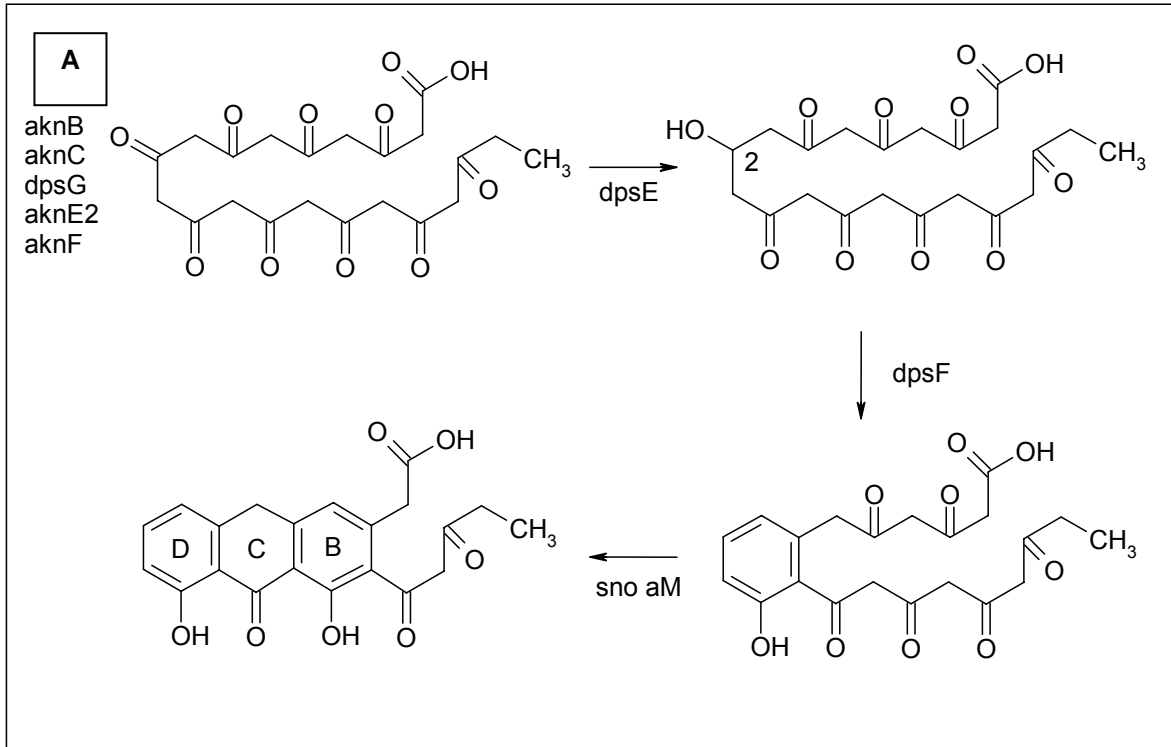
Após o término dos ciclos de alongação, ocorre a redução do carbono da posição 2 da aglicona (Hutchinson, 1997) por uma cetoreductase (como Dps E de *S. peucetius*), este passo é uma preparação para a atividade de uma CYC/ARO que irá formar o primeiro anel aromático da molécula (Kantola *et al.*, 2000) e assim determinar o padrão de dobramento da mesma. A ciclização do segundo e do terceiro anel pode ser feita por uma única CYC (Hautala *et al.*, 2003) (Figura 8A).

Estas reações não produzem metabólitos estáveis que possam ser identificados. Existe muita discussão com relação aos mecanismos de determinação do tamanho da cadeia, da escolha do propionato iniciador da síntese e da ciclização dos anéis. Alguns autores especulam que um conjunto de proteínas pode interagir nas características acima citadas (Strohl, 1997). Entretanto, Hautala e colaboradores. (2003) advertem que as enzimas endógenas dos microrganismos hospedeiros destes ensaios genéticos podem mascarar os resultados da expressão heteróloga destas proteínas.

Após a ciclização dos três primeiros anéis, ocorre a oxigenação do carbono da posição 12 (Chung *et al.*, 2002), formando o primeiro intermediário estável da via biossintética, o ácido aclanônico. Imediatamente após, este ácido é metilado por uma metil-transferase preparando, assim, a ação da enzima subsequente que promove a ciclização do quarto anel, formando a aclavicetona (Figura 8B) (Madduri e Hutchinson, 1995 e Kendrew *et al.*, 1999).

A aclavicetona é reduzida no carbono 7 formando a aclavinona, em seguida ocorre uma preparação para que o carbono 10 possa ser atacado pelas glicosiltransferases. Primeiramente, uma aclavinona-11-hidroxilase adiciona um grupo hidroxila na posição 11 da aclavinona, em seguida uma metil-esterase promove a formação do grupo carboxil no carbono 10 (Figura 8C).

O último passo para a formação da β -rodomicinona deve ser catalisado por uma enzima homóloga a Rdm B (Wang *et al.*, 2000), que é capaz de retirar o grupo carboxil do carbono 10 e posteriormente inserir uma hidroxila nesta posição. A aglicona está pronta para sofrer a ação das glicosiltransferases que adicionarão os açúcares nos carbonos 7 e 10 da molécula (Figura 8D).



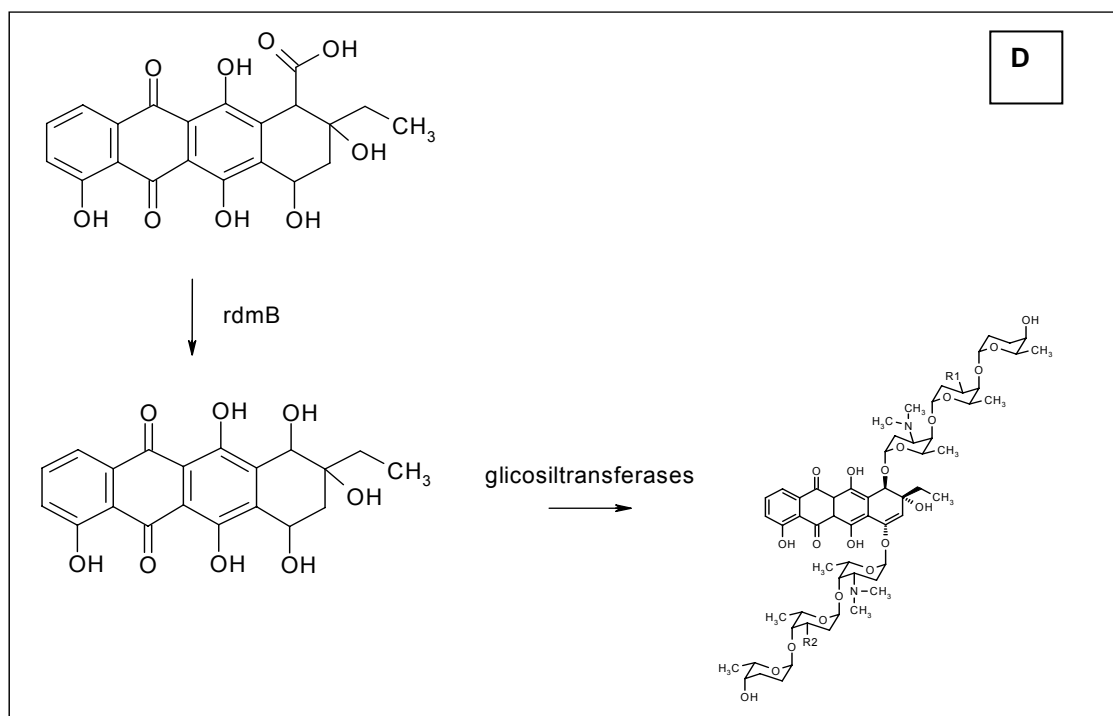
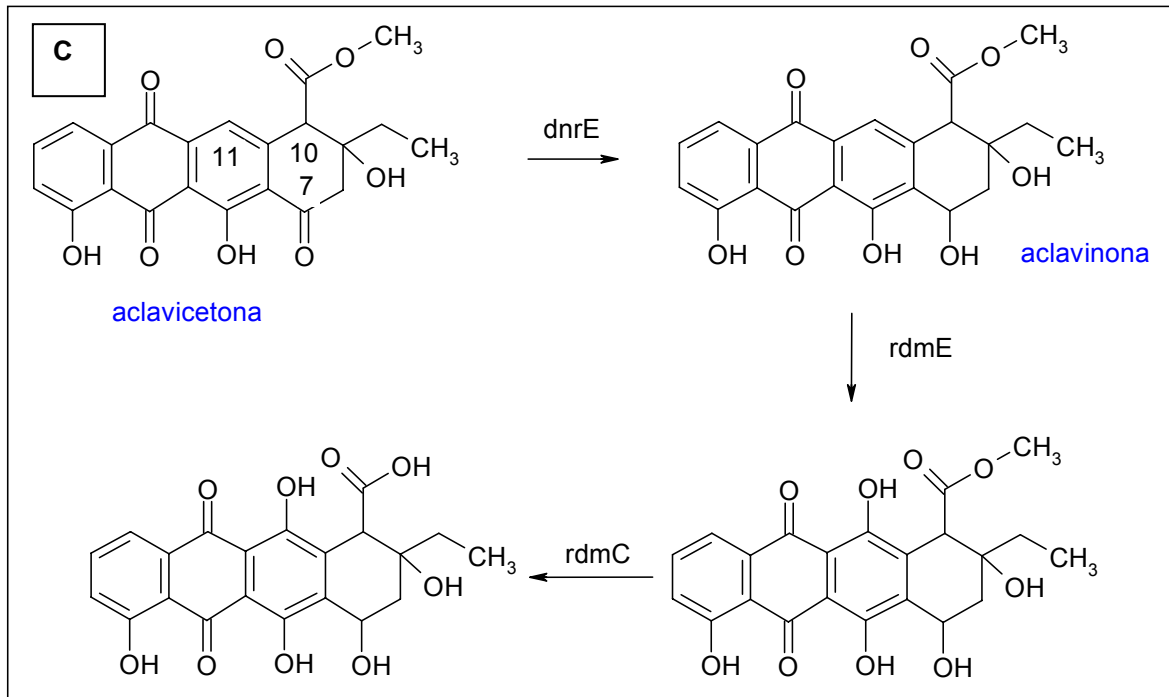


Figura 8: Etapas da biossintese de cosmomicinas. **A.** Formação do intermediário com os anéis B, C, D formados. *akn* B, C, E2 e F (Räty *et al.*, 2002); *dps* E (Hutchinson, 1997); *dps* F (Kantola *et al.*, 2000); *dps* G (Hutchinson, 1997); *snoaM* (Hautala *et al.*, 2003). **B.** formação de aclavictone. *akn* X (Räty *et al.*, 2002). **C.** Ação da *dnr* C e D (Madduri e Hutchinson, 1995). *dnr* E (Dickens, Ye, Strohl, 1996), *rdm* C e E (Niemi, 1994). **D.** Etapa final da síntese da cosmomicina *rdm* B (Wang *et al.*, 2000). (Garrido, 2005)

Os açúcares adicionados à molécula são 6-desoxihexoses derivadas de glicose-1-fosfato, os quais são primeiramente ativados com a transferência de uma timidina di-fosfato para o carbono 1 a partir de TTP. O açúcar ativado sofre a ação de uma enzima 4-6 glicose desidratase (Fig. 8), que forma a 6-desoxihexose com um grupo ceto na posição 4 do açúcar (TDP-4-ceto-6-desoxi-D-glicose). No caso de *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 que promove a mudança da conformação do açúcar de D para L, formando o último intermediário comum da biossíntese dos 3 açúcares presentes nas moléculas de cosmomicinas (dTDP-4-oxo-2,6-didesoxi-L-manose).

A partir deste intermediário pode-se sintetizar L-2-desoxi-fucose diretamente da redução do grupo ceto do carbono 4 mas para a 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 do carbono 4 (Figura 9).

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 esta amina é dimetilada formando L-rodosamina.

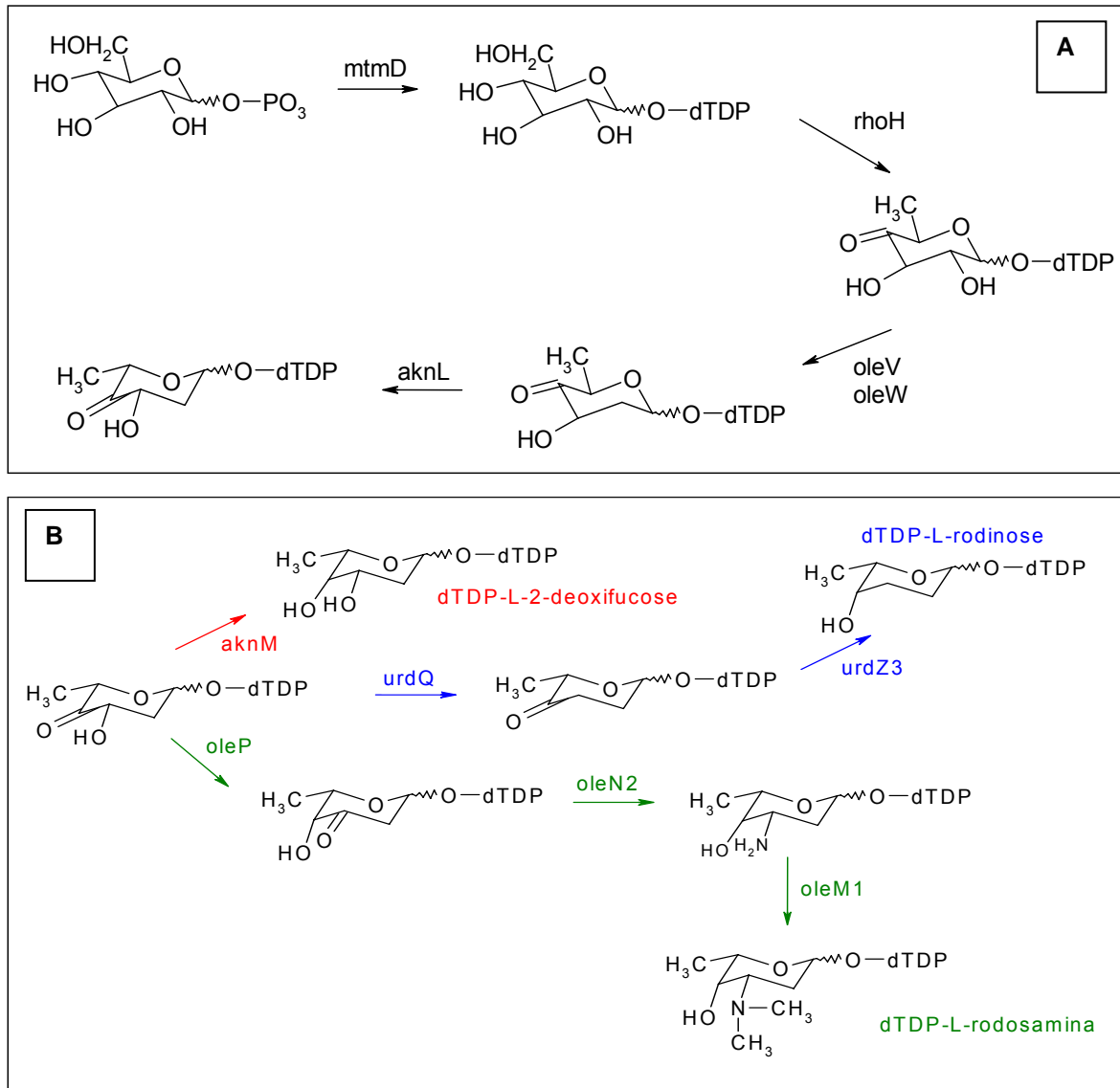


Figura 9: Biossíntese dos açúcares das cosmomicinas. **A.** *mtm D* (Lombo *et al.*, 1997), *rho H* (Miyamoto *et al.*, 2002), *ole V* e *W* (Aguirrezabalaga *et al.*, 2000), *akn L* (Ráty *et al.*, 2002). **B.** *akn M* (Ráty *et al.*, 2002), *urd Q* e *Z3* (Hoffmeister *et al.*, 2000), *ole P1*, *N2* e *M1* (Aguirrezabalaga *et al.*, 2000). (Garrido 2005)

2.3.2. Genes da via biossintética da cosmomicina

Na tese desenvolvida por Garrido (2005), foi construída uma biblioteca genômica de *S. olindensis* no cosmídeo Supercos I gerando 1485 clones. Na procura de novos genes envolvidos na síntese de antraciclinas foram desenhadas sondas específicas aos genes envolvidos na produção de policetídeos (SOKS), as quais foram utilizadas para fazer hibridações de “colony-blot” na biblioteca genômica. Desta forma, foi selecionado o cosmídeo p5E11, a partir da qual foi identificada uma

parte do agrupamento gênico de 14 Kb pertencente à via biossintética do antibiótico. Neste fragmento genômico, foi possível determinar a presença de 13 genes envolvidos na produção do antibiótico, entre os quais se destacam genes da síntese de PKS, síntese de açúcares, glicosiltransferases, genes reguladores, genes de resistência e outros com função ainda desconhecida (Figura 10). Estes genes foram comparados e apresentam homologia com genes de várias espécies de *Streptomyces* (Tabela 2).

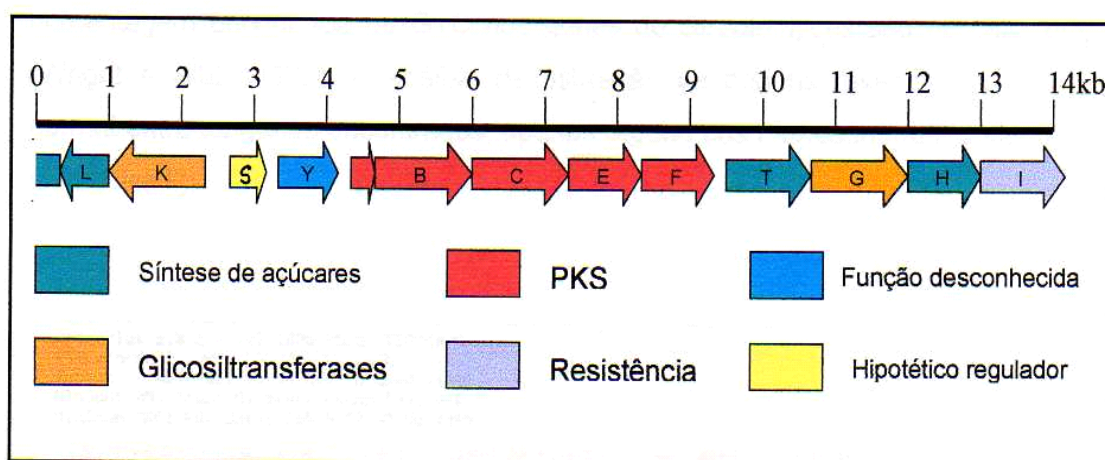


Figura 10: Organização gênica do cosmídeo p5E11, indicando os genes elucidados nos 14 Kb já seqüenciados (Garrido, 2005).

Tabela 2: Maiores homologias encontradas pelos genes *cos* de *S. olindensis* com outras espécies de *Streptomyces* (Garrido, 2005).

Gene	Tamanho do gene	Função proposta	Gene com maior homologia	Microrganismo de origem	Identidade (%)	Número de acesso ao NCBI da proteína correspondente ao gene de maior homologia
<i>cos M</i>	incompleto	4-ceto redutase	<i>acl M</i>	<i>S. galilaeus</i>	53	BAB72039
<i>cos L</i>	627 pb	3-5 epimerase	<i>acl L</i>	<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0274	66	BAC55217
<i>cos K</i>	1293 pb	glicosiltransferase	<i>akn K</i>	<i>S. galilaeus</i>	64	AAK70102
<i>cos S</i>	564 pb	regulador hipotético	<i>acl S</i>	<i>S. galilaeus</i>	54	BAB72058
<i>cos Y</i>	978 pb	desconhecido	<i>ocd</i>	<i>Azoarcus</i> sp	28	CAI08482
<i>cos X</i>	354 pb	monoxigenase	<i>akn X</i>	<i>S. galilaeus</i>	55	BAB72044
<i>cos B</i>	1269 pb	cetosintase α	<i>akn B</i>	<i>S. purpurascens</i>	95	BAA92276
<i>cos C</i>	1245 pb	cetosintase β	<i>akn C</i>	<i>S. galilaeus</i>	65	BAB72046
<i>cos E</i>	1035 pb	cetosintase iniciador	<i>akn E2</i>	<i>S. galilaeus</i>	64	AAF70109
<i>cos F</i>	1050 pb	aciltransferase	<i>akn F</i>	<i>S. galilaeus</i>	66	BAB72049
<i>cos T</i>	1251 pb	hipotética 3-4 isomerase	<i>rho F</i>	<i>S. violaceus</i>	84	BAB87834
<i>cos G</i>	1281 pb	glicosiltransferase	<i>rho G</i>	<i>S. violaceus</i>	96	BAB87835
<i>cos H</i>	984 pb	4-6 desidratase	<i>rho H</i>	<i>S. violaceus</i>	95	BAB87836
<i>cos I</i>	990 pb	transportador ABC – ligador ATP	<i>rho I</i>	<i>S. violaceus</i>	94	BAB87837

A elucidação destes genes fornecerá dados importantes para futuros estudos e para o melhor entendimento da função dos genes envolvidos na via biossintética da cosmomicina.

2.3.2.1. Gene *cosS*: possível gene regulador.

A produção de metabólitos secundários é regulada em resposta a uma alteração no estado nutricional e às variações nas condições ambientais (Bibb, 1996, Champness e Chater, 1994). O controle desta produção opera em vários níveis: o primeiro está relacionado aos genes que exercem controle pleiotrópico em um ou mais aspectos do metabolismo secundário, como a produção do antibiótico ou a diferenciação morfológica (Chater e Bibb, 1997) e o segundo está composto por genes reguladores que afetam a via biossintética do antibiótico. Esses genes

reguladores usualmente se encontram em agrupamentos gênicos codificadores da enzima das vias de biossintéticas do antibiótico (Ishizuca *et al.* 1992).

Em actinomicetos, a regulação característica é via SARPs (Proteínas reguladoras do antibiótico de *Streptomyces*), a qual tem sido identificada com base nas seqüências e motivos homólogos, como também pelos estudos de complementação (Wietzorrek e Bibb, 1997). Membros desta família são caracterizados pela presença de um domínio Omp-R-like DNA-binding (Mizuno e Tanaka, 1997) e inclui reguladores positivos da via de actinorodina ActII-Orf4, DnrI da via da daunorubicina (Madduri e Hutchinson, 1995), RedD via da undecilprodigiosina (Narva e Feitelson, 1990), CcaR que regula as vias da cefamicina e o ácido clavulânico (Pérez-Llarena *et al.*, 1997) entre outras. Outro exemplo é a via biossintética da tilosina que contém genes reguladores hipotéticos de várias famílias diferentes (Bate *et al.*, 2002). Estes genes incluem a *tylR*, que é um regulador global da produção da tirosina e os reguladores *tylS* e *tylT* (da família das SARP) e *tylP* um produto do receptor γ -butirolactona (Antón *et al.*, 2004).

Nos anos 90, outra família de reguladores transcricionais foi identificada (De Schrijver e De Mot, 1999). Esta nova família é um tipo de regulador da maltose em *Escherichia coli* (Boos e Shuman, 1998) amplamente chamada como reguladores ATP-binding da família LuxR (LAL), esta é caracterizada pelo seu tamanho (872 a 1159 aminoácidos) comparado com a família do SARP (entre 277 e 665 aminoácidos). Possui um motivo conservado WalkerA (Walker *et al.*, 1982) e um domínio C-terminal LuxR-like DNA-binding, caracterizado por um motivo "helix-turn-helix" (HTM).

Três reguladores que pertencem ao grupo dos policetídeos aparecem neste grupo, incluindo a PikD pertencente à via da picromicina em *Streptomyces venezuelae* (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), RapH da via da rapamicina em *Streptomyces hygroscopicus* (Aparicio *et al.*, 1996, Schwecke *et al.*, 1995) e NysRI e NysRIII da via da nistatina em *Streptomyces noursei* (Demain, 1992). A função das LALs na regulação da biossíntese dos policetídeos ainda não foi descrita e seu papel ainda está em estudo (Wilson *et al.*, 2001).

O estudo sobre a função destes genes reguladores pode ser determinado pela presença ou ausência destes genes, e as respostas reguladoras antes da produção do antibiótico. A ausência de certos tipos de respostas reguladoras

poderia ser importante para determinar os grupos filogenéticos e os mecanismos de sinais de tradução de seus membros (Galperin, 2006).

Estudos filogenéticos realizados com vários tipos de reguladores transcricionais determinaram quais são os domínios mais comuns nas bactérias (Figura 11). Podem se destacar alguns reguladores transcricionais que codificam para proteínas de actinobactérias como da família SARP (Wietzorrek e Bibb, 1997), que combinam o domínio HTH com o domínio BTAD, mas a função é ainda desconhecida (Yeats *et al.*, 2003).

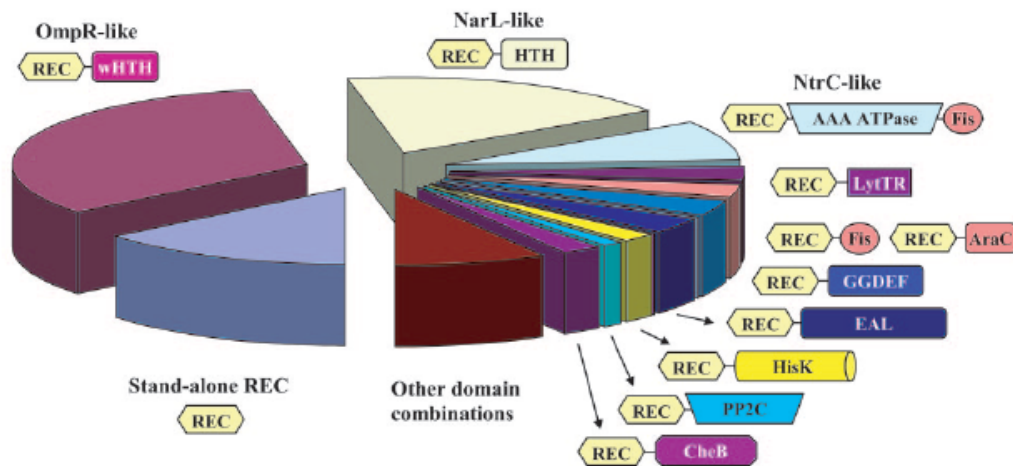


Figura 11: Arquitetura dos domínios das respostas reguladoras mais comuns em bactérias. Destaque-se os domínios OmpR-like (Galperin, 2006).

Alguns genes ainda não são muito conhecidos como é o caso do gene *cosS* que tem uma alta similaridade ao gene *aciS* de *Streptomyces galileus*. Estes genes codificam para o domínio PadR, que é um membro dos reguladores transcricionais (Garrido, 2005). Esta proteína está envolvida na regulação negativa do metabolismo de ácidos fenólicos (Gury *et al.*, 2004).

2.3.2.2. Gene *cosY* : possível ornitina ciclodesaminase.

Ornitina ciclodesaminase (Ocd) é um membro da família da proteína μ -cristalino de mamíferos, na qual a atividade biológica consiste na conversão de L-ornitina a L-prolina e amônia (Goodman *et al.*, 2004). Para tentar entender os grupos

funcionais desta enzima que estão envolvidas na catálise foi feita a cristalização da proteína Ocd de *Pseudomona putida* (Alam *et al.*, 2004).

A reação enzimática em que está envolvida a ornitina ciclodesaminase (Figura 12) inclui organismos como *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Clostridium*, e *Brucella*. Esta reação precisa de NAD⁺, na qual se acredita que tem uma função catalítica (Schindler *et al.*, 1989).

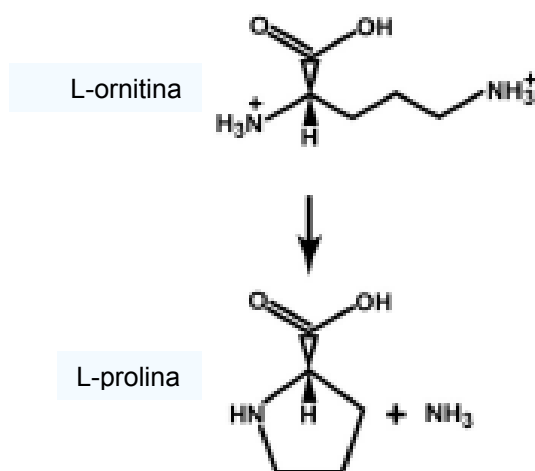


Figura 12: Conversão enzimática de L-ornitina a L-prolina e amônia pela enzima bacteriana ornitina ciclodesaminase (Alam *et al.*, 2004).

Seqüências homólogas à proteína Ocd têm sido identificadas numa variedade de genomas de bactérias e Archeae, e indicam a importância desta enzima no crescimento e na sobrevivência (Alam *et al.*, 2004). Os membros da proteína μ -cristalino são o principal constituinte do cristalino dos olhos de vários marsupiais (Kim *et al.*, 1992). A função ainda não está clara, mas tem uma função reguladora no uso dos aminoácidos como neurotransmissores (Barnstable, 1993).

O gene *ocd* já foi descrito previamente por Ikeda e colaboradores (2003), mas a sua presença está relacionada a biossíntese dos peptídeos não ribossômicos (nrps) (Omura *et al.*, 2001), estruturas de baixo peso molecular e amplo espectro nas atividades biológicas (Figura 13). Ainda não está definida sua função na via biossintética do antibiótico.

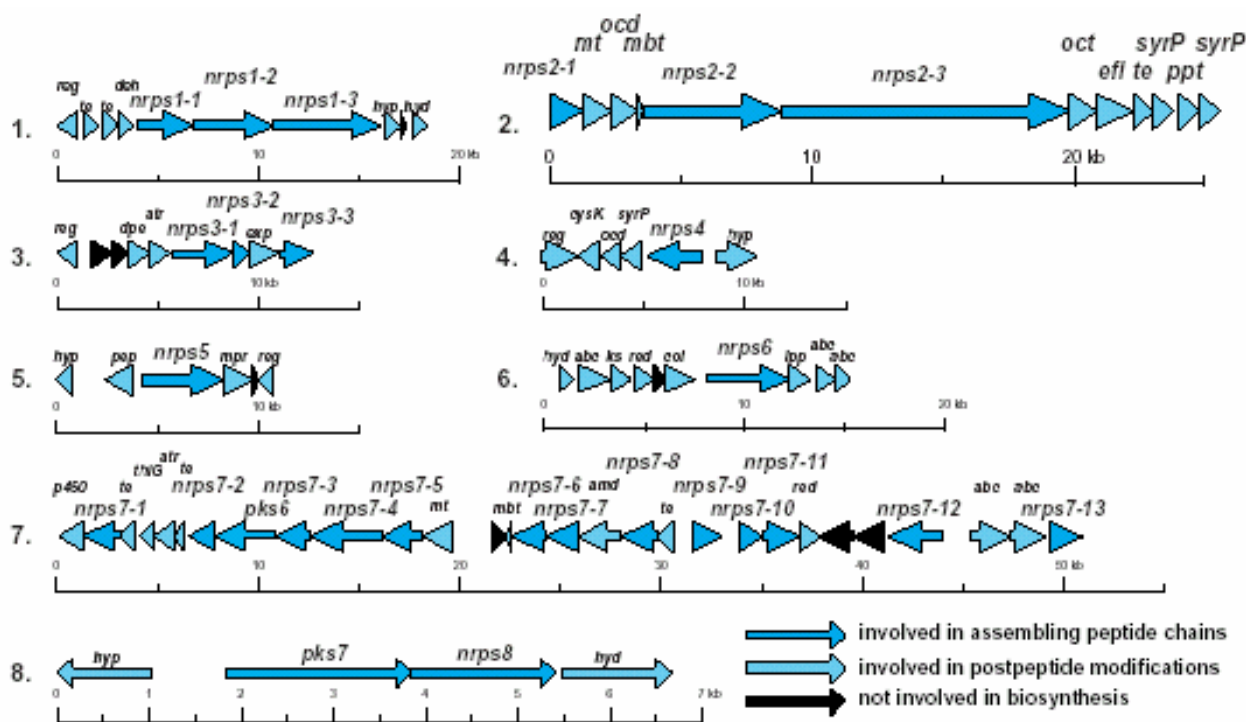


Figura 13: Genes pertencentes ao agrupamento gênico da biossintese dos peptídeos. *abc*, ABC transporter; *amd*, amidase; *atr*, aminotransferase; *col*, ácidos graxos CoA ligase; *cysK*, proteína *cysK*-like; *deh*, desidrogenase; *dpe*, DAP epimerase; *efl*, proteína de efluxo; *exp*, proteína exportadora; *hyd*, hidrolase; *hyp*, proteína hipotética; *ks*, cetosintase; *lpp*, lipoproteína; *mbt*, proteína *mbtH*-like; *mpr*, metaloprotease; *mt*, metiltransferase; *nrps*, NRPS; *ocd*, ornitina ciclodesaminase; *oct*, ornitina carbamoiltransferase; *p450*, citocromo P450; *pep*, peptidase; *pks*, PKS; *ppt*, fosfopanteteinil transferase; *red*, redutase; *syrP*, proteína *syrP*-like; *te*, tioesterase; *thiG*, proteína *thiG*-like (Omura *et al.*, 2001).

Estudos realizados com o ácido clavulânico determinaram que a arginina e ornitina atuam como precursores deste antibiótico, apesar de que esta influência ainda não está clara (Romero *et al.* 1986). Tem-se demonstrado que a adição de ornitina chega a dobrar a produção do ácido clavulânico, esse aumento foi encontrado em fermentadores a uma concentração de 10 mM em uma incubação de 30 horas no meio GSPO (concentração final 20mM).

Outras evidências da presença da ornitina ciclodesaminase em espécies de *Streptomyces* determinaram que a função seria transformar L-ornitina em L-prolina, mas a importância consiste na liberação da amônia para transformar L-serina em L-2,3-diaminopropionato na via biossintética da viomicina. O gene encarregado de cumprir esta função é *vioK*, que é um homólogo da ornitina ciclodesaminase (Thomas *et al.*, 2003). Estes autores afirmam que esta enzima atua como uma

aminotransferase durante a primeira etapa da biossíntese da viomicina, na qual a amônia é relevante.

2.3.2.3. Glicosiltransferases

Os microrganismos, principalmente os actinomicetos produzem uma ampla variedade de compostos glicosilados com atividade biológica, tais como antibióticos antitumorais.

A maioria das moléculas sacarídeas dos compostos bioativos glicosilados são principalmente desoxiaçúcares, os quais são incorporados à aglicona. Usualmente, esta glicosilação ocorre nos últimos passos da biossíntese (Blanco *et al.*, 2001) e a adição dos respectivos açúcares, em geral é importante para a atividade biológica da molécula. A maioria destes açúcares pertence à família das 6-desoxihexoses as quais formam parte de um grande número de produtos naturais que tem propriedades farmacológicas (Blanco *et al.*, 2001) e que na maioria dos casos tem atividade antibiótica (Räty *et al.*, 2002). As enzimas encarregadas da transferência destes açúcares são as glicosiltransferases, que apresentam certo grau de flexibilidade com relação ao nucleotídeo doador quanto ao nucleotídeo receptor (Trefzer *et al.*, 2001). Este fato é responsável pela diversidade encontrada nas cadeias de trissacarídeos em antibióticos como cosmomicina (Garrido *et al.*, 2006). Isto abre a possibilidade que as manipulações genéticas nos genes de glicosiltransferases possam gerar novas antraciclinas, sendo que nos últimos anos, padrões de glicosilação têm sido modificados devido à técnica de biossíntese combinatória (Mendez e Salas, 2001).

Os açúcares adicionados à aglicona podem ser monossacarídeos como na eritromicina A, doxorubicina e rebecamicina, dissacarídeos como na mitramicina ou trissacarídeos como urdamicina (Mendez e Salas, 2001), aclacinomicina (Lu *et al.*, 2004) ou cosmomicina (Garrido *et al.*, 2006).

Esta diversidade estrutural das moléculas permite formar uma ampla variedade de compostos naturais existentes em todos os organismos vivos, sendo mais elaborado em procariontes, pois estes produzem açúcares altamente

modificados, tal como se fossem tijolos nas paredes celulares e na biosíntese de metabólitos secundários. No caso dos metabólitos secundários, consiste em montar estas diferentes glicofomas da molécula aglicona que foi modificada de substrato ativado para molécula aceptora. Neste caso, depende muito do tipo de açúcar, da estereoquímica do açúcar, do número de moléculas glicosiladas, etc (Thibodeaux *et al.*, 2007).

Foram descritas duas enzimas glicosiltransferases em *S. olindensis* a *cosG* e *cosK* que participam da glicosilação na via biossintética da cosmomicina (Garrido *et al.*, 2006). A *CosG* é responsável pela incorporação da L-rodosamina na aglicona e pelos estudos feitos em mutantes que não possuem esta enzima (Garrido *et al.*, 2006), observou-se que ainda não se identificou outra glicosiltransferase que cumpra a mesma função. É importante lembrar que a *CosG* poderia adicionar este açúcar tanto na posição 7 como na posição 10 da aglicona. Enquanto a *CosK* é encarregada da adição do 2-desoxi-L-fucose ou L-rodinose (Garrido *et al.*, 2006). Outro gene que tem esta mesma função é o gene *aknK* encarregado de transferir 2-desoxi-L-fucose para a aglicona na via biossintética da aclacinomicina (Lu *et al.*, 2004).

Garrido e colaboradores (2006) propõem uma provável via de glicosilação para a biossíntese da cosmomicina D, baseada nos estudos de NMR de intermediários produzidos pelos mutantes dos genes $\Delta cosK$ e $\Delta cosG$. A enzima responsável pelo primeiro evento é a *CosG*, com a adição da L-rodosamina à aglicona β -rodomicinona (Figura 14). Isto poderia ocorrer em duas etapas, primeiro é adicionado açúcar na posição 7 e depois na posição 10 da aglicona; mas o interessante é que esta enzima poderia incorporar L-rodosamina em ambas posições, mas em diferentes etapas. Esta função é acrescentada pela proteína *CosT* que ajuda a posicionar o primeiro açúcar (L-rodosamina) na aglicona. Na segunda etapa, a enzima encarregada da adição de duas 2 desoxi-L-fucoses em uma ou duas etapas, é a *CosK*. Finalmente, no último evento se tem a adição das L-rodinoses, mas ainda não se conhece que enzimas são as responsáveis por esta função.

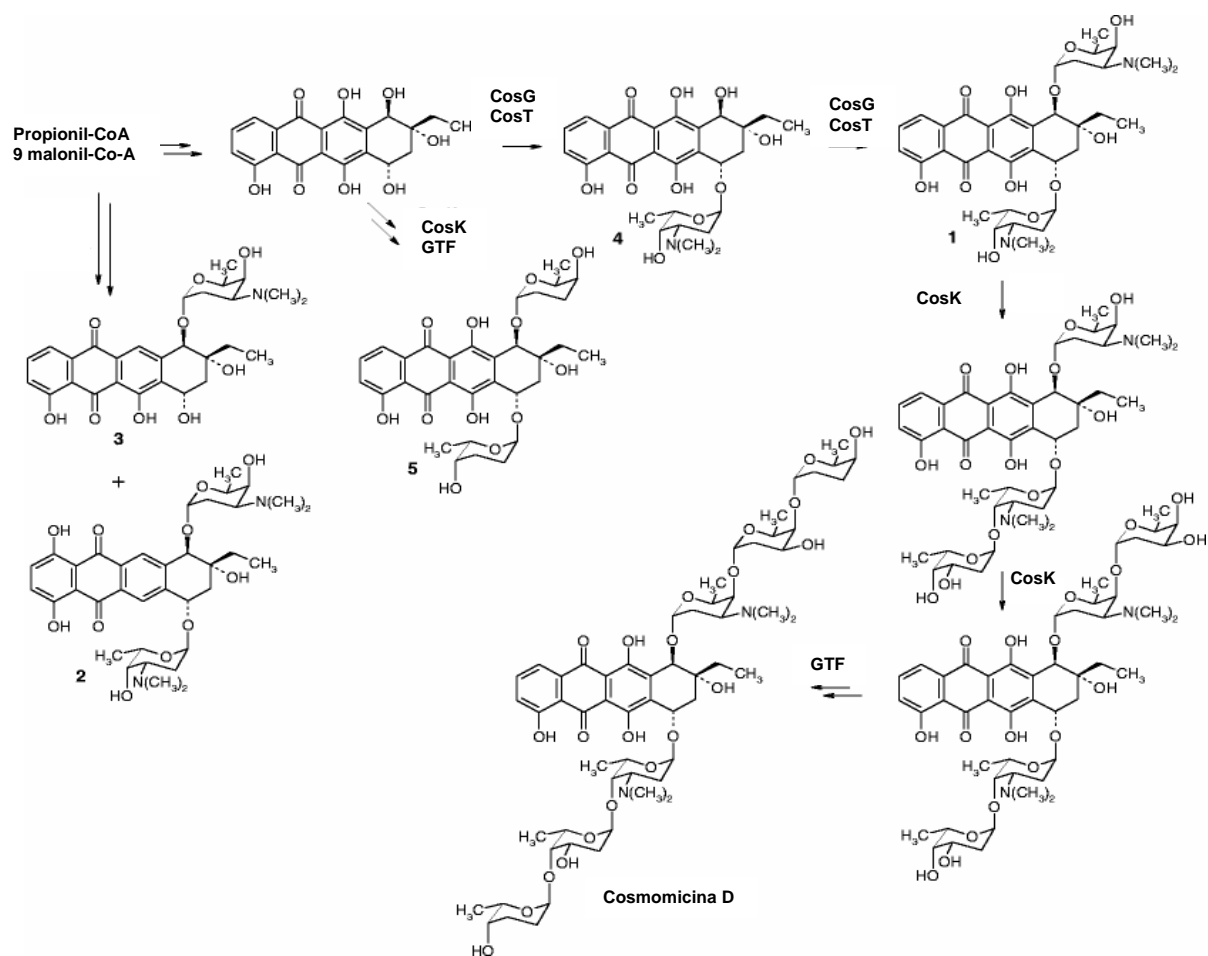


Figura 14: Possível via de glicosilação na biossíntese da cosmomicina D (Garrido *et al.*, 2006).

Outra característica importante das glicosiltransferases é que tem permitido utilizar a biossíntese combinatória para incorporar diferentes açúcares na aglicona ou glicosilar diferentes posições na aglicona (Mendez e Salas, 2001). Microrganismos produtores de compostos glicosilados podem ser usados como maquinarias celulares para produzir novos compostos que previamente eram inacessíveis ou difíceis de obter (Sanchez *et al.*, 2005).

2. OBJETIVO

Tomando em consideração a importância dos antibióticos antitumorais nos tratamentos quimioterápicos, e conhecendo que o gênero *Streptomyces* é o produtor da maioria dos compostos bioativos conhecidos farmacologicamente, estabeleceu-se como objetivo principal deste trabalho o estudo de genes da via biossintética da cosmomicina em *Streptomyces olindensis*.

Para atingir este objetivo estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- A análise transcricional de genes envolvidos na via biossintética de cosmomicina comparando a expressão de genes sob condições de produção ou não produção do antibiótico.
- Procurar possíveis novos genes de glicosiltransferases envolvidos na via biossintética da cosmomicina.
- Selecionar dois genes da via para fazer cassetes de interrupção visando à futura obtenção de mutantes nulos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Meios de cultura utilizados e condições padrão de cultivo:

Escherichia coli foi cultivada a 37° C por 16-20 horas em estufa ou em incubador a 150 RPM. O cultivo de *Streptomyces* foi feito a 28° C em estufa ou a 200 rpm em incubador, o tempo de cultivo variou segundo a finalidade do mesmo, e pode precisar uma etapa de pré-cultivo em meio TSB líquido para aumentar a massa celular por um período de 18-24 h. O tempo de cultivo de *Streptomyces* em meio líquido para a extração de DNA genômico é de 40 horas e para a produção de cosmomicinas entre 48 e 72 horas. Em meio sólido, os cultivos são geralmente de 5 a 7 dias.

4.1.1. Meios de Cultura

A. Meio : LB

Função: Crescimento bacteriano

Composição:

1% triptona

1% NaCl

0,5% de extrato de levedura

B. Meio : Yeme

Função: Ativação de esporos

Composição:

- 0,3% extrato de levedura
- 0,3% extrato de malte
- 0,5% peptona
- 1% glicose
- 34% sacarose (para *Streptomyces olindensis* 25%)

Após autoclavar adicionar: 2 ml de uma solução 2,5 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

Para a preparação de protopastos adicionar 25 ml/L de glicina 20%.

C. Meio : R5M

Função: Produção de antibiótico (modificado a partir do meio R5 Hopwood, 1985)

Composição:

- 10,00 g/l glicose
- 5,00 g/l extrato de levedura
- 0,10 g/l casaminoácidos
- 10,12 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 2ml solução de elementos traços (Hopwood, 1985)

Após autoclavar adicionar:

- 2,5ml solução 0,5% KH_2PO_4
- 1ml solução 5 M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

D. Meio : Meio A

Função: Meio de esporulação

Composição:

- MOPS 21 g/L ou TES 5,73 g/L
- Glicose 5g/L
- Extrato de Levedura 0,5 g/L
- Lab lemco ou Extrato de Carne 0,5 g/L
- Casaminoácidos 1 g/L

Acertar o pH para 7,2 com KOH

4.1.2. Soluções:

A. Solução de elementos traços do meio R5M:

- ZnCl₂: 40 mg/l
- FeCl₃ . 6H₂O: 200 mg/l
- CuCl₂ . 2H₂O: 10 mg/l
- MnCl₂ . 4H₂O 10 mg/l
- Na₂B₄O₇ . 10 H₂O: 10 mg/l
- (NH₄)Mo₇O₂₄ . 4H₂O: 10 mg/l

B. TE

- 10 mM Tris pH 7,5
- 1 mM EDTA pH 8,0

C. Solução de Desnaturação

- 0,5 M NaOH
- 1,5 M NaCl

D. Solução de Neutralização

- 1M Tris-Cl pH 7,5
- 1,5 M NaCl

4.2. Linhagens, vetores e oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

As linhagens bacterianas utilizadas neste estudo estão apresentadas na Tabela 3. Na Tabela 4 são apresentados os diferentes plasmídeos e cosmídeos utilizados neste trabalho. Oligonucleotídeos utilizados em reações de amplificação estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 3: Linhagens utilizadas no desenvolvimento das técnicas de clonagem e conjugação de *S. olindensis*.

Linhagens	Fonte ou Referência
<i>Streptomyces olindensis</i>	DAUFPE (*) 5622
<i>E. coli</i> ET12567/pUB307	Flett <i>et al.</i> , 1997
<i>E.coli</i> DH10B	InvitrogenBrasil Ltda

(*) DAUFPE - Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Tabela 4: Plasmídeos e cosmídeos utilizados para a clonagem e subclonagem em *E. coli* e *S. olindensis*.

Vetor	Resistência	Tipo de vetor	Fonte ou Referência
pBC SK	Cloranfenicol	Plasmídeo	Stratagene Inc.
PBS KS+	Ampicilina	Plasmídeo	Stratagene Inc.
P5E11	Ampicilina/Neomicina	Cosmídeo	Garrido, 2005
pEM4	Ampicilina/Tioestrepton	Plasmídeo	José Salas. Univ. de Oviedo
pHZ1358	Kanamicina/Tioestrepton	Plasmídeo	Sun, <i>et.al.</i> 2002.
pUO9090	Apramicina	Plasmídeo	José Salas Univ. de Oviedo
pBS5G	Ampicilina	Plasmídeo	Este trabalho
pBS5G-A	Ampicilina/Apramicina	Plasmídeo	Este trabalho
pBC~P	Cloranfenicol	Plasmídeo	Este trabalho
pEM4/S	Ampicilina/ Tioestrepton	Plasmídeo	Este trabalho
pEM4/Y	Ampicilina/ Tioestrepton	Plasmídeo	Este trabalho

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de glicosiltransferase, *cosS*, *cosY* e *apra* e para a confirmação das subclonagens.

Nome	Oligonucleotídeos
aclSF	5' TCA GCA GGG AGA CGA TGT 3'
aclSR	5' GTC ATC CAC CGA ACT CC 3'
apraF	5' GGT AAC TGA TGC CGT ATT TGC 3'
apraR	5' CGA TCA GAA CTT CTC GAC AGA CG 3'
apra65V	5' GCAAATACGGCATCAGTTACC 3'
apra1265 up	5' CGTCTGTGCGAGAAGTTCTGATCG 3'
ocdF	5'GTTTGCATACCCATCGTG 3'
ocdR	5'GTGCCCTAGAAGACGACTG 3'
acls1/F	5' ATC GCG TGG CGG ACA TCG TCT CCC TGC TGA 3'
acls1/R	5' TTC CGG CCG TTG ACG GGA GTT CGG TGG ATG 3'
gtr1	5' GCC GCC GTG GTG ARG TR 3'
gtr2	5' RTC RTC CAC CAC GGC GGC 3'
aknkF	5' CCG TGC AAC GAC CTC 3'
aknkR	5' GGA GGT AGG GGG GTA CG 3'
rhoG	5' ATC ACC AGG GGA GGA GCC A 3'
rhoG	5' CAC CAG GAT TTC ACG GTT C 3'
dnaJF	5' TCC CAG GAC GAG ATC AAG AAG 3'
dnaJR	5' CGT CCA TGA TGT CGG AGA AGT 3'
hsp18F	5' ATG CTG ATG CGC ACT GAC CCC C 3'
hsp18R	5' GTC GGC GAG GAC GAG CTG CC 3'

4.3. Inserção de DNA em *E. coli* por transformação

Foram empregados dois métodos para inserção: 1) Choque térmico de células competentes obtidas por tratamento com cloreto de cálcio (CaCl_2) e 2) eletroporação (Sambrook *et al.*, 1988). As condições de eletroporação utilizadas foram: cubetas de 0,2 cm (BioRad Inc.), um eletroporador BIORAD Gene Pulser com Pulse Control de 12500V/cm, resistência paralela de 200 Ω e capacitância de 25 μF . A seleção dos transformantes foi realizada através da marca de resistência correspondente aos vetores empregados: pBS SK+ (ampicilina), pBC SK (cloranfenicol), pHZ1358 (apramicina) e pEM4 (ampicilina). Outra forma utilizada para selecionar os possíveis transformantes foi pela adição de 40 $\mu\text{g/ml}$ de IPTG (isopropil tio β -D-galactósido) e 40 $\mu\text{g/ml}$ de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-

galactopiranosídeo) nas placas de meio de cultura. Desta forma, foi possível eliminar transformantes que só possuíam o vetor sem inserto.

4.4. Imobilização do DNA de colônias em membrana de nylon para “colony-blot”

As colônias crescidas no meio LB com o antibiótico de resistência foram repicadas para membranas acondicionadas em placas sobre meio LB com 100 µg/ml de ampicilina, incubou-se por um período entre 20 e 24 horas a 37° C e em seguida as membranas foram tratadas segundo o método descrito por Sambrooke colaboradores (1988), com o objetivo de lisar as células e posteriormente fixar o DNA à membrana. Após a retirada das membranas do forno a 80°C foi adicionado um passo final que é a limpeza das mesmas com um algodão embebido em TE. Desta maneira, retiram-se os restos celulares de *E. coli*, enquanto que, o DNA permanece aderido à membrana, pois já havia sido fixado anteriormente. Para a hibridização por “colony-blot” foi empregado o kit DIG-DNA Hibridization (RocheBrasil), conforme as especificações do produtor.

4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas pelo método de reação da cadeia da polimerase (PCR), empregando dNTPs (Sinapse Biotecnologia), o cloreto de magnésio (MgCl₂) correspondente à enzima utilizada e várias enzimas de polimerização como *Taq* DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia), *Pfu* DNA Polimerase (Biotools B&M Labs. S.A.), Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen Brasil Ltda), Long PCR (Sinapse Biotecnologia) e High Fidelity PCR (Invitrogen Brasil Ltda) dependendo do produto esperado.

As PCR realizadas tiveram como amostras o DNA plasmidial ou bactérias crescidas 16 -18°C em meio LB (10⁸ cél/ml) e lisadas a 96°C por 12 minutos.

As concentrações de amplificação se encontram descritos na Tabela 6 e as reações de PCR realizadas foram feitas dependendo da enzima e dos oligonucleotídeos utilizados (Tabela 5).

Tabela 6: Concentrações dos reagentes utilizados para amplificação por PCR utilizando DNA plasmidial ou bactérias lisadas.

Reagente	Concentração inicial	Concentração final
DNA		1-10 ng
dNTPs*	10mM	0.2 mM
Iniciador senso	20 mM	0.6 mM
Iniciador antisenso	20 mM	0.6 mM
Buffer	10X	1X
Enzima		1U

dNTPs* : desoxinucleotídeos

As reações de PCR com as enzimas *Taq* DNA polimerase, Platinum *Taq* DNA polimerase, *Pfu* DNA polimerase e Long PCR utilizam como cofator $MgCl_2$ (concentração final 1,5 mM) e a enzima High Fidelity utiliza $MgSO_4$ (concentração final 2 mM). Outro co-solvente utilizado com algumas das enzimas (High Fidelity, *Pfu* DNA polimerase e Long PCR) é o dimetil sulfóxido (DMSO).

Tabela 7: Parâmetros utilizados para amplificar fragmentos de DNA com as enzimas: **A.** *Taq* DNA polimerase. **B.** *Pfu* DNA polimerase, Platinum *Taq* DNA Polimerase, High Fidelity PCR. **C.** Long PCR e respectivamente.

A.-

Enzima	Iniciador	Desnaturaçãoinicial	Desnaturaçãocíclica	Anelamento	Extensão	Extensão Final
Taq DNA polimerase	acISF e acISR	96°C 2'30''	96°C 45'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 5'
	apraF e apraR	96°C 2'30''	96°C 45	47°C 1'	72°C 1'30''	72°C 5'
	acISF e apra65V	96°C 2'30''	96°C 45	47°C 1'	72°C 1'30''	72°C 5'
	acISR e apra1265 up	96°C 2'30''	96°C 45	47°C 1'	72°C 1'30''	72°C 5'
	gtr1 e gtr2	96°C 2'30''	96°C 45	55°C 1'	72°C 1'30''	72°C 5'

B.-

Enzima	Iniciador	Desnaturação Inicial	Desnaturação cíclica	Anelamento	Extensão	Extensão Final
Platinum Taq DNA polimerase	acls 1/F e acls 1/R	94°C 2'	94°C 30''	50°C 30''	72°C 7' 30''	72°C 5'
High Fidelity	aclS 1/F e acls 1/R	94°C 2'	94°C 30''	50°C 30''	68°C 7' 30''	68°C 5'
<i>Pfu</i> DNA polimerase	ocdF e ocdR	96°C 2'	96°C 1'	55°C 1'	72°C 3'	72°C 5'

C.-

	Programa	Temperatura e tempo	Ciclos
	Desnaturação Inicial	94°C 4'	1
	Desnaturação cíclica	94°C 20''	10
	Anelamento	75°C 30''	
Long PCR	Extensão	68°C 6'	
	Desnaturação cíclica	94°C 20''	19
	Anelamento	65°C 30''	
	Extensão	68°C 9'	
	Extensão Final	68°C 10'	1

Para amplificar o fragmento de aproximadamente 6,8 Kb do plasmídeo pBS5G com os oligonucleotídeos acls1/F e acls1/R, foram feitas várias tentativas com diversas enzimas como Platinum *Taq* DNA Polimerase (Tabela 6B), Long PCR (Tabela 6C) e High Fidelity PCR (Tabela 6B).

4.6. Seqüenciamento de DNA

As reações de seqüenciamento do DNA foram feitas pelo método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos terminais (Sanger *et al.*, 1997) empregando o kit para seqüenciamento DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems da Amershan Biosciences – GE Health care, quando utilizado o seqüenciador automático da mesma empresa (MegaBACE).

Nas reações de seqüenciamento utilizando o sistema da Applied Biosystems, foi adicionado 5% do volume da reação de DMSO - dimetil sufóxido (Merck). O ciclo de seqüenciamento utilizado para o sistema ABI prism foi:

- passo 1 : 96°C - 15 segundos;
- passo 2 : 60°C – 20 segundos;

- passo 3 : 60°C – 4 minutos;
- passo 4 : repetir 40 vezes.

No caso do sistema MegaBACE o ciclo de seqüenciamento foi:

- passo 1 : 95°C - 30 segundos;
- passo 2 : 60°C – 1 minutos;
- passo 4 : repetir 25 vezes.

As seqüências foram analisadas no programa Bioedit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html). Após a análise da qualidade das bases, o arquivo FASTA gerado foi comparado com seqüências da base de dados Gen Bank (National Center for Biotechnology Information – (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), utilizando BlastX (Altschul,1990), que traduz a seqüência de nucleotídeos em seqüência de aminoácidos nas 6 possíveis fases de leitura e realiza uma comparação das seqüências traduzidas com uma base não-redundante de seqüências de proteínas.

4.7. Conjugação bacteriana *E.coli* - *Streptomyces*

O plasmídeo conjugativo escolhido foi inserido por choque térmico ou por eletroporação na cepa conjugativa de *E. coli* ET12567/pUB307 (bactéria doadora), defectiva em metilação do DNA. Os transformantes foram selecionados em meio LB com o antibiótico apramicina. Cada colônia isolada foi inoculada em meio LB líquido com canamicina (25 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml) e apramicina (25 µg/ml) durante um período de incubação de 18 horas a 37°C de temperatura. É importante ressaltar que a apramicina é o antibiótico de seleção do plasmídeo que se deseja introduzir em *Streptomyces* (bactéria receptora). O crescimento bacteriano foi avaliado por densidade ótica numa absorbância de 600 nm de 0,3 - 0,4 (Flett *et al.*, 1997). As células foram lavadas (1 minuto x 10000g) duas vezes com meio LB para retirada dos antibióticos e ressuspensas num volume final de 100µl de meio LB. A suspensão de esporos 1x10⁸ esporos/mL (preparadas segundo Kieser *et al.*, 2000) também foi lavada para retirar o glicerol e ressuspensas em 100 µl de meio LB. Os esporos foram germinados a 50°C por 10 minutos e misturados com as células de *E.coli* ET12567/pUB307. A mistura foi homogeneizada e semeada em meio A ou em

meio R5M, dividindo a mistura em duas placas, para fazer uma melhor distribuição da mistura de conjugação e evitar que exista uma competição entre os possíveis conjugantes. Após 24 horas de incubação a 28°-30°C, foi feito um “flooding” que consiste na adição de água (2 ml) contendo 0,5 mg de ácido nalidíxico (para evitar a contaminação de bactérias Gram negativas) e 1 mg de apramicina (para selecionar os possíveis conjugantes de *Streptomyces*).

4.8. Preservação de linhagens

A forma de preservação de *Streptomyces* foi através de suspensão de esporos em glicerol 20% congelada a -20° C. Para se obter os esporos do microrganismo, o mesmo é cultivado em meio A sólido por 6-10 dias, até que a esporulação esteja completa. Posteriormente, os esporos são retirados com o auxílio de lâminas de bisturi e transferidos para tubo contendo o glicerol 20% estéril, em seguida homogeneiza-se a mistura e congela-se.

Para preservar-se a cepa de *E. coli* adiciona-se 40 µl de glicerol a 10% a 160 µl de uma cultura fresca e congela-se a mistura homogeneizada a -20° C.

4.9. Extração de antraciclinas do meio de cultivo

Para os estudos de cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria de massa foi produzido antibiótico em pequena e média escala. Com este objetivo, foi feita a ativação de esporos em 5 ml de meio R5M por 24h. Com este material, foi feito um pré-inóculo em 50 ml de meio R5M e 10% do pré-inóculo, durante 48 horas e transferido para um erlenmeyer de 2L com 500 ml de meio e 10% do pré-inóculo durante 72 horas.

As culturas de *S. olindensis* foram centrifugadas e o sobrenadante foi aplicado a uma coluna de extração em fase sólida (Sep-pak Vac C-18, 10g, Waters Corporation). As colunas foram eluídas usando um gradiente linear de 10 a 100% de acetonitrilo, durante 30 minutos e fluxo de 5 ml por minuto, e as amostras foram analisadas por HPLC. As frações que continham antraciclinas foram secas a vácuo e ressuspensas em um volume pequeno em metanol, em seguida foram purificados

em corrida semipreparativa de HPLC com coluna Xterra RP18 (Waters Corporation) em uma fase móvel de 100% acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoracético.

4.10. Teste de atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*

Este teste foi padronizado utilizando-se placas de Petri 15x15 cm, com capacidade para 25 ml de meio de cultura. Em cada placa foi semeado 1×10^5 células de *Bacillus subtilis* 1012.

Os sobrenadantes coletados nas diferentes horas (0h, 10h, 12h, 14h, 16h, 18h, 20h, 24h, 36h) do experimento da Figura 16, foram inoculados (20 μ l) em papel de filtro estéril, distribuídos na placa de Petri e avaliados após 24 horas, medindo-se o diâmetro do halo (cm).

4.11. Determinação de glicose

A glicose foi quantificada com o aparelho Accu-Chek Active, aparelho para a determinação da glicemia e sistema de punção.

4.12. Análises da biossíntese de cosmomicina

4.12.1. Condições de cultura na produção de cosmomicina

Para estudar a resposta transcricional dos genes envolvidos na biossíntese de cosmomicina, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, foi realizada a ativação de esporos de *Streptomyces olindenses* em uma concentração de 1×10^6 em 5 ml de meio R5M (Item 4.9). Após o período de pré-inóculo, foram inoculadas duas culturas contendo 50 ml de meio R5M com 10% do inóculo, dispensados em frascos “erlenmeyer” de 250 ml, e uma das culturas foi suplementada com sais e elementos traços (Item 4.1.1). As culturas foram incubadas a 28°C sob agitação de 180 rpm. Ao final de 72 horas de incubação, foram coletadas duas amostras da segunda cultura para a obtenção da massa micelial (Figura 15). Uma das amostras foi utilizada para a obtenção de RNA totais e a outra para a extração do antibiótico intracelular. O meio de cultura também foi coletado para a extração do antibiótico extracelular.

No segundo experimento, após ser feita a ativação dos esporos e o pré-inóculo para aumentar a massa micelial foram coletadas amostras a 0h, 10h, 12h, 14h, 16h, 18h, 20h, 24h e 36h (Figura 16). Em cada um destes pontos foi analisado o teor de glicose (mg/dl), descrito no Item 4.11, a atividade antibiótica (Item 4.10) e a expressão gênica utilizando a técnica da transcrição reversa (RT-PCR) (Item 4.12.2).

4.12.2. Extração de RNA e análises da Expressão Gênica por RT-PCR

A extração de RNA total de *S. olindensis* das culturas realizadas no experimento foi realizada através da maceração das amostras de micélio em almofariz com pistilo, sob nitrogênio líquido, seguida de suspensão do macerado no reagente TRIzol® (Invitrogen™ Life Technologies), numa proporção de 1,0 mL de reagente para uma faixa de 0,25 a 0,40 mL de macerado. Seguiu-se então o protocolo original do reagente, ao final do qual o RNA total extraído foi dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e quantificado por espectrofotometria a 260 nm. As sínteses de cDNAs a partir do RNA de amostras de *S. olindensis* coletadas no experimento, foram realizados com uma concentração de 2 µg de cada RNA e utilizando o kit “SuperScript™ Plus Indirect cDNA Labeling System” (Invitrogen™ Life Technologies).

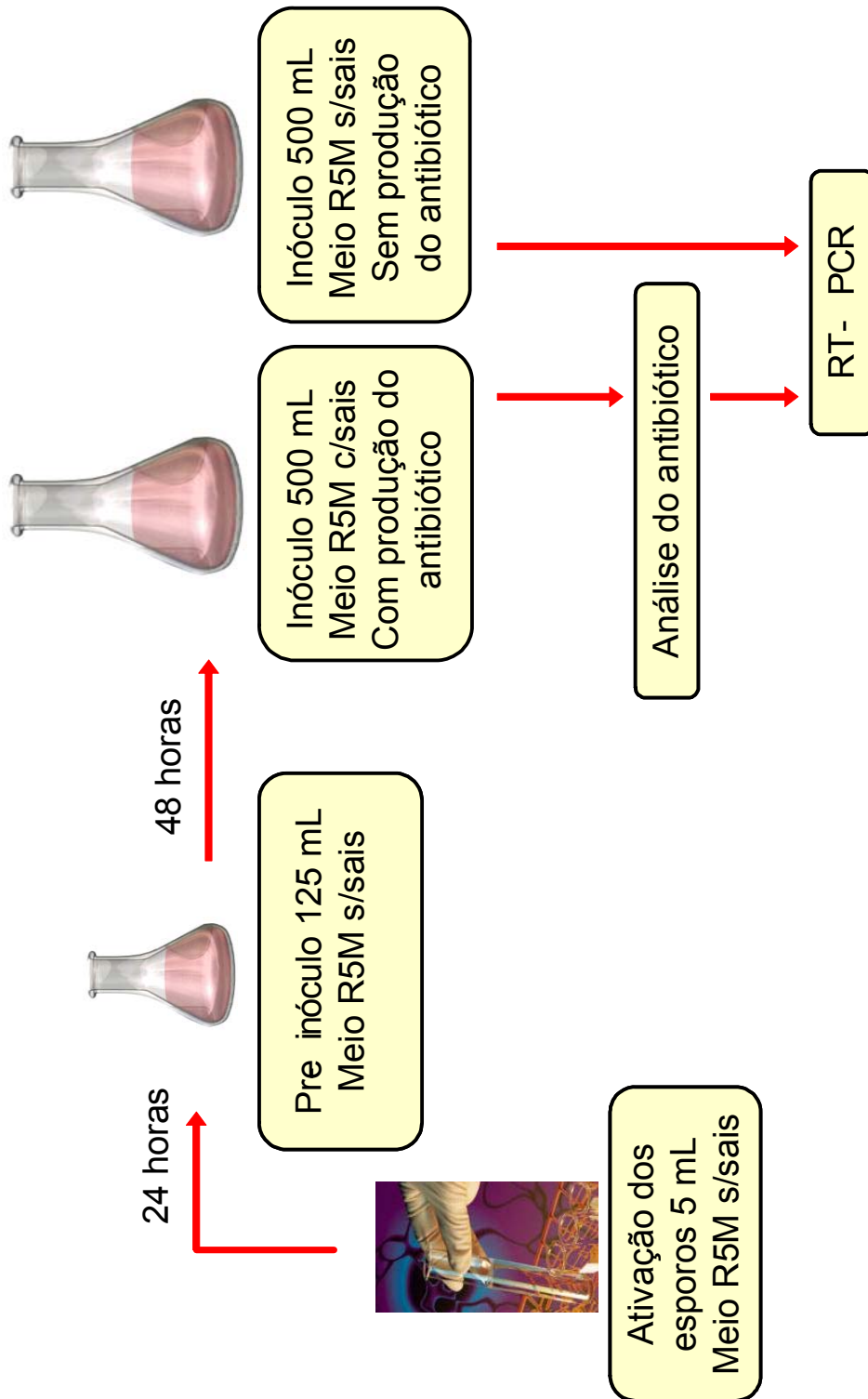


Figura 15. Procedimento do crescimento micelial da cepa selvagem de *S. olindensis*. A comparação da expressão gênica na via biossintética da cosmomicina foi realizada em culturas com e sem produção do antibiótico.

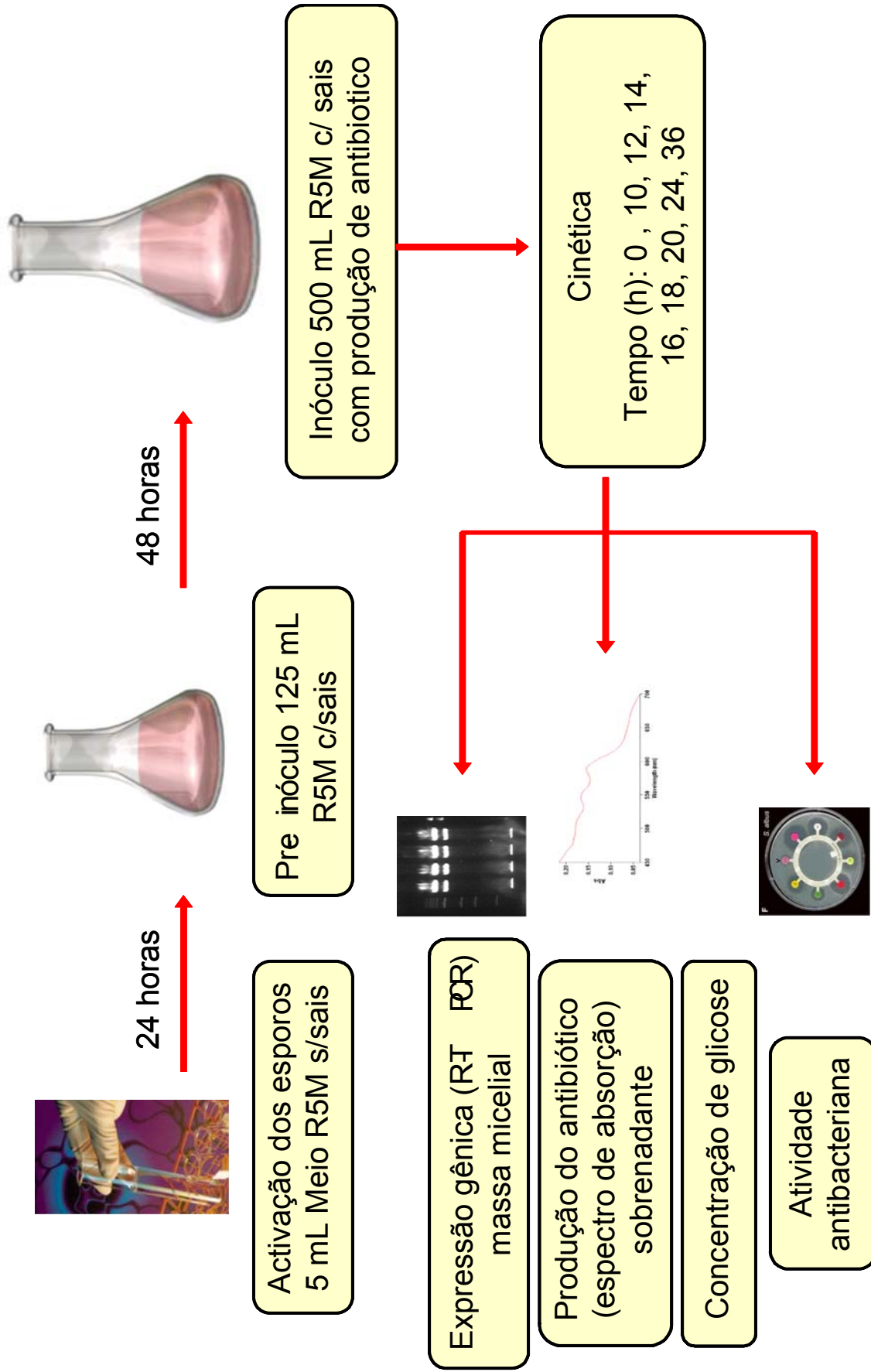


Figura 16. Procedimento do crescimento micelial da cepa selvagem de *S. olindensis*. Para realizar a cinética transcricional durante a produção do antibiótico foram avaliados a expressão gênica, o de espectro de absorção, a concentração de glicose e a atividade antimicrobiana nos tempos 0, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, e 36 horas com os genes *cosS*, *cosY*, *cosK*, *cosG*, *cosK*, *hsp18*, *dnaJ* e *ks*.

Para a realização da segunda fita de cDNA e análise da expressão gênica foram realizadas amplificações por PCR com distintos números de ciclos (20, 25, 35, 40) e desenhados oligonucleotídeos específicos para os genes *cosS*, *cosY*, *cosK*, *cosG*, *dnaJ* e *hsp18*. As condições na reação da PCR empregadas foram as seguintes: cDNAs diluídos em 1:10 (Tabela 7).

4.12.3. Extração e análise da cosmomicina

Para os estudos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e da espectrometria de massa foi utilizado o meio de cultura e a massa micelial obtida no experimento já descrito.

As culturas de *S. olindensis* foram centrifugadas e aplicadas entre 2-5 ml do sobrenadante a uma coluna de extração em fase sólida (Sep-pak Vac C-18, 50mg, Waters Corporation) para purificar o antibiótico, e posteriormente foi eluído com 1mL de metanol.

As amostras purificadas foram analisadas por HPLC utilizando colunas C18 (Waters Corporation), usando um gradiente linear de 10 a 100% de acetonitrilo, durante 30 minutos e fluxo de 5 ml por minuto.

5. RESULTADOS

O presente trabalho está dividido em duas partes. A primeira foi a análise da expressão gênica do antibiótico cosmomicina, mediante a técnica da transcrição reversa (RT-PCR). Analisou-se vários genes envolvidos com a via biossintética do antibiótico (*cosS*, *cosY*, *cosK* e *cosG*) e dois genes controle que são ativados em condições de estresse (*dnaJ* e *18hsp*). Para confirmar as características químicas e peso molecular da cosmomicina, realizou-se uma análise do antibiótico utilizando espectro de absorção e HPLC com espectrometria de massa. Estes resultados foram utilizados para fazer os experimentos de transcritase reversa.

Na segunda parte do trabalho (Apêndice), foram escolhidos os genes *cosS* e *cosY* da via biossintética para serem inativados. Com este intuito escolheu-se um fragmento da DNA do cosmídeo p5E11, que contém o loci genômico dos respectivos genes, tentando-se manter aproximadamente 1 Kb da região a montante e 1 Kb da região à jusante dos genes em estudo para facilitar a troca alélica. Este fragmento foi subclonado nos vetores pBSKS e pBCKS, respectivamente.

A estratégia utilizada para a obtenção do nocaute foi por interrupção gênica, usando o cassete de resistência ao antibiótico apramicina inserido em sítios únicos internos aos genes *cosY* (*Bsu36I*) e *cosS* (*PvuI*). Os esquemas apresentam os procedimentos realizados para interrupção do gene *cosS* e *cosY* (Figuras 16 e 27).

Visando ao desenvolvimento desta etapa do trabalho foram utilizadas as seguintes metodologias:

1. Análise através do programa BLAST.
2. Subclonagem do locus genômico e construção do cassete de interrupção.
3. Construção do plasmídeo conjugativo.
4. Conjugação.
5. Construção do plasmídeo de expressão pEM4 com o gene *cosS* e *cosY*.

Finalmente, realizou-se uma triagem de novos genes de glicosiltransferase (Apêndice). A estratégia utilizada foi o desenho de oligonucleotídeos degenerados utilizados para amplificar prováveis ORFs que estejam envolvidas na adição de açúcares na aglicona. Os produtos amplificados foram purificados, seqüenciados e analisados por bioinformática.

5.1. Expressão gênica de genes da via biossintética da cosmomicina.

Com o intuito lógico de verificar se os genes envolvidos na biossíntese da cosmomicina são expressos quando o microorganismo estivesse produzindo o antibiótico, foram realizadas análises da expressão gênica de genes associados a via biossintética da cosmomicina, entre estes foram avaliados genes com função conhecida como *cosG* e *cosK*, assim como genes com função ainda não determinadas, como *cosS* e *cosY*. Com este intuito foram preparados RNAs e sintetizados os correspondentes cDNAs de *S. olindensis* em culturas com produção de cosmomicina e em ausência dela. A expressão destes genes foi determinada por RT-PCR, denotando que os genes associados à via biossintética encontravam-se induzidos na condição de produção de antibiótico. De igual maneira, foram desenhados iniciadores específicos para os genes de *Streptomyces*: *hsp18* (proteína de choque térmico da família de 18 kDa) e *dnaJ* (ATPase envolvida no enovelamento protéico) para verificar se aqui também apresentavam sua expressão induzida, verificando-se que também eram condições que proporcionam a biossíntese do antibiótico.

Outras das diferenças utilizadas entre ambos experimentos foi a presença de sais (Item 4.1.2.A) no meio de cultura R5M (Item 4.1.1.C). Neste caso, observa-se a produção do antibiótico e na falta dos sais observa-se que não há produção do antibiótico.

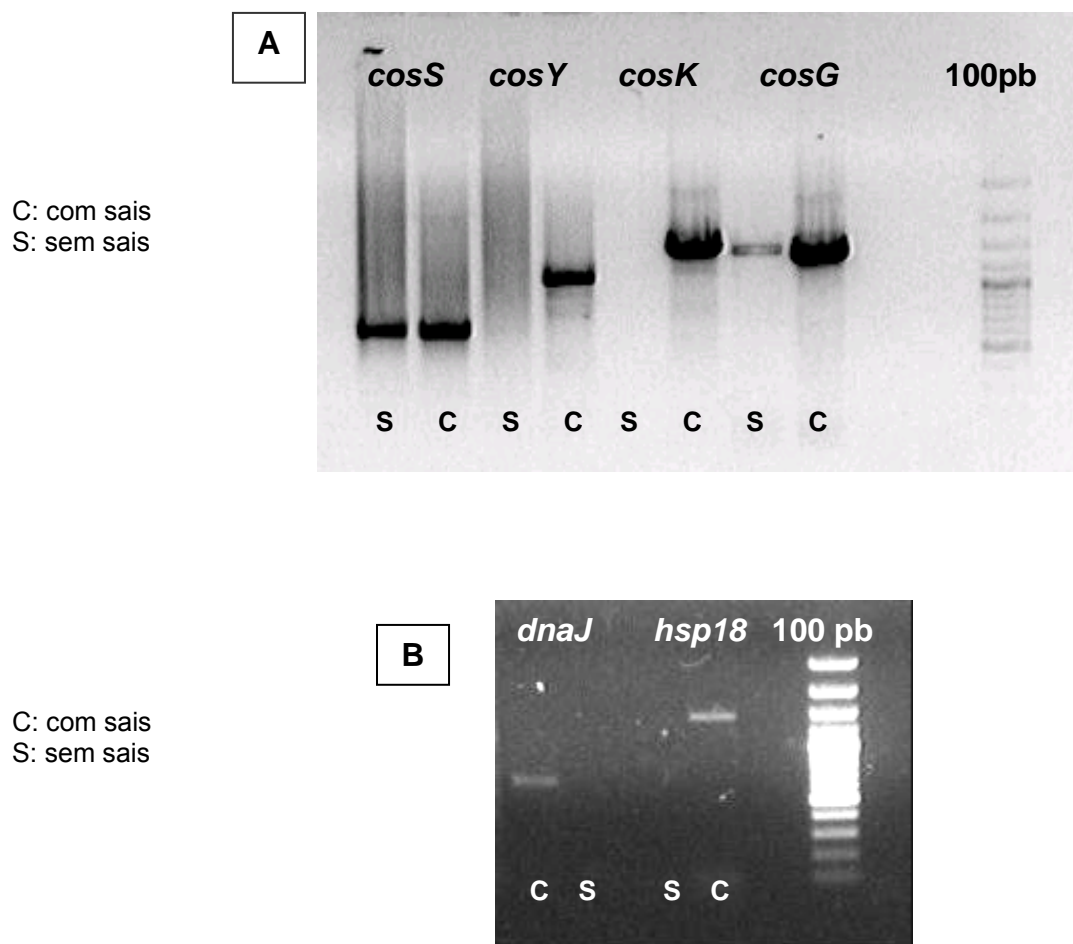


Figura 17. Análise transcricional dos genes sob condições de cultivo que deteminam a presença ou ausência do antibiótico cosmomicina. **A.** Genes envolvidos na via biossintética da cosmomicina: *cosS*, *cosY*, *cosK* e *cosG*. **B.** Genes presentes em estresse fisiológico: *dnaJ* e *hsp18*.

5.2. Análise do antibiótico Cosmomicina

5.2.1. Espectro de Absorção

Para padronização da técnica de extração da cosmomicina a partir do extrato micelial e do sobrenadante utilizou-se o solvente orgânico metanol.

Os perfis de absorção dos extratos metanólicos da cepa selvagem de *S. olindensis* foram lidos na faixa de 400 a 650 nm e mostraram o mesmo padrão de absorção que o apresentado por Furlan (1997). O resultado deste ensaio deve ressaltar que a faixa de absorção mais característica da cosmomicina está entre 550 e 650 nm.

Também foi observado através do espectro de absorção que é possível obter o antibiótico tanto da massa celular (antibiótico intracelular) como do excretado no meio de cultura (antibiótico extracelular). Os resultados das comparações dos produtos obtidos das duas extrações do antibiótico não mostraram diferenças nos perfis de absorção entre antibióticos intracelular e extracelular (Figura 18).

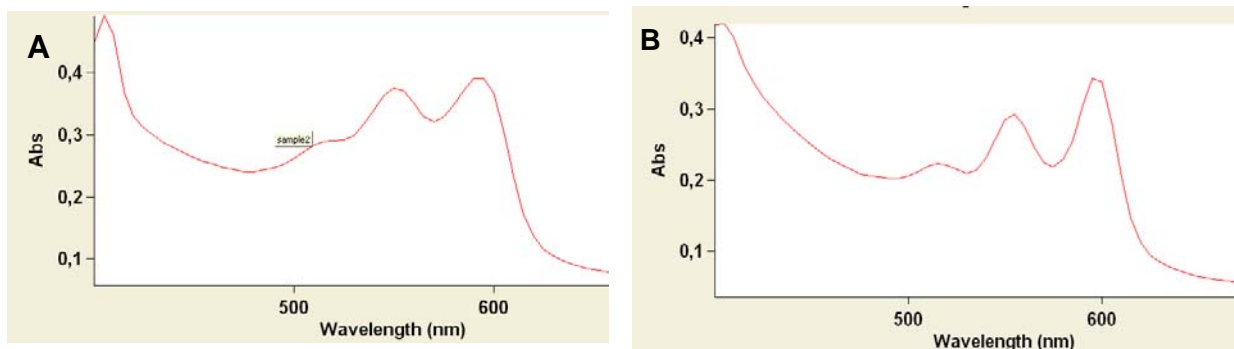


Figura 18. Espectro de absorção da cosmomicina na faixa de 400-650nm. **A.** Antibiótico intracelular. **B.** Antibiótico extracelular.

5.2.2. HPLC e espectrometria de massa

O ensaio de produção em meio líquido foi feito em duplicata e das análises na HPLC verificou-se a presença de todos os picos característicos de cosmomicina (Figura 19A), na mesma faixa do tempo de retenção entre 12 e 16 minutos obtida em trabalhos preliminares (Comunicação pessoal, Garrido, 2005). Nas análises de espectrometria de massa (Figura 19B), observa-se também o pico correspondente à massa da cosmomicina.

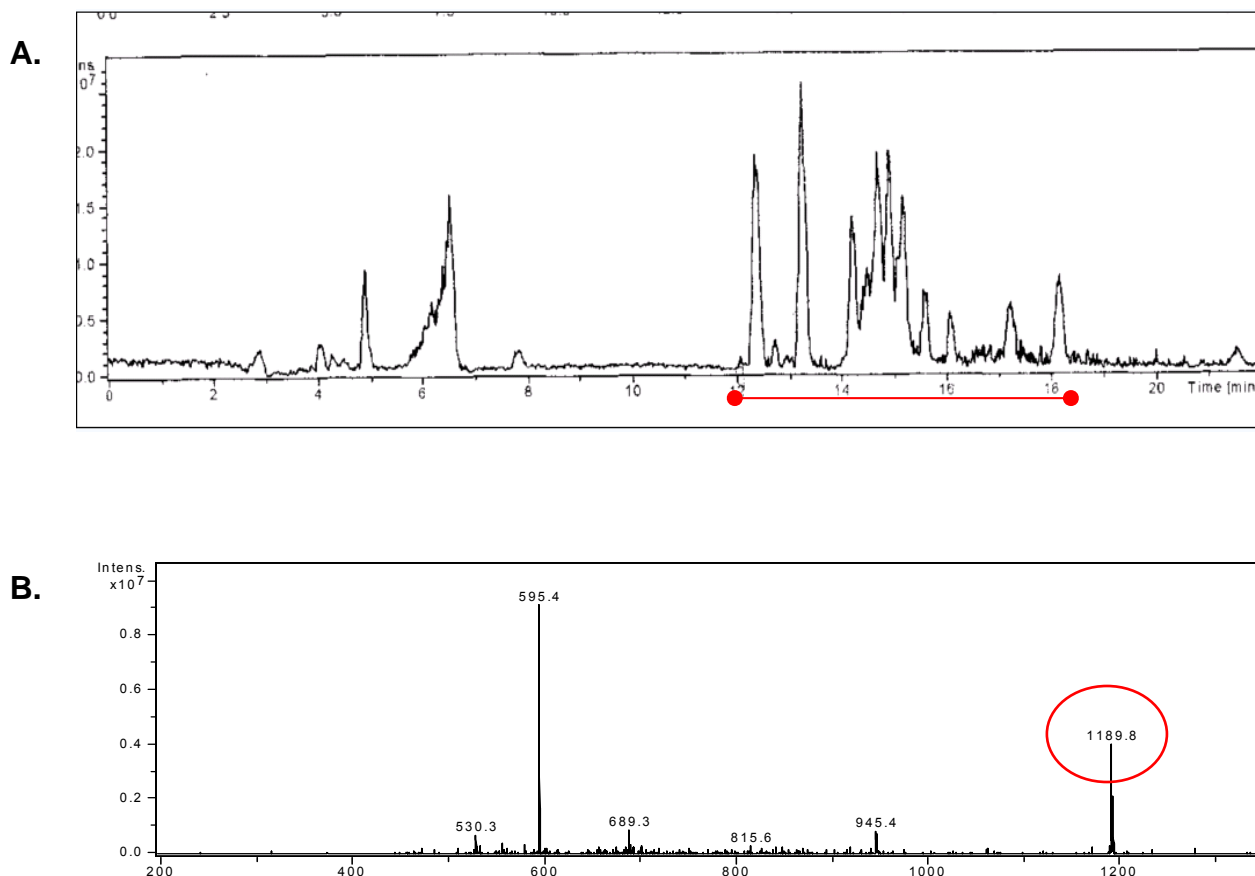


Figura 19: Análise do antibiótico Cosmomicina. **A.** Corrida de HPLC do extrato de cultivo líquido de *S.olindensis* em meio R5M. **B.** Espectrometria de massa do pico referente a Cosmomicina D produzidos pela *Streptomyces olindensis*.

5.2.3. Análise transcricional de genes durante a ativação da via biossintética de Cosmomicina D.

Após observar que os genes da via biossintética da cosmomicina escolhidos para este estudo foram induzidos na presença do antibiótico, decidiu-se realizar um outro experimento para avaliar o comportamento destes genes na produção do antibiótico através de uma cinética de expressão.

O experimento foi realizado de uma cultura de *S. olindensis* em meio R5M suplementado com sais e elementos traços. Durante o experimento, foram coletadas amostras as: 0, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 e 36 horas após o início da cultura. Posteriormente, às amostras foram centrifugadas e filtradas para o armazenamento da massa micelial para as análises de expressão gênica através da técnica de

transcrição reversa (RT-PCR) e do sobrenadante para as análises da concentração de glicose, atividade antimicrobiana e o espectro de absorção.

Quando analisados os sobrenadantes das diferentes amostras coletadas nos 9 pontos (0, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 e 36 horas) observou-se que existe uma relação inversa entre a atividade biológica e a concentração de glicose, pois conforme diminui a concentração de glicose o diâmetro do halo de inibição aumenta (Figura 20). Na análise do espectro de absorbância dos extratos das amostras coletadas, observou-se a presença dos picos característicos da cosmomicina somente 36 horas após o início do experimento (Figura 21). Com relação à atividade antibacteriana, todas as amostras foram confrontadas à bactéria *Bacillus subtilis*. Os resultados mostraram o primeiro halo de inibição a partir das 24 horas da cultura, e como esperado, às 36 horas observou-se um maior halo de inibição (Figura 22).

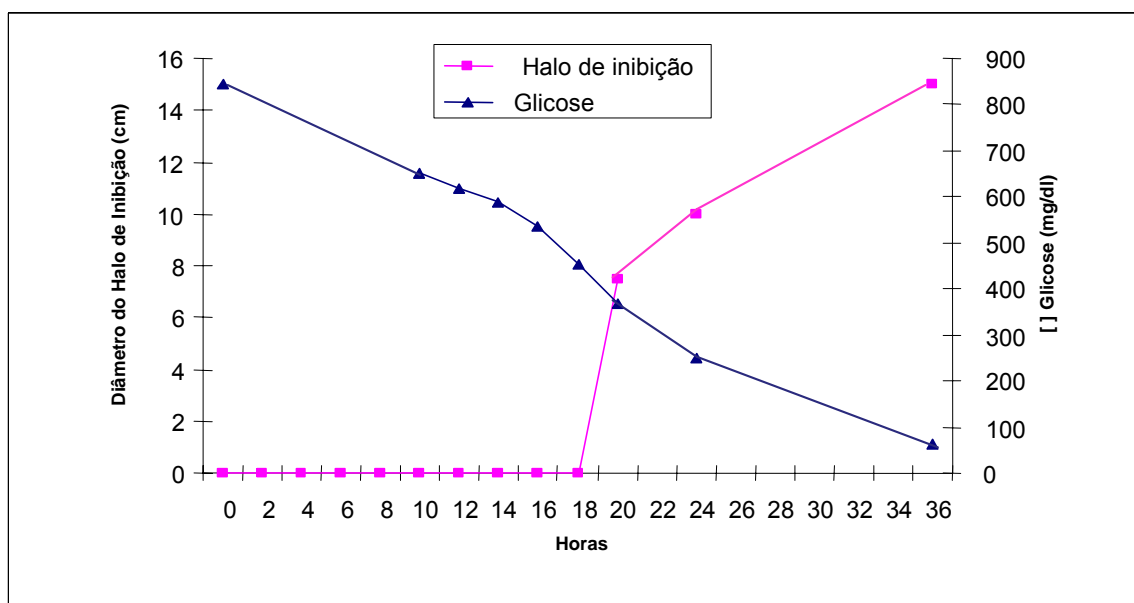


Figura 20. Cinética de crescimento da cepa selvagem de *S. olindensis* durante a produção do antibiótico cosmomicina no meio R5M. Mostrando-se o consumo de glicose e a atividade biológica durante um período de 36 horas.

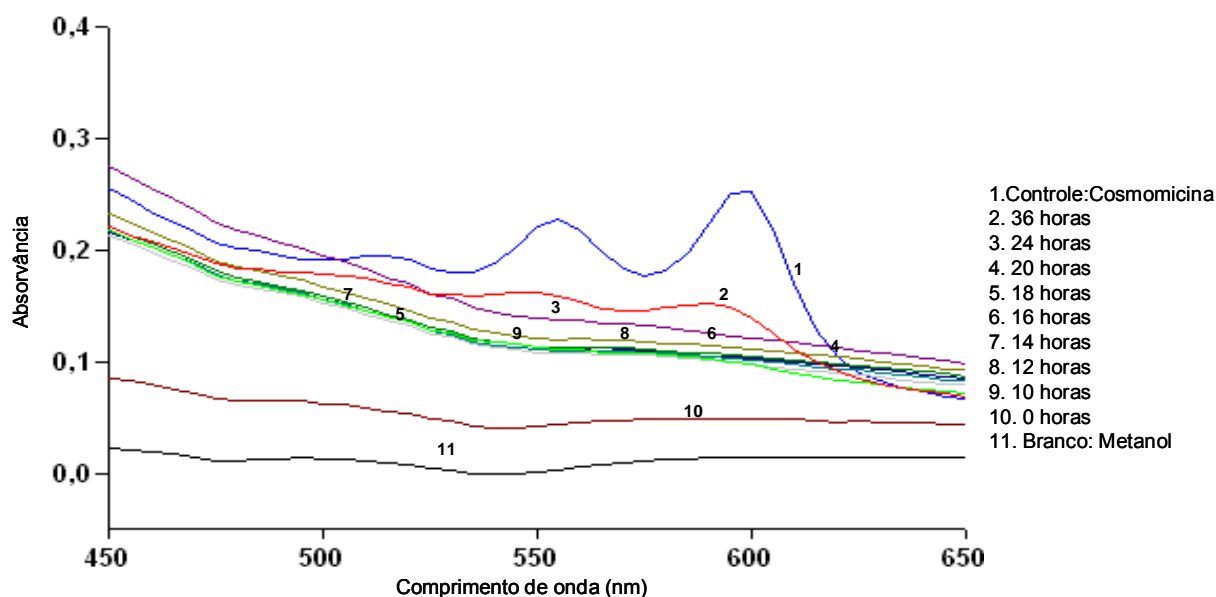
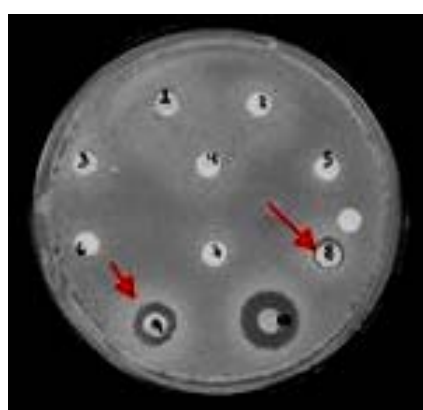


Figura 21. Espectro de absorção do antibiótico cosmomicina na faixa de 450-650nm, das diferentes alíquotas (0, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 e 36 horas) da cinética de produção do antibiótico.



1. 0h
2. 10h
3. 12h
4. 14h
5. 16h
6. 18h
7. 20h
8. 24h
9. 36h
10. Controle

Figura 22. Análise da atividade biológica do antibiótico cosmomicina. As amostras (0, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 e 36 horas) da cinética de produção do antibiótico que foi confrontado à bactéria *Bacillus subtilis*. A atividade biológica foi avaliada pela presença do halo de inibição.

Os resultados da cinética de expressão durante a produção do antibiótico cosmomicina mostraram que os genes *cosS*, *cosY*, *cosG*, *cosK* e *KS* estão sendo induzidos com relação ao tempo da cultura na produção do antibiótico. Cabe ressaltar que o gene *cosY* encontra-se induzido após 12 horas do início da cultura, e o gene *cosK* aparece só após 20 horas. De igual maneira, os genes de resposta a

estresse como *dnaJ* e *hsp18*, também estão sendo induzidos durante a produção do antibiótico e que a expressão destes apresenta-se após 10 horas do início da cultura. Apresentando uma maior indução da expressão do gene *dnaJ* com relação ao gene *hsp18* (Figura 23).

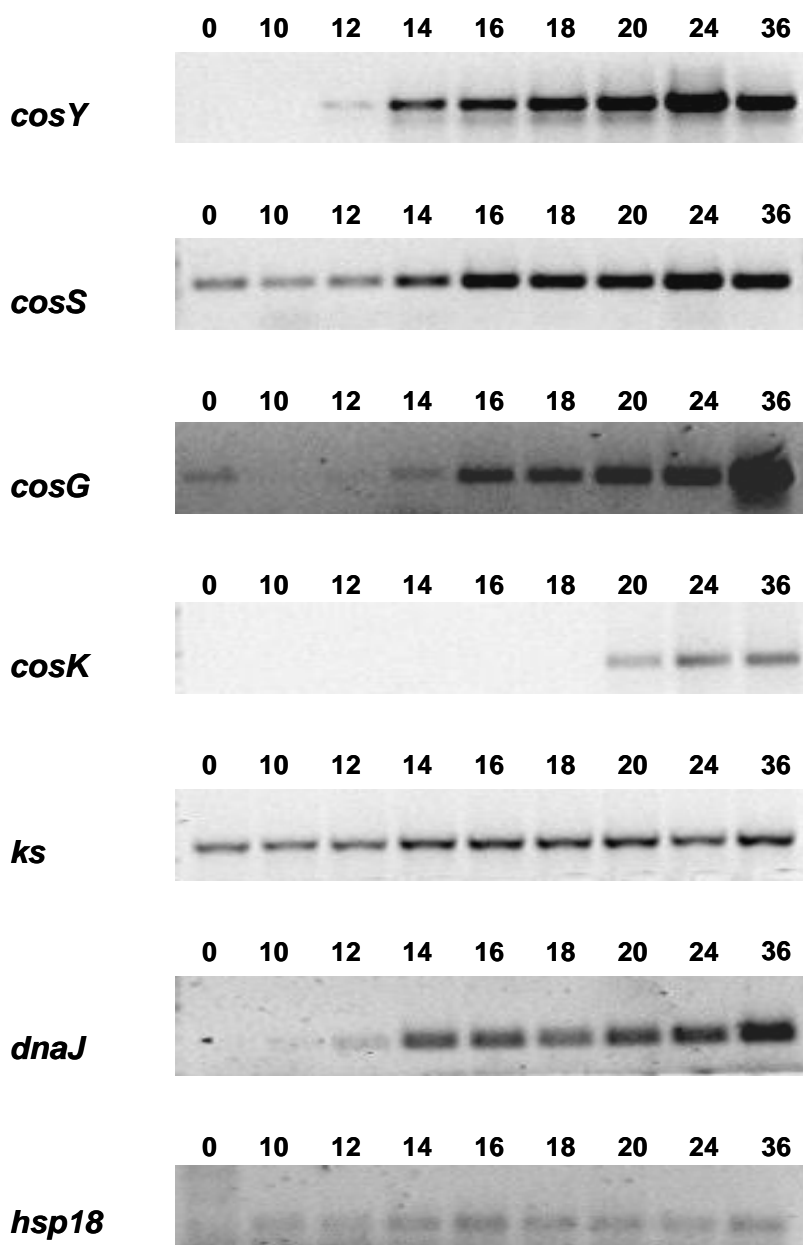


Figura 23. Cinética de expressão dos de genes *cosS*, *cosY*, *cosK*, *cosG*, *ks*, *hsp18* e *dnaJ* con relação ao tempo.

5.3 Gene *cosY*.

5.3.1. Análise através do programa Blast da seqüência do gene *cosY*

O gene *cosY* corresponde a uma ORF de 978pb. As proteínas cujo gene codificador apresentam similaridade a este gene são as ornitinas ciclodesaminases (Ocd), que estão relacionadas na conversão de ornitina a prolina. Quando a seqüência da proteína hipotética CosY é comparada com a base de dados do Pfam, apresenta um alinhamento de 16,9% com o domínio da família das ornitinas ciclodeaminases e quando esta seqüência é comparada através do programa Blastp, apresenta um alinhamento com o domínio COG2423.2 das ornitinas ciclodeaminases encarregadas do transporte e metabolismo de aminoácidos.

Devido à alta complexidade do gene *cosY* foi retirado o filtro de baixa complexidade no programa BioEdit (Figura 24A) e quando comparado com o programa Pfam foi encontrada uma similaridade com o domínio das ornitina ciclodesaminase μ -cristal (Figura 24B). O gene *cosY* tem uma distribuição de códons compatíveis com os outros genes descritos em outras bactérias do gênero *Streptomyces*, e um possível sítio de ligação de ribossomos localizados na posição – 12 do início do gene (AGGACG).

Esta proteína μ -cristal é a principal constituinte do cristalino de olhos de marsupiais australianos e mRNAs humanos que codificam proteínas similares presentes em células neurais, músculo e rins, provavelmente a função esteja associada com funções de osmoregulação (Kim *et al.*, 1992)

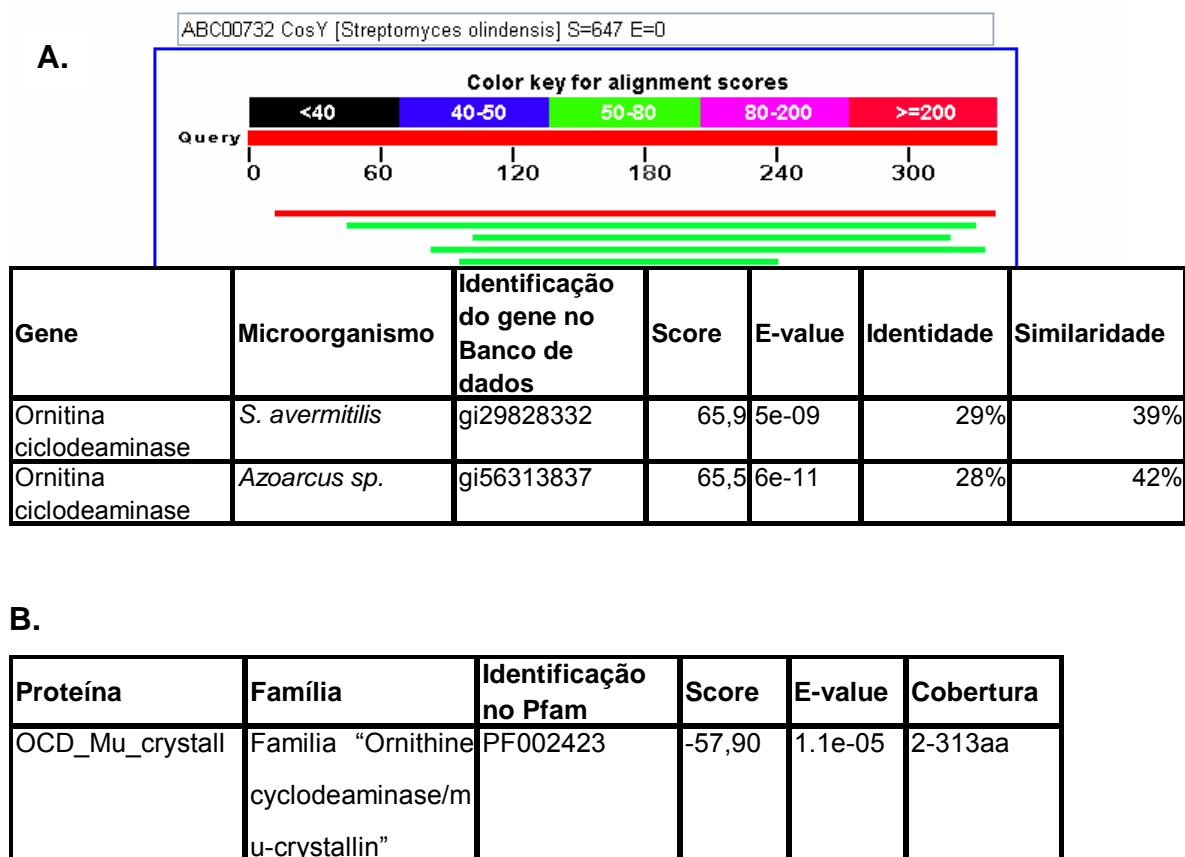


Figura 24: Análise bioinformática da seqüência do *cosY* de *S. olindensis*. A) Utilizou-se o programa Blast X, para determinar a similaridade da seqüência consenso. Os dois melhores alinhamentos obtidos na análise do consenso de *cosY* pelo programa estão indicados, com os respectivos valores de *score*, *e-value* e percentagem de identidade e similaridade. B) Utilizou-se o programa Pfam, para determinar a homologia com o domínio de proteínas, com os respectivos valores *score*, *e-value* e cobertura.

5.3.2. Subclonagem do locus genômico de *cosY* e construção de cassete de interrupção.

A estratégia utilizada para a subclonagem do gene *cosY* e construção do cassete de interrupção encontra-se esquematizada na figura 25. Para construção do plasmídeo contendo o gene de interesse, foi utilizado o cosmídeo p5E11 (14 Kb) proveniente da biblioteca genômica de *S. olidensis*, que contém os genes *cosY* e *cosS*. A seqüência de nucleotídeos do cosmídeo p5E11 foi digerido *in silico* através do programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) e os resultados determinaram que as enzimas de restrição *EcoRI* e *SacI* liberam um inserto de aproximadamente 4.5 Kb, com uma região a montante de 1.4 Kb e uma região 2.5Kb à jusante da região codificadora do gene *cosY*. Com estes resultados, o cosmídeo

p5E11 e o vetor pBSSK(+) foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *SacI*. Os fragmentos obtidos das digestões foram ligados e introduzidos por choque térmico em *E.coli*.

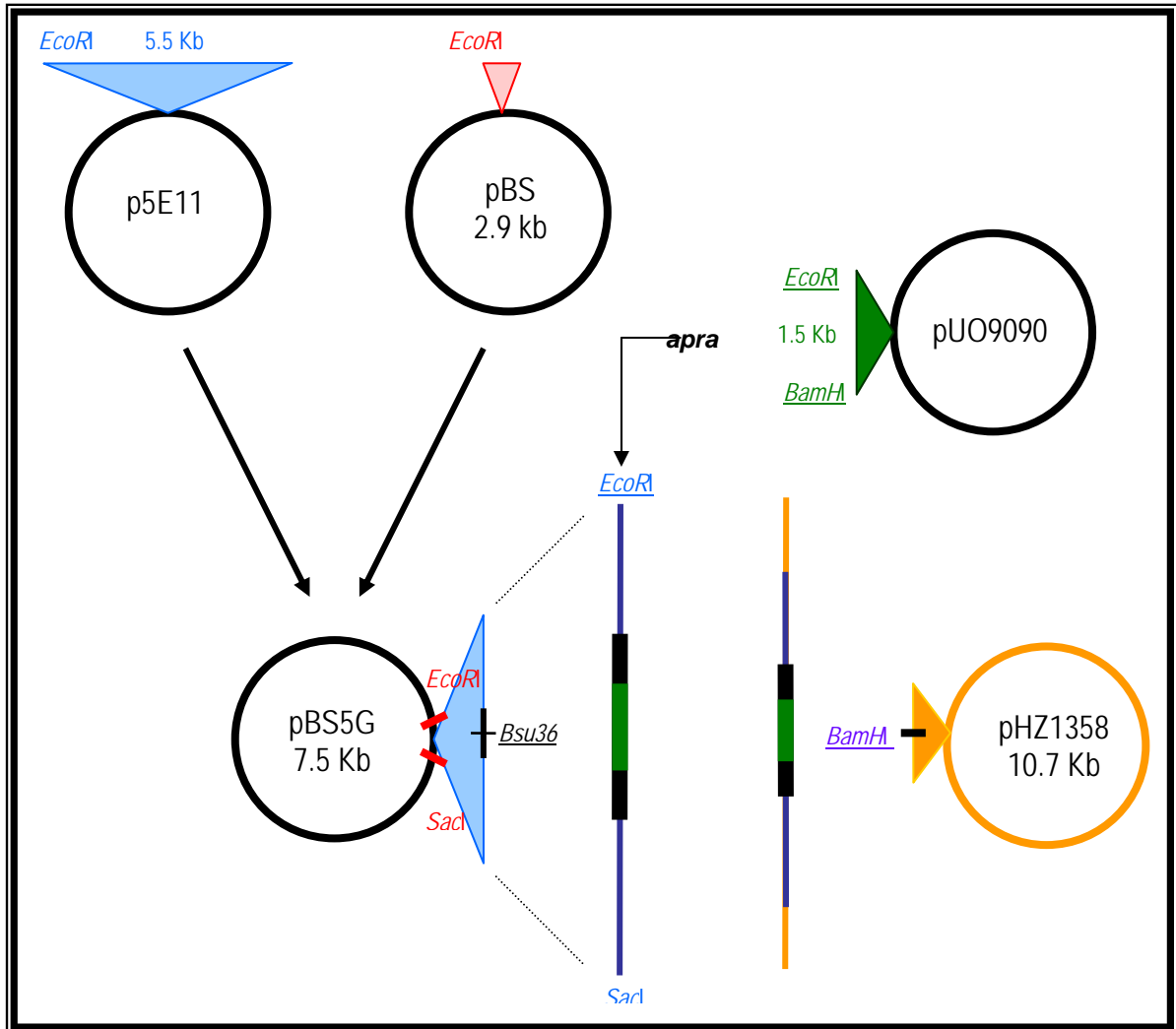


Figura 25: Estratégia de trabalho para a subclonagem do gene *cosY* e interrupção deste com o gene de resistência apramicina.

A partir do fragmento de 4,5 kb obtido da digestão com as enzimas *EcoRI* e *SacI* do cosmídeo p5E11, preparou-se uma sonda para a triagem dos subclones obtidos na transformação, através de hibridações por “Colony blot” (Figura 26). O subclone obtido foi nomeado pBS5G, e a confirmação foi realizada através da digestão com diversas enzimas de restrição (*SacI*, *EcoRI* / *XhoI*, *EcoRI/BamHI*) (Figura 27).

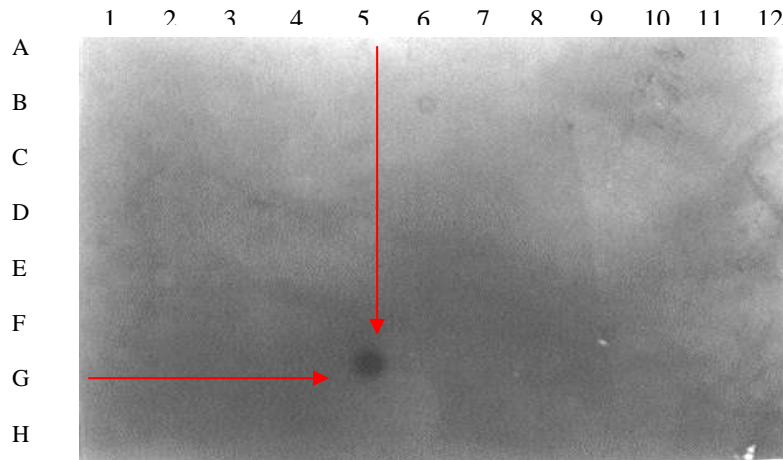


Figura 26: Hibridação por “colony-blot” de clones carregando o gene *cosY*. Destaca-se o subclone pBS5G.

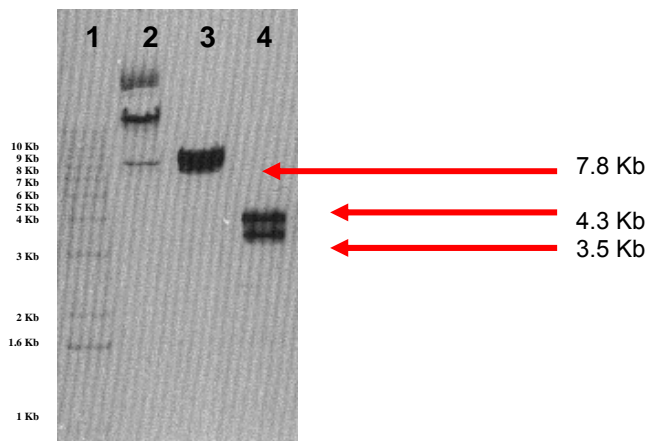


Figura 27: Análise de restrição do plasmídeo pBS5G. Canaleta 1 corresponde ao marcador de peso molecular 1 Kb Ladder Plus Invitrogen. Canaletas 2, 3 e 4: Digestões do plasmídeo pBS5G com as enzimas *SacI*, *EcoRI* / *XhoI*, *EcoRI* / *BamHI* respectivamente.

Os resultados obtidos da análise do padrão de digestão do plasmídeo pBS5G foram compatíveis com os resultados apresentados no programa *Nebcutter* para o gene *cosY*. Obtido o subclone pBS5G, a seguinte etapa foi a construção do plasmídeo que contém o gene *cosY* interrompido (Figura 28). Assim, decidiu-se inserir o cassete com o gene de resistência a apramicina (*apra*) no sítio único interno do plasmídeo pBS5G (*Bsu36I*).

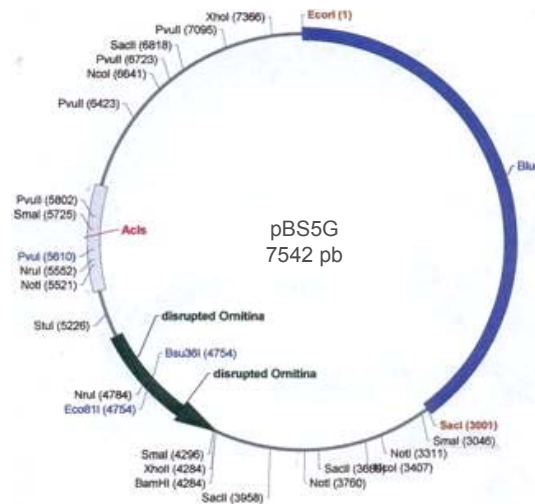


Figura 28: Mapa físico da subclonagem pBS5G (7542 pb).

O inserto de interrupção foi obtido a partir da digestão (*EcoRI* / *BamHI*) do plasmídeo pUO9090, este inserto (*apra*) tem um tamanho de aproximadamente 1,5 Kb. Uma vez compatibilizadas as extremidades, o inserto *apra* e o plasmídeo pBS5G foram ligados e o produto desta ligação foi introduzido em *E.coli* por transformação. A construção do novo plasmídeo pBS5G-A tem um tamanho de cerca 9,0 Kb. Na Figura 29, apresenta-se o esquema da distância entre os genes *cosS* e *cosY*, e a inserção do cassete de resistência a apramicina inserido no gene *cosY*. Além disso, estão apresentados os sítios de ligação dos oligonucleotídeos utilizados na confirmação da inserção e a orientação do cassete de interrupção *apra*.

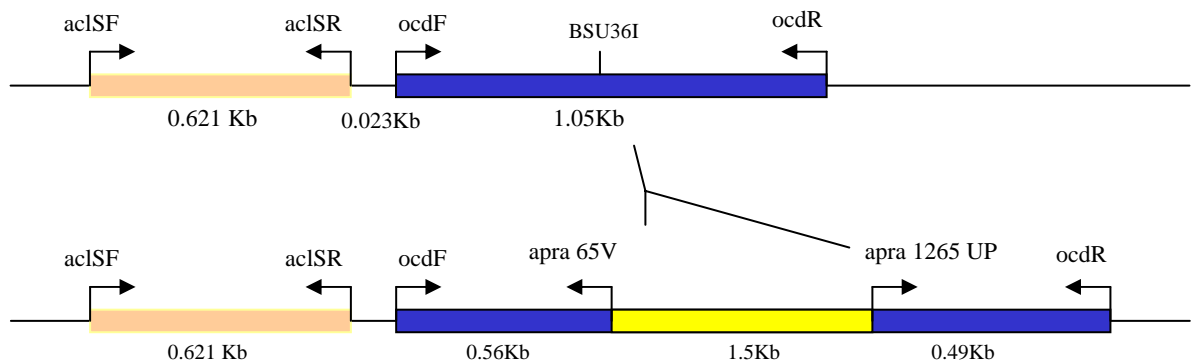


Figura 29: Representação esquemática do cassete de integração *cosY/apra*. Mostrando a inserção do cassete de resistência a apramicina (*apra*) no sítio *Bsu36I* do gene *cosY* de *S.olindensis*.

Para confirmar a orientação da inserção do cassete de apramicina no gene *cosY* dos clones pBS5G-A crescidos no antibiótico de resistência a apramicina, foram realizadas análises por PCR. Com este objetivo, utilizaram-se os oligonucleotídeos *aclsF* do gene *cosS* e os oligonucleotídeos *apra65V* e *apra1265UP* inversos ao gene *apra*, e realizaram-se duas reações de PCR: a primeira que utilizava o iniciador *aclsF* com *apra65V* e a outra *aclsF* com *apra1265UP*. Como se pode observar na Figura 30, o produto de amplificação esperado é de cerca de 1,2 Kb, indicando que a posição do gene *apra* possui o mesmo sentido que a região codificadora do gene *cosY*. Os 4 clones obtidos apresentaram a orientação esperada, o que indica que apresentam o cassete de integração com o gene *cosY* interrompido concluído.

Reação 1 (R1): *aclsF* – *apra 65V*
Reação 2 (R2): *aclsF* – *apra 1265 UP*

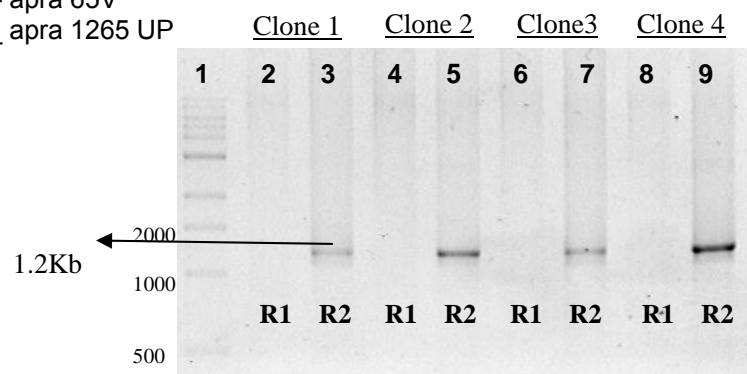


Figura 30: Amplificação por PCR do fragmento *aclsF/apra*, indicando a orientação do cassete de interrupção inserido no gene *cosY*. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 kb Ladder Plus (Invitrogen). Canaletas 2, 4, 6 e 8: Amplificação pela reação de PCR R2. Canaletas 1, 3, 5 e 7: Amplificação pela reação de PCR R1.

5.3.3. Construção do plasmídeo conjugativo com o gene *cosY*.

Após a obtenção do plasmídeo pBS5G-A com o gene *cosY* interrompido, o passo seguinte foi retirar o fragmento contendo o gene *cosY* interrompido do plasmídeo pBSKS para subcloná-lo no plasmídeo conjugativo pHZ1358 (10,9 kb). Com este intuito foram paralelamente digeridos os plasmídeos pBS5G-A com as enzimas *EcoRI/SacI* (5.8 kb) e o plasmídeo pHZ1358 com a enzima *BamHI*.

O plasmídeo resultante desta clonagem foi denominado pHZ5G. A confirmação da construção do plasmídeo para conjugação foi realizada através de PCR de possíveis clones com os oligonucleotídeos *apraF* e *apraR* para confirmar a

presença do cassete de interrupção apramicina (Figura 31A), e com os oligonucleotídeos *ocdF* e *ocdR* para confirmar a inserção do fragmento apra no gene *cosY*. Neste último caso, as bandas que apresentaram um tamanho de aproximadamente 2.5 kb como produtos de amplificação, indicam a inserção do cassete de interrupção no gene *cosY* (Figura 31B).

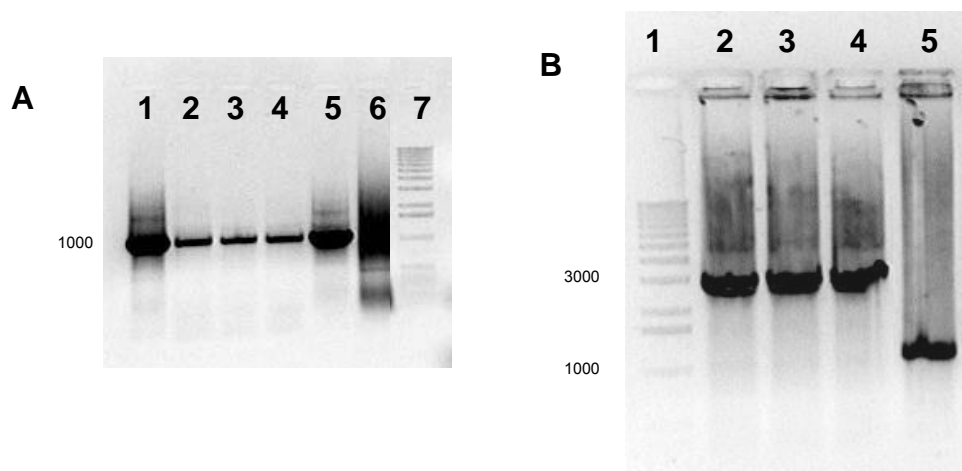


Figura 31: Confirmação da construção do plasmídeo pHZ5G. **A.** Amplificação com os oligonucleotídeos específicos para o gene *apra* contido no cassete de interrupção. Canaletas 1-5: transformantes contendo o cassete de interrupção. Canaleta 6: 1 kb Ladder Plus (Invitrogen). **B.** Confirmação da inserção do cassete de interrupção apramicina no plasmídeo pHZ5G através dos oligonucleotídeos específicos para o gene *cosY*. Canaleta 1: 1 kb Ladder Plus (Invitrogen). Canaletas 2, 3 e 4: transformantes contendo o cassete de interrupção. Canaleta 5: gene *cosY*.

5.3.4. Conjugação

Foram realizadas 12 tentativas de conjugação empregando-se a cepa de *E. coli* *ET12567* e *S17-1* com o meio A e com o meio R5M, com diferentes modificações no protocolo do item 4.7. Entre as mudanças realizadas destaca-se o tempo para a adição dos antibióticos apramicina e ácido nalidíxico em 2 ml de água, nas placas com o produto conjugado, este procedimento é denominado de “flooding”, o tempo variou entre 18 - 26 horas.

Foram utilizados aproximadamente 20 clones a cada tentativa de conjugação dividindo o produto conjugado em duas placas para evitar que ocorresse algum tipo de competição entre os possíveis conjugantes.

Várias vezes foram obtidas prováveis colônias de *Streptomyces*, mas quando foram semeadas em meio A com apramicina 25µg/ml e ácido nalidíxico 25µg/ml não cresceram. As colônias apresentaram uma textura seca sem presença de micélio, e se destacavam entre as outras porque tinham um crescimento constante. Provavelmente, um dos motivos porque ainda não se tenha encontrado o mutante é que a recombinação dupla não está acontecendo, possivelmente pela instabilidade do plasmídeo conjugativo. Por este motivo foi abordada outra estratégia para forçar a presença deste vetor na bactéria receptora. Com este objetivo utilizou-se o antibiótico tiostrepton, marca de resistência do plasmídeo conjugativo pHZ1358, para ser aplicado em “flooding” nas placas conjugadas, a uma concentração de 50 µg/ml. Este antibiótico foi aplicado após 7 horas da conjugação, tempo que foi considerado suficiente para que o novo plasmídeo tenha integrado na bactéria receptora. Os antibióticos apramicina e ácido nalidíxico foram adicionados normalmente depois de 24 horas da conjugação.

Para resolver os problemas de falta de esporulação em *S. olindensis*, foram inoculados esporos e micélio em meio A, meio R5M e em meio LB líquido e sólido, e incubados a 28°C e 37°C. Os melhores resultados foram obtidos com esporos em meio LB líquido a 37°C. Após o micélio ter se desenvolvido este foi semeado em meio A sólido e incubado a 37°C por 24h e depois mantido a 28°C por 7-10 dias.

5.3.5. Subclonagem do gene *cosY* no vetor de expressão pEM4.

Visando a complementação dos futuros mutantes foi realizada a construção do plasmídeo pEM4Y (Figura 32), utilizando-se o vetor pEM4 (7,9 Kb) e um inserto formado pelo gene *cosY*, obtido como produto de um PCR com os oligonucleotídeos *ocdF* e *ocdR*. O produto foi amplificado com a enzima *Pfu*. O vetor pEM4 é bifuncional *E.coli* - *Streptomyces*, possui um promotor constitutivo de resistência à estreptomicina (*ermE**) presente no sítio múltiplo de clonagem.

A confirmação dos clones positivos foi realizada através de PCR (Figura 33) com oligonucleotídeos específicos para o gene *cosY* (*ocdF* e *ocdR*) (1,1 Kb).

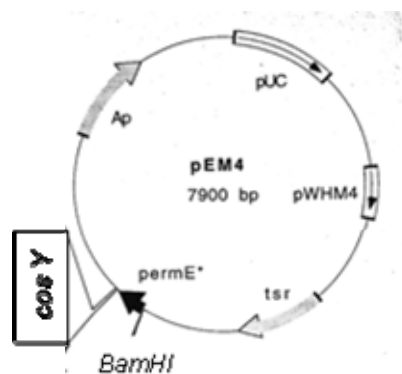


Figura 32: Mapa físico do clone pEM4Y (aproximadamente 9.0 Kb).

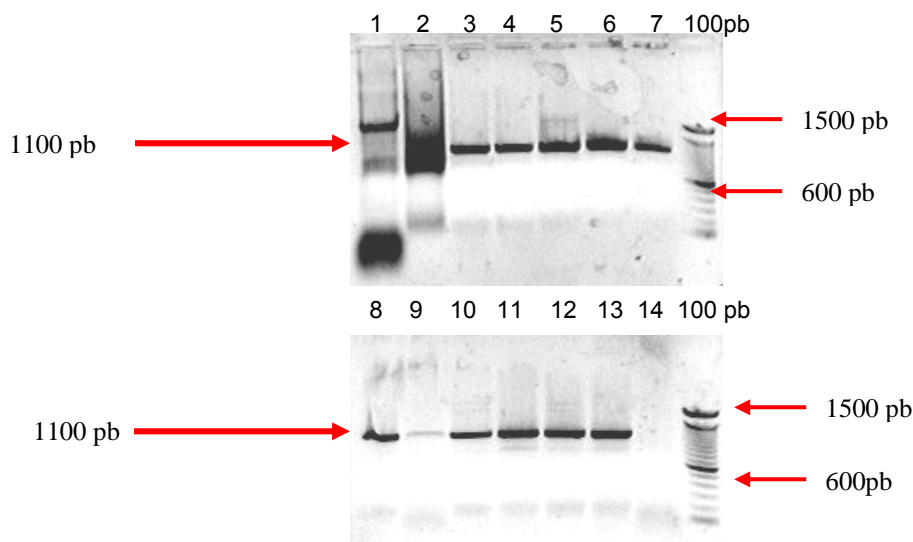


Figura 33: Amplificação do fragmento correspondente ao gene *cosY* (aprox. 1100pb) amplificado com os oligonucleotídeos *ocdF* e *ocdR*, confirmando a inserção do gene no plasmídeo pEM4. As canaletas 1-14 são os clones respectivamente, e as canaletas 8 e 16, são o padrão de peso molecular 100 pb (Fermentas).

5.4. Gene *cosS*

5.4.1. Análise através do programa Blast da seqüência do gene *cosS*

Este gene com 621 pb codifica um peptídeo de 187 aminoácidos que apresenta uma similaridade de 68% com o gene *aciS* de *Streptomyces galileus* (Figura 34A) e uma região de baixa similaridade com o domínio Pfam tipo PadR (esta proteína está relacionada com a repressão da degradação dos ácidos fenólicos) (Figura 34B).

A proteína CosS possui uma identidade de 40% com proteínas descritas como reguladores hipotéticos transcricionais e uma similaridade de 55% com as mesmas proteínas, tal como AclS.

Entretanto, genes homólogos a este estão descritos como potenciais reguladores transcricionais como em *S. avermitilis*, esta anotação corresponde a um repressor de uma família de reguladores transcricionais (PadR) como se pode observar na Tabela 2f. O fato do mecanismo de ação de nenhuma proteína do tipo PadR ter sido descrita ainda para *Streptomyces*, além de sua possível ação na regulação da produção de cosmomicinas, motivou o seu estudo neste trabalho.

Uma outra característica da proteína CosS é o pequeno tamanho (187 aminoácidos) em relação às outras proteínas de *Streptomyces* (213 aminoácidos).

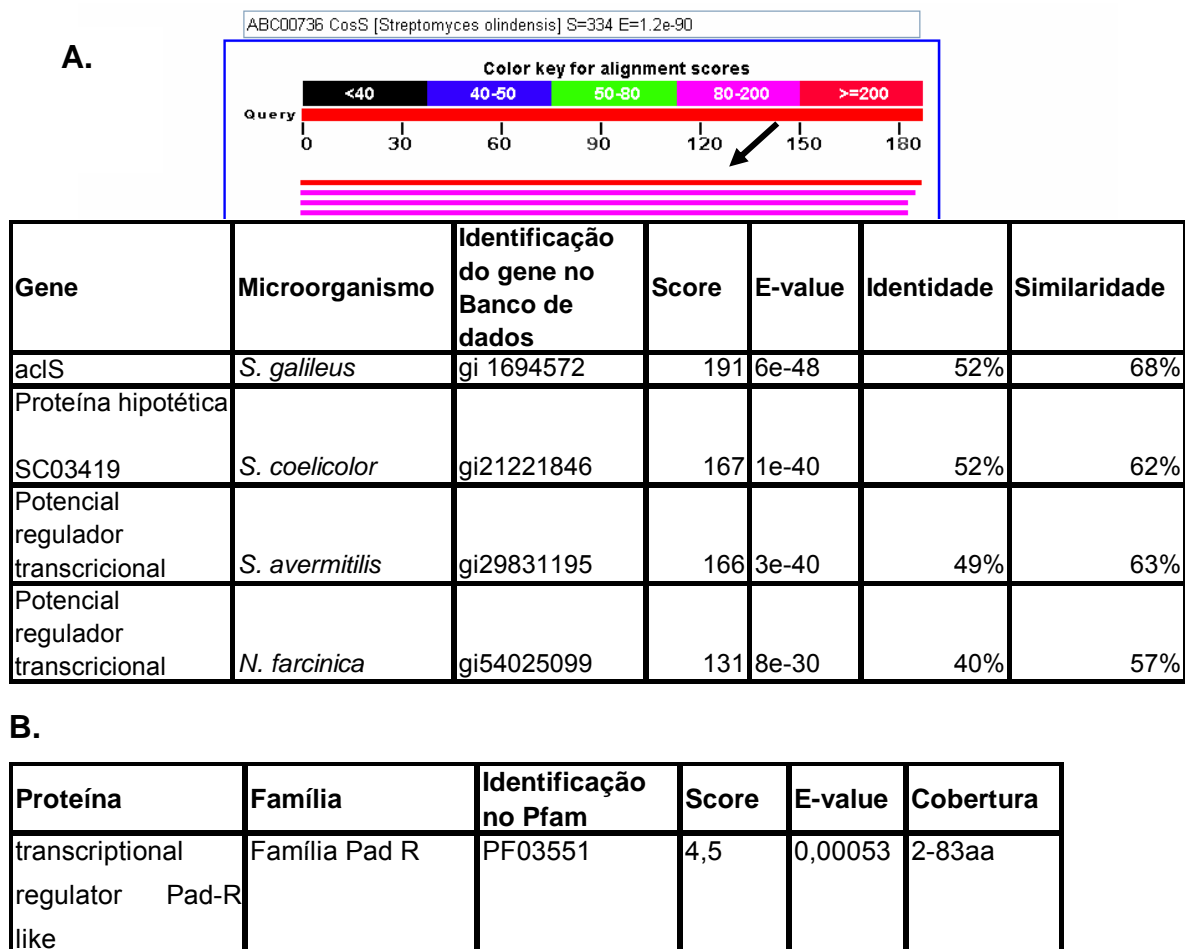


Figura 34: Análise bioinformática da seqüência do *cosS* de *S. olindensis*. a) Utilizou-se o programa BlastX, para determinar a similaridade da seqüência consenso. Os 4 melhores alinhamentos obtidos na análise do consenso de *cosS* pelo programa estão indicados, com os respectivos valores de *score*, *e-value* e porcentagem de identidade e similaridade. b)

Utilizou-se o programa Pfam para determinar a homologia com o domínio de proteínas, com os respectivos valores *score*, *e-value* e cobertura.

5.4.2. Subclonagem do locus genômico de *cosS*

A estratégia utilizada para a subclonagem do gene *cosY* e construção do cassete de interrupção encontra-se esquematizada na Figura 35. Para a subclonagem do gene *cosS* foi utilizada a mesma estratégia do gene *cosY* (item 5.3.2), mas utilizando o vetor de clonagem pBC SK(+) por possuir só um sítio de restrição de *PvuI*, sítio que foi escolhido para fazer a interrupção gênica do locus *cosS*.

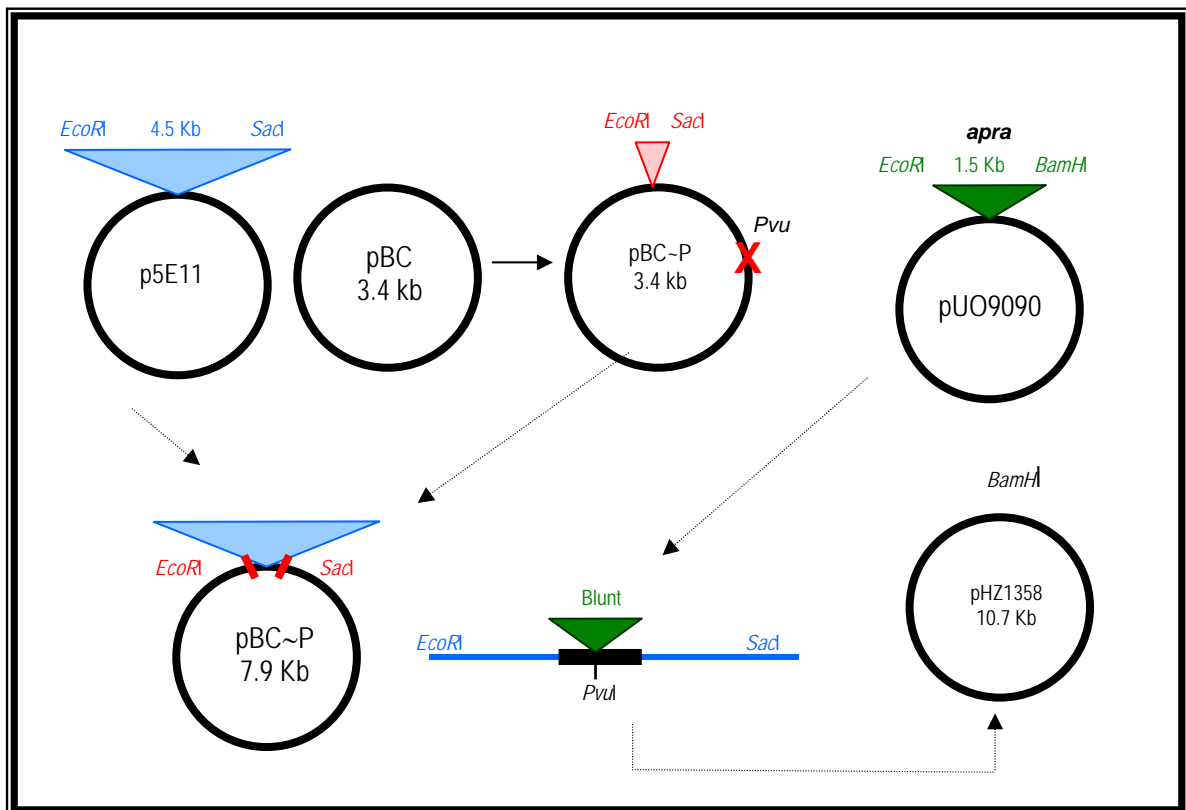


Figura 35: Estratégia de trabalho para a subclonagem do gene *cosS* e interrupção com o gene de resistência apramicina.

Visando ter o sítio *PvuI* do gene como único sítio de restrição, o vetor pBC foi digerido com esta enzima, foram preenchidas as extremidades coesivas e posteriormente foi ligado. O novo vetor obtido foi nomeado pBC~P (Figura 36).

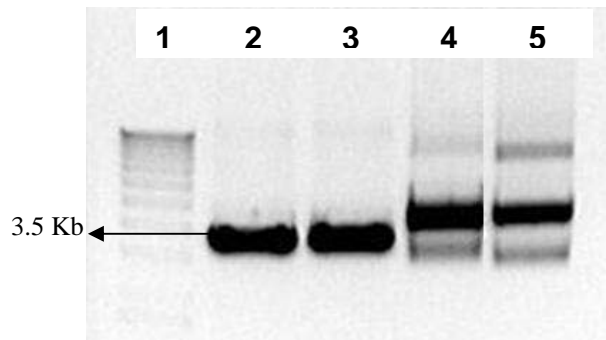


Figura 36: Confirmação da perda do sítio *PvuI* no plasmídeo pBC. Canaleta 1: Marcador molecular 1Kb Ladder Plus (Invitrogen). Canaleta 2-3: vetor pBC digerido com a enzima *PvuI*, canaleta 4: pBC~P sem digerir e canaleta 5: pBC~P digerido com a enzima *PvuI*.

Obtido o subclone pBS5G, a etapa seguinte foi a construção do plasmídeo que contém o gene interrompido. Após análise da seqüência de 12 Kb do cosmídeo p5E11 no programa Ncbutter determinou-se que as enzimas *EcoRI* e *SacI* liberam o inserto com o gene de interesse, com 2,5 Kb da região a montante e 1,7 da região à jusante ao gene (Figura 37).

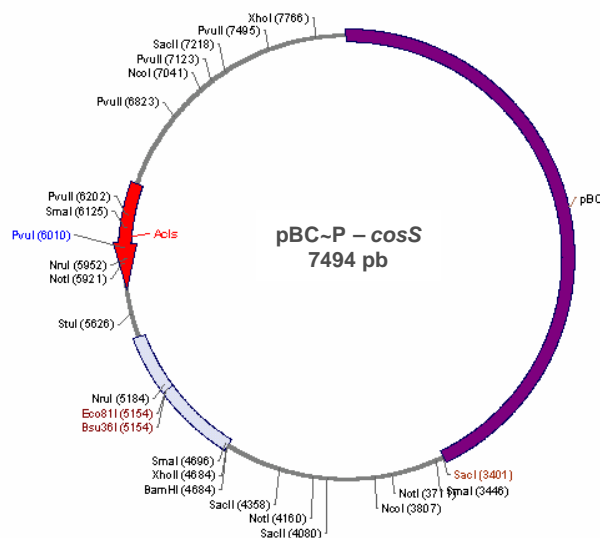


Figura 37: Mapa físico da subclonagem pBC~P - *cosS* (aprox. 8,0 Kb).

A confirmação dos clones foi realizada por PCR com os oligonucleotídeos acIS F e acIS R. O produto de amplificação obtido apresentou aproximadamente 600pb, tamanho correspondente ao gene *cosS* (Figura 38).

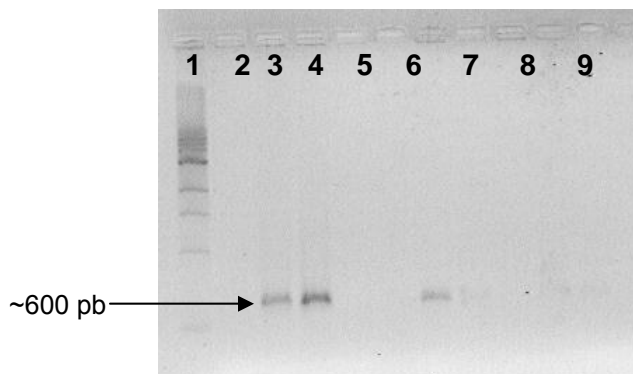


Figura 38: Amplificação do gene *cosS* dos clones pBC – *EcoRI/BamHI* usando os oligonucleotídeos acISF e acISR. Canaleta 1: Marcador molecular Ladder 1 Kb Plus (Invitrogen). Canaletas 2-10: clones que cresceram no antibiótico de resistência (cloranfenicol) do vetor pBC.

Para confirmar os clones que amplificaram por PCR foi realizado uma análise de restrição com a enzima *EcoRI*, obtendo-se bandas de diferentes tamanhos, mas o fragmento não foi linearizado como esperado.

Esta estratégia foi repetida, preparando novo inserto, para evitar possíveis erros, mas os resultados foram os mesmos. A amplificação do gene *acIS* correspondia ao tamanho esperado (600pb), mas a análise de restrição não correspondia ao plasmídeo esperado.

5.4.3. Nova estratégia para a subclonagem do gene *cosS*

Visando interromper o gene *cosS* elaborou-se outra estratégia de subclonagem que consistiu em fazer uma mutação por deleção. Com este objetivo, foi amplificado o plasmídeo pBS5G inteiro (aproximadamente 6,8 Kb) exceto a região do gene *cosS* (aproximadamente. 600 pb) e que foi substituída pelo gene de resistência *apra* (Figura 39).

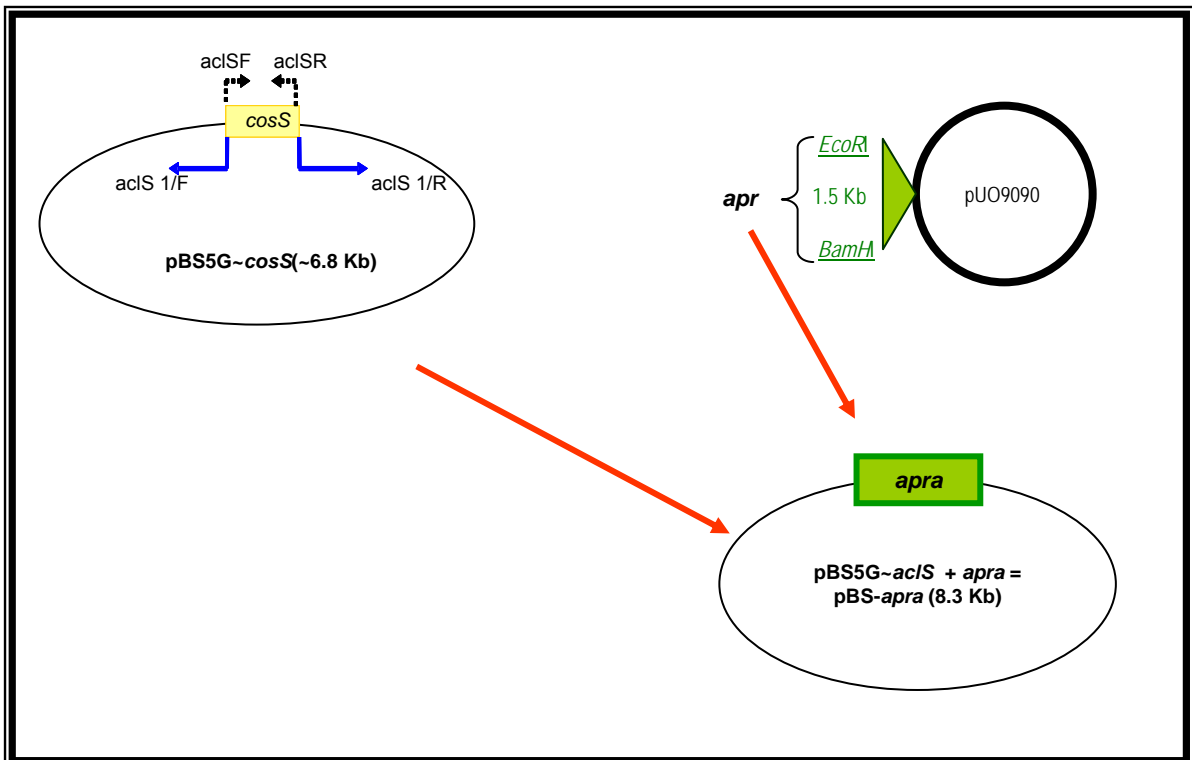


Figura 39: Segunda estratégia de trabalho para a subclonagem do gene *cosS* e interrupção com o gene de resistência a apramicina (aproximadamente. 8,3 Kb).

Para isto, foram desenhados oligonucleotídeos de 30 *mer* que amplificaram de forma divergente ao gene *cosS* (Wang e Wilkinson, 2001). Segundo estes autores, esta estratégia diminui a possibilidade de inespecificidade.

O primeiro passo foi amplificar o fragmento de aproximadamente. 6,8 Kb. Foram feitas várias tentativas de amplificação com enzimas como Long PCR, *Pfu* DNA polimerase, Platinum *Taq* DNA polimerase e High Fidelity, mas só com esta última enzima se obteve o produto esperado, pois com as outras não houve amplificação ou apresentavam muitas bandas inespecíficas. Esta amplificação foi confirmada por PCR com os oligonucleotídeos internos (*ocdF* e *ocdR*) presentes no fragmento amplificado (Figura 40).

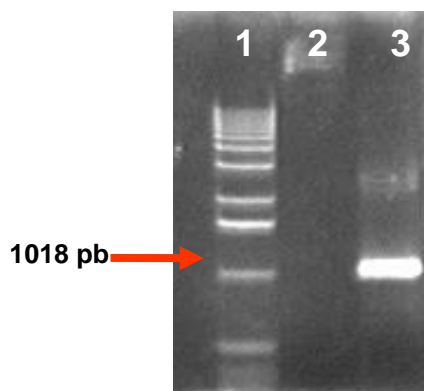


Figura 40: Confirmação do produto de PCR de 6,8 Kb amplificado com a enzima High Fidelity (Invitrogen) usando oligonucleotídeos internos (*ocdF* e *ocdR*). Canaleta 1: Marcador molecular 1Kb Ladder Plus (Invitrogen). Canaleta 2: Controle negativo. Canaleta 3: Amplificação do gene *ocd* (~1.1 kb).

O segundo passo foi preparar o cassete de deleção *apra* (*EcoRI* / *BamHI* aprox. 1.3 kb). Este fragmento obtido do plasmídeo pUO9090 foi tratado com a enzima *Klenow fragment* e posteriormente clonado no fragmento amplificado de 6,8 Kb. A confirmação destes clones foi analisada através de amplificação por PCR com os oligonucleotídeos *apraF* e *apraR*, pertencentes ao inserto de apramicina (Figura 41).

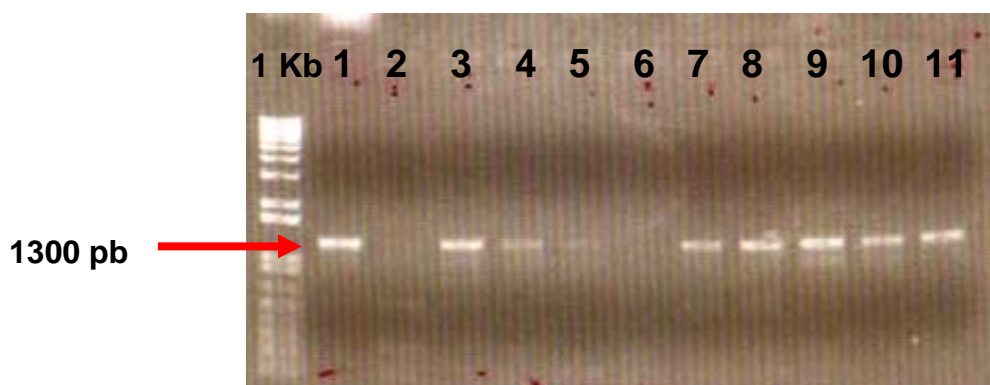


Figura 41: Amplificação do fragmento correspondente ao gene *apra* (~1100pb) com os oligonucleotídeos *apraF* e *apraR*, confirmando a inserção do gene. Canaleta 1: Marcador molecular 1 Kb Ladder Plus (Invitrogen). Canaletas 2-11: clones.

5.4.4. Subclonagem do gene *cosS* no vetor de expressão pEM4.

Visando a complementação dos futuros mutantes foi planejada a construção do plasmídeo pEM4S utilizando a mesma estratégia descrita no item 5.3.5., porém tendo como inserto o fragmento (600pb) amplificado a partir dos oligonucleotídeos *aclSF* e *aclSR*. O novo clone foi nomeado pEM4S (Figura 42).

A confirmação dos clones foi realizada através PCR (Figura 43).

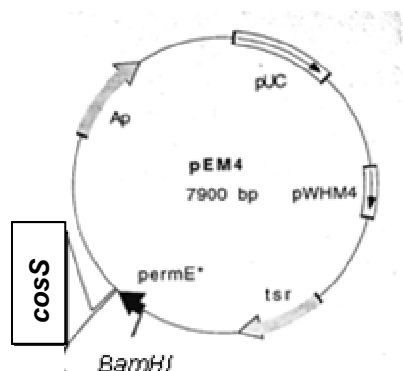


Figura 42: Mapa físico do clone pEM4S (aproximadamente 8,5 Kb).

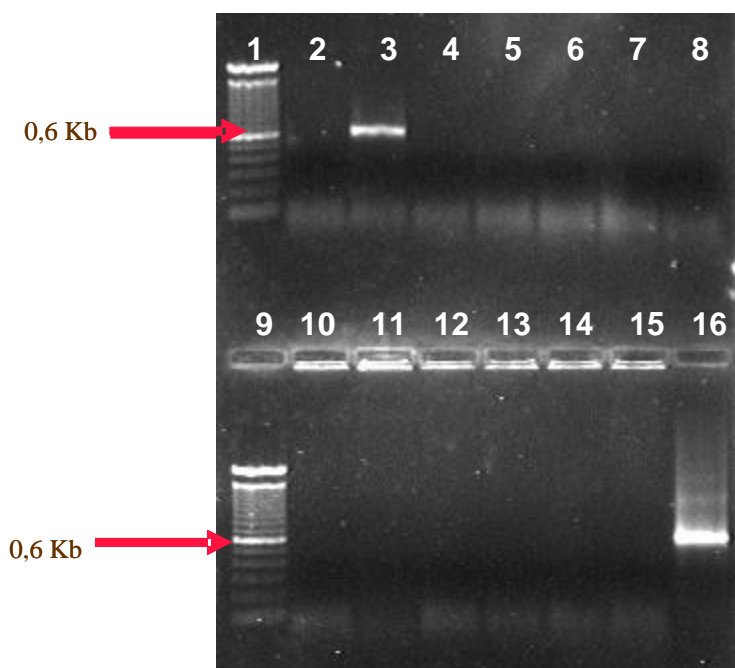


Figura 43: Amplificação do fragmento correspondente ao gene *cosS* amplificado com os oligonucleotídeos *aclSF* e *aclSR*, confirmando a inserção do gene no plasmídeo pEM4. Canaleta 1 e 9: Marcador molecular 1 kb Ladder Plus (Invitrogen). Canaleta 2-8 e 10-15: clones. Canaleta 16: Controle positivo.

5.5. Triagem de prováveis novas enzimas de glicosiltransferases em *Streptomyces olindensis*.

Baseando-nos na hipótese resultante dos estudos realizados por Garrido (2005), existe a possibilidade da presença de 4 glicosiltransferases que participariam da transferência dos açúcares a aglicona na via biossintética da cosmomicina. Trabalhando em cima desta hipótese, foram desenhados oligonucleotídeos degenerados a partir de regiões consenso das proteínas AknK, RhoG e DnrS, e de outras glicosiltransferases envolvidas em biossíntese de antibióticos, presentes em várias espécies de *Streptomyces*. As seqüências foram alinhadas nos programas Clustal W e Blocks (Figura 44).

Os oligonucleotídeos para a reação de PCR foram desenhados fazendo a tradução reversa dos domínios protéicos selecionados para seqüências degeneradas de DNA. Para realizar esta tradução utilizou-se a tabela de codons preferencialmente utilizados nos genes de *Streptomyces coelicolor* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Streptomyces+coelicolor+A3%282%29+%5Bqbbct%5D&aa=1&style=GCG>). Os oligonucleotídeos obtidos foram nomeados gtr1 e gtr2.

Estudo de genes envolvidos na via biossintética do antibiótico antitumoral Cosmomicina.

	10	20	30	40	50	60
RhoGxx1	MRVLLTAF	AQDAHLNGV	VPLAWALR	TAGHEVR	VAGQPA	AVESITR
CosGxx4	MRVLLTAF	AQDAHLNGI	VPLAWALR	TAGHEVR	VAGQPA	AVESITR
glycosyl	MKVLVTAF	AMDAHFNGV	VPLAWALR	AGHDV	RVASQP	PALTD
dnrSxx5	MKVLVTAF	AMDAHFNGV	VPLAWALR	AGHDV	RVASQP	PALTD
glycosyl_transferase	MRVLMTSL	AVEAHFNGA	VPLAWALR	AGHEVR	VAGQP	PALTE
AknSxx7	MRVLLT	SFALDAHFNGS	VPLAWALR	AGHEVR	VASQP	PALTAS
L_rhamnosyltransferase	MRVLLT	VPPLDAHFNGS	VPLAWALR	AGHEVR	VAAQP	PPLTAG
glycosyltransferase	--MMMTT	FAANTHFQPI	VPLAWALR	AGHEVR	VVSQPS	LSDDV
AknKxx0	MKVLFTT	FAAKSHMHAQ	VPLAWALQ	TAGHEVR	IASQP	DLAEDI
AclKxx8	MKVLFTT	FAAKSHMHAQ	VPLAWALQ	TAGHEVR	IASQP	DLAEDI
CosKxx3	MRVLF	TFAAKSHMHAQ	VTLAWAL	KAAGHD	VRIASH	PDLAEDI
	..*	..*:	..*:	..*:	..*:	..*:
Prim. cons.	MRVL2T	2FAADAHFNG2	VPLAWALR	TAGHEVR	VASQP	PALTESITR
	70	80	90	100	110	120
RhoGxx1	AVIPTV	GPGLM-----	LMHHLDR	DYLENR	PERLSL	DFLRAS
CosGxx4	AVIPTV	GPGLM-----	LMHHLDR	DYLENR	PERLSL	DFLRAS
glycosyl	AAMGAM	APGV-----	FALHLN	PDYLENR	PELLD	LEFLE
dnrSxx5	AAMGAM	APGV-----	FALHLN	PDYLENR	PELLD	LEFLE
glycosyl_transferase	ELVREL	GAE-----	TGFYR	DIDLT	GERGD--	DYLAL
AknSxx7	EMVKGV	GDAV-----	LSHHA	QDLD	ADT	PGQLT
L_rhamnosyltransferase	AVMARK	KGPRI-----	YAHHE	GRDLR	RAAT	APDGP
glycosyltransferase	QFAAT	WGDDA-----	YIGVNS	IDFT	GNDP	GLWTW
AknKxx0	EQMQRV	NEGLGDD	AEIMES	QAEAG	MDMT	ETRPE
AclKxx8	EQMQRV	NEGLGDD	AEIMES	QAEAG	MDMT	ETRPE
CosKxx3	EQMQET	QENIGQ	DVDQLES	SAQV	GLDM	SETR
	..*	..*:	..*:	..*:	..*:	..*:
Prim. cons.	22MQ2V	GP2GDDAE	IME22HHL	2RDY2	ENRPE	2LT2DF
	130	140	150	160	170	180
RhoGxx1	IDELVD	YARF	WQPD	LVLWE	PPTF	FAGAI
CosGxx4	IDALVD	YARF	WQPD	LVLWE	PPTF	FAGAV
glycosyl	IDEMVD	FAAW	WRPDL	VVWE	PPTF	FGGAV
dnrSxx5	IDEMVD	FAAW	WRPDL	VVWE	PPTF	FGGAV
glycosyl_transferase	VDELVD	YARY	WRPDL	VIWE	PPTF	FAGAV
AknSxx7	VDDLVA	FARG	WEPDL	LILWE	PPTF	FAGAV
L_rhamnosyltransferase	VDDLVA	FARG	WEPDL	LILWE	PPTF	FAGAV
glycosyltransferase	VDGVEF	ARD	WRPDL	VIWE	PLTF	FAGAV
AknKxx0	IDDVVA	FARE	WQPD	LIVWD	TL	SFAG
AclKxx8	IDDVVA	FARE	WQPD	LIVWD	TL	SFAG
CosKxx3	VDELVE	HCRS	WKPDL	VLWDT	MT	FAGAI
	..*	..*:	..*:	..*:	..*:	..*:
Prim. cons.	IDELVD	FAR3WR	PDLVVWE	PPTF	FAGAV	AAQV
	190	200	210	220	230	240
RhoGxx1	PEA-----	LRDDPLE	EWL	LAYT	LDRH	GAAFD
CosGxx4	PAE-----	LRDDPLE	EWL	LAYT	LDRH	GAAFD
glycosyl	PAE-----	RRDDALE	EWL	TWT	LERH	GAAFG
dnrSxx5	PAE-----	RRDDALE	EWL	TWT	LERH	GAAFG
glycosyl_transferase	PRE-----	LHDDT	LE	EWL	TWT	LG
AknSxx7	PAGPAG	GNGT	THP	DDSL	GQW	LEWT
L_rhamnosyltransferase	GVD---	AGST	PGAD	PLRD	WT	TGQ
glycosyltransferase	PFE-----	HRED	PTA	EWL	GRML	LD
AknKxx0	LPE-----	QRDD	PLRE	WL	TWT	LG
AclKxx8	LPE-----	QRDD	PLRE	WL	TWT	LG
CosKxx3	PPE-----	LRDD	PLRE	WL	TWS	LERH
	..*	..*:	..*:	..*:	..*:	..*:
Prim. cons.	PAE	PAGG2G2	TLRDD	PLEE	WL	TWT

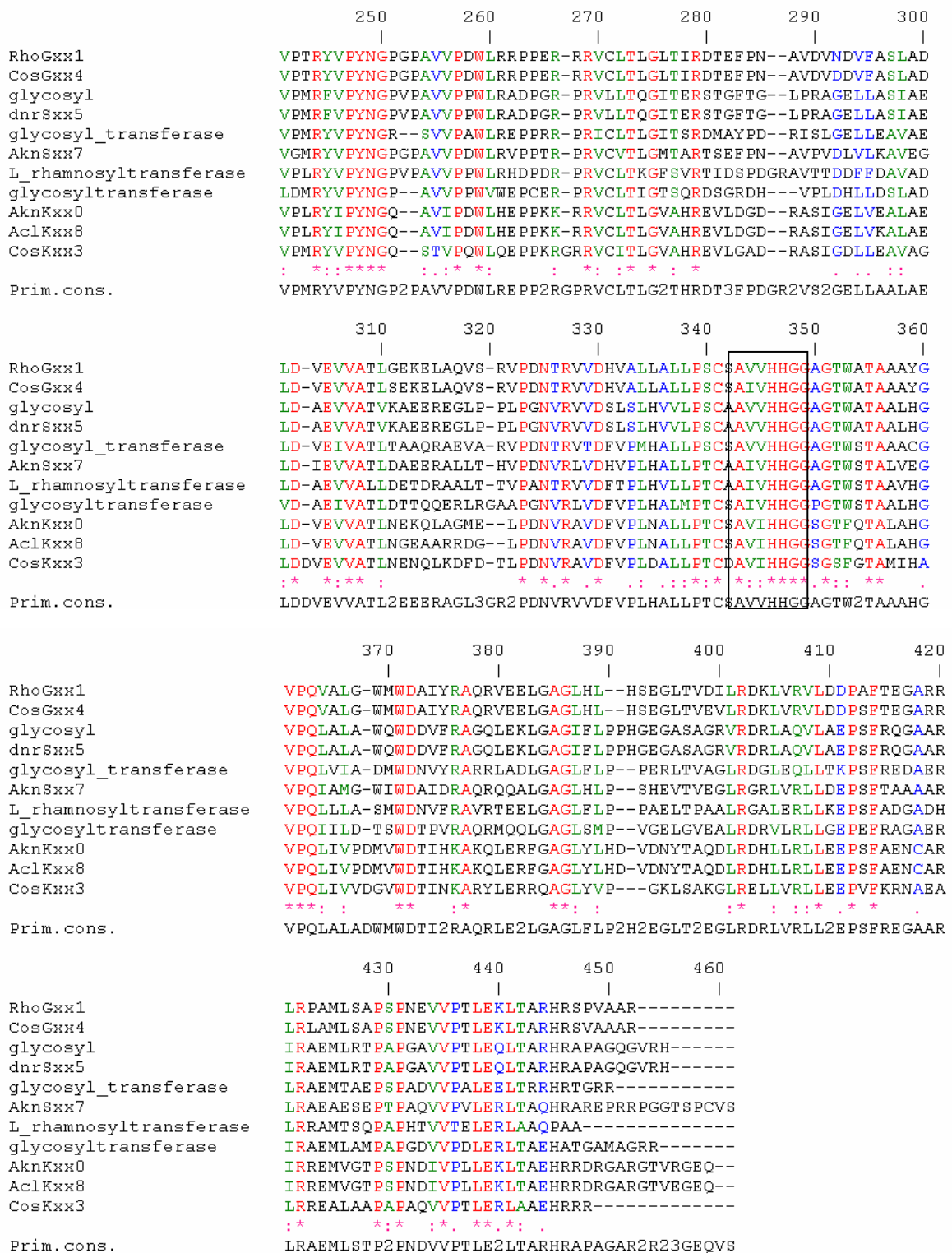


Figura 44. Análise comparativa entre as seqüências dos genes *cosK*, *cosG* e outras glicosiltransferases . O alinhamento foi realizado através do programa Clustal W (<http://npsa-bil.ibcp.fr>).

A partir destes oligonucleotídeos, foi realizada uma reação de PCR que teve como molde o DNA genômico de *S. olindensis*, os fragmentos amplificados (aproximadamente 1,1 Kb) foram denominados GTR. Estes fragmentos foram clonados no vetor linear (4 Kb) pCR*4 Blunt-TOPO* (Invitrogen) (Figura 45).

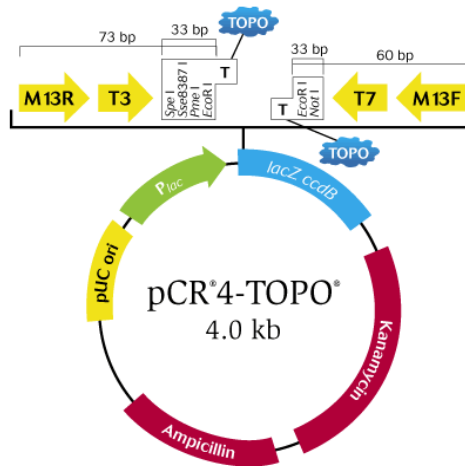


Figura 45: Vetor linear pCR*4 Blunt-TOPO* (4 Kb) (Invitrogen).

Para a validação dos subclones obtidos da clonagem foram realizadas ampliações com o par de oligonucleotídeos gtr1 e gtr2 (Figura 46).

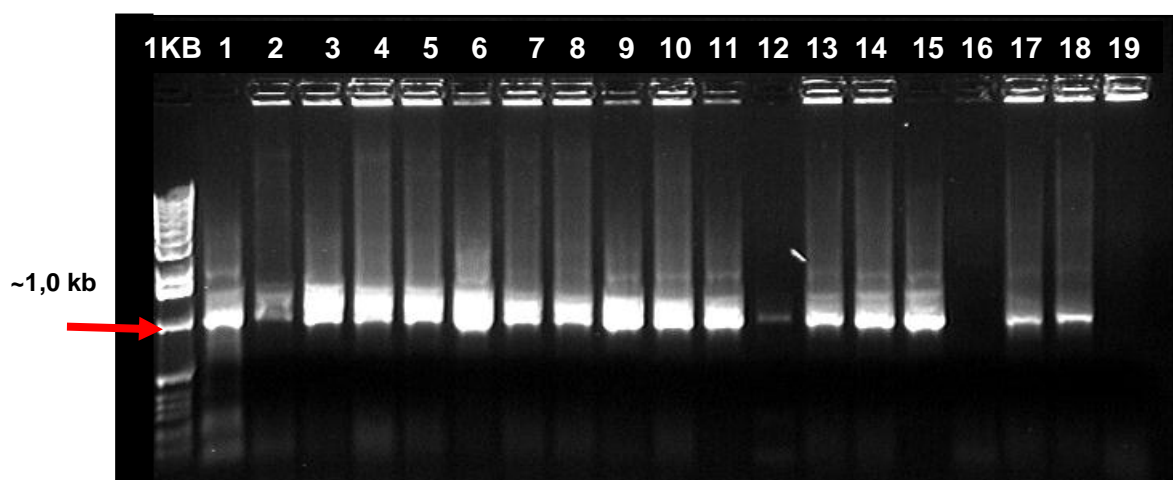


Figura 46: Amplificação do fragmento gtr1 e gtr2 (~ 1,1 Kb) confirmando a inserção do fragmento. A canaleta 1 corresponde ao padrão de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). As canaletas 2-19 indicam os clones 1-19 respectivamente.

O DNA plasmidial de 30 clones validados foram seqüenciados com o par de oligonucleotídeos “Universal M13 senso & Universal M13 antisenso”. As seqüências obtidas foram analisadas pelo pacote de programas SEARCHGTr (Kamra *et.al.*, 2005), que utiliza os programas de alinhamentos N&W e BLAST, para traduzir a seqüência de nucleotídeos em seqüência de aminoácidos nas 6 possíveis fases de leitura e realiza uma comparação das seqüências traduzidas com uma base não-redundante de seqüências de proteínas GTrs homólogas de banco de dados GENBANK, SWISS-PROT, CAZY, PDB, PDBSum e PUBMED.

Os resultados do programa SEARCHGTr, mostraram a presença de um domínio específico de glicosiltransferases e que a seqüência codificante para o provável gene GTr, estaria numa ORF na fase de leitura +3, que traduz uma seqüência de aminoácidos prevista de 245 aminoácidos (Figura 47).

A.-

>C6B3 FRAME +3

```
VRITSLKCDSCSVTNSPXQSVVTIFSWPWL DYSAGERGRGRGRRAHLTGIRLSGTARQLSPP  
CVPAQCHSGVNVLRSGMDVNVTLRARCWSVCGMRAVHVGLKSVSGGVLACHVPEPNSNRLSG  
LRGVDDGELRTRYAQAPPLTWPDVVTD RAGSRDARNHRSHLRGCRILRAGDHPRPRGDRLRL  
ARHGPHVGGGLPTLFTACGRPGPGCHRHAPGRFIWLSGAATPGMGMFSGCAGKWAPGDTTS
```

B.-

>6B cdomain

```
AATCTGCAATGCNNNAGGAACCTNACCCTCNACATAAATGTGGACTAGTCCTGCAGTGTTTT  
AAACTGAATTCTGCCCTTATACG
```

Figura 47: Análise do provável gene de glicosiltransferase (GTr) de *Streptomyces olindensis*, através do programa SEARCHGTr. **A.-** Apresenta-se a seqüência de aminoácidos da provável glycosyltransferase contendo 245 aminoácidos. **B.-** Seqüência de nucleotídeos do provável domínio de glicosiltransferases (<http://www.nii.res.in/searchgtr.html>).

Na figura 48 apresentam-se os resultados das comparações obtidas através do programa SEARCHGTr, da seqüência do provável GTr (C6B3) com as outras glicosiltransferases envolvidas na produção de antibióticos. O programa também mostra os doadores e receptores específicos para cada antibiótico denotado, como a daunomicina e a doxorubicina.

GTr	DBR	DBR Score	View Alignment	Donor	Acceptor	Antibiotic
B_daunosamine_daunoru	MDANFGSLLHGTTGC-AG-AN	-33	* N&W * BLAST	daunosamine	E-rhodomycone	Daunorubicin
B_daunosamine_daunomy	ARSYLGTFLHGTTGC-AG-AN	-36	* N&W * BLAST	daunosamine	E-rhodomycone	Daunomycin

Daunomycin has the following 1 Glycosyltransferase (GTr) associated with it:-

[B_daunosamine_daunomy](#) transfers daunosamine to E-rhodomycone. [Details](#)

Align "C6B3" with

[B_daunosamine_daunomy](#) by [N&W Global align](#) alignment program [Get Alignment](#)

[Choose another Antibiotic](#)

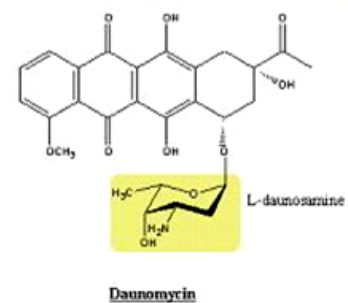


Figure 48: Análise comparativa da seqüência do provável gene de glicosiltransferase (GTr) no programa SEARCHGTr, através do N&W e BLAST com os GTrs envolvidos na produção de antibióticos, e os resíduos que se ligariam aos possíveis doadores específicos para cada antibiótico (daunomicina e daunorubicina).

Posteriormente, foi alinhada a seqüência de aminoácidos do provável GTr (C6B3) com a seqüência de aminoácidos da glicosiltransferase envolvida na produção do antibiótico daunorubicina (Figura 49).

B_daunosamine	1	MRVLFATMAARSHVYAQVTLASALRTAGHEVLVASQPDVLDIVRAGLTR	50
C6B3	1		0
B_daunosamine	51	VRIGEDLNIEEETREANASFEDDRNLGGLAMSNTRDDPLPWHALGMFTA	100
C6B3	1		0
B_daunosamine	101	MTAMVFQNVCPPEMVDDLVGLARDWRPDLVVDPLTLAGPVAARLSGAAH	150
C6B3	1		0
B_daunosamine	151	ARLLFGPDQMGRNRTAFRALLDRQRPSCVTTRCAEWLWTWLERWRRQRLD	200
C6B3	1		0
B_daunosamine	201	MSEELVLGQWTIDPTPPSMRIPLDLPC--VPVRYVPYNGPSLLPDW----	244
C6B3	1	: :.. VRI-TSLKCDSCSVTNSPXQSVVTIFSWPWLD	31
B_daunosamine	245	--LREPPR-HPRRLCLTLGVSLGEATGAGTV-----AASDVLA	280
C6B3	32 :. : YSAGERGRGRRAHLT-GIRL-----SGTARQLSPPCVPAQCHSGVNVL	75
B_daunosamine	281	VDGLDVEVVATLSRNCQEL-----GTLPANVRAVDFVRLN	315
C6B3	76	.. :: :.. : RSGMDVNV--TLRARCWSVCGMRAVHVGLKSVSGGVLACHVPEPNSNRLS	123
B_daunosamine	316	ALLPSCSGIIHHGGSGTFMTALAHATPQLIVPDMMDAMEKAHGLARSGA	365
C6B3	124	. . ::.. : GL----RGV----DDGELRTRYAQA-PPLTWPDVVTD-----RAG-	154
B_daunosamine	366	GGYVDAKDVSPELLRERVLDFDDPSYAAGARRVRAEIVGTPSPNDIVPV	415
C6B3	155:. -----SRDARNHR-----SHLRGCRILRAG--DHPRPRG----	181
B_daunosamine	416	LERLT----AEHQAGGPERSPALKSPSTGGA	442
C6B3	182	: -DRLRLARHGPHVGGPLPTLFTACGRPGPGCHRHAPGRFIWLSGAATPGMG	230
B_daunosamine	443		442
C6B3	231	MFSGCAGKWAPGDTS	245

Figura 49: Análise comparativa entre as seqüências de aminoácidos da provável GTr (C6B3) e a glicosiltransferase da Daunorubicina. O alinhamento foi realizado através do programa SEARCHGTr.

Finalmente, para considerar que se tratava de um novo gene que codifica uma glicosiltransferase, realizou-se um alinhamento através do programa “MULTALIN multiple alignment - NPS@: Network Protein Sequence Analysis” com a provável GTr (C6B3) e as glicosiltransferases *cosK* e *cosG* já descrita em *Streptomyces olindensis* por Garrido *et al.*, (2006) (Figura 50). Denotando-se que a

seqüência de C6B3 não correspondia a nenhuma das já descritas anteriormente e que provavelmente corresponderia a uma nova glicosiltransferase.

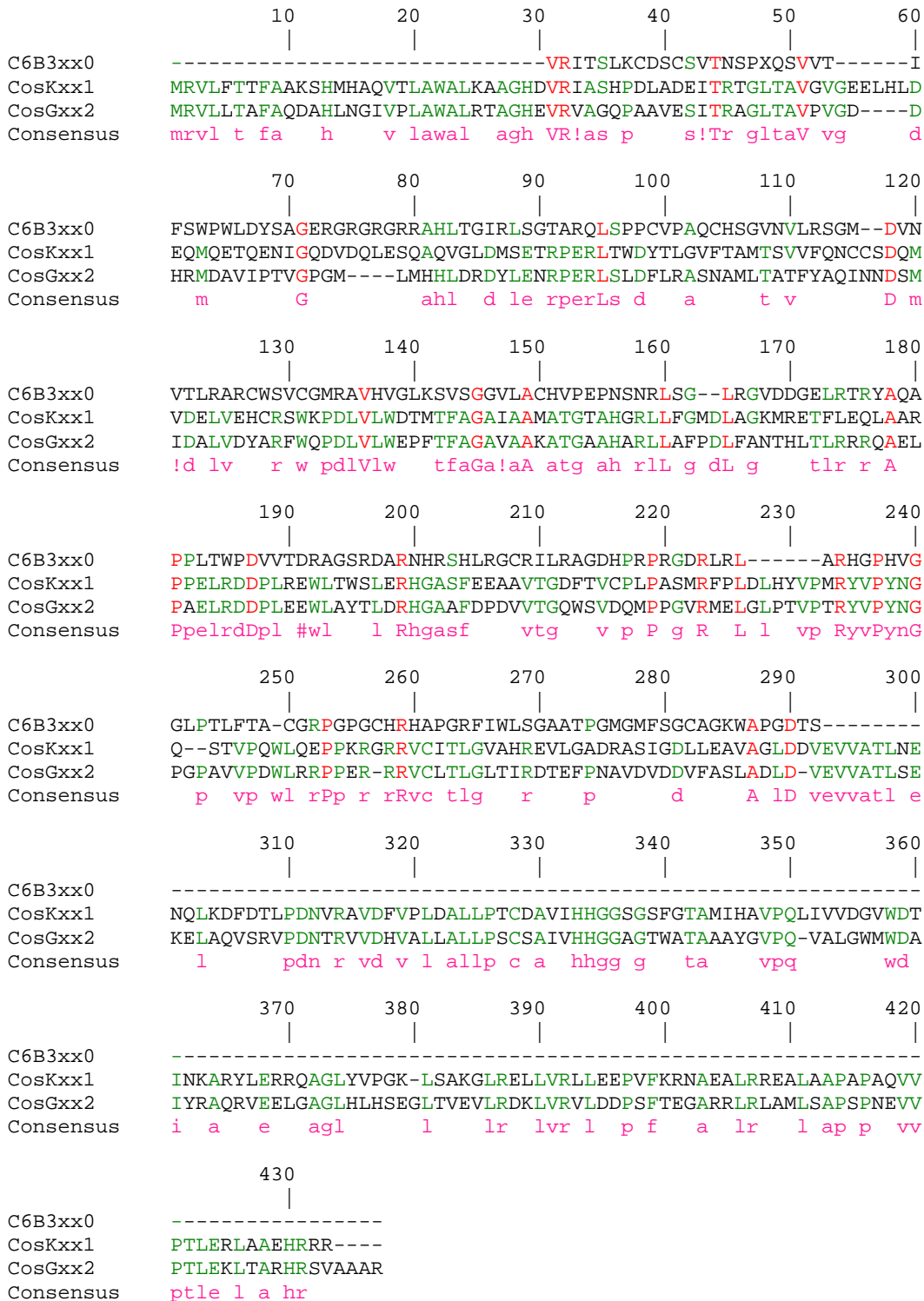


Figura 50: Análise comparativa entre as seqüências de aminoácidos da provável GT_r (C6B3) e as glicosiltransferases *cosK* e *cosG* já descritas em *Streptomyces olindensis*. O alinhamento foi realizado através do programa “MULTALIN multiple alignment - NPS@: Network Protein Sequence Analysis” (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>).

6. DISCUSSÃO

Os microrganismos são os principais produtores de moléculas com aplicação farmacêutica (Labeda, 1990). A atividade biológica dos produtos sintetizados por microrganismos é bastante distinta e inclui compostos com atividade: antibiótica, anti-câncer, agentes imunossupressores, enzimas, herbicidas, antiparasitários, inseticidas, entre outros (Rondon *et al.*, 1999).

Com o advento das novas drogas produzidas por bactérias pertencentes à família dos actinomicetos, foram desenvolvidas diversas técnicas de manipulação genética para a caracterização e produção de novos compostos importantes para indústria farmacêutica. A elucidação de vias biossintéticas de compostos com interesse clínico e com importância econômica, ainda tem sido pouco explorada neste país, apesar dos muitos avanços que já se tem encontrado internacionalmente. Um grande esforço tem sido realizado no estudo de compostos pertencentes à classe das antraciclinas sendo o gênero *Streptomyces* o maior produtor destes. A síntese destes compostos é realizada por um conjunto de enzimas chamadas policetídeo sintases (polyketide synthases ou PKSs). Estas enzimas correspondem a um complexo multienzimático que contém um grupo coordenado de sítios ativos.

As antraciclinas têm sido estudadas intensamente devido à importância destas como agentes anti-cancerígenos, existindo uma relação direta entre a atividade antibiótica e atividade antitumoral. O desejo de compreender melhor os processos envolvendo a repressão e a indução da produção de compostos bioativos estimulou a pesquisa sobre a regulação metabólica em microrganismos produtores de antibióticos. Neste trabalho, foi investigada a produção de cosmomicina, um complexo antitumoral da classe das antraciclinas, produzido por *Streptomyces olindensis*.

A partir do seqüenciamento parcial do agrupamento de genes relacionado à biossíntese da cosmomicina desenvolvida por nosso laboratório, foi identificada a

presença de 13 genes, no qual dois deles já foram caracterizados e identificados como glicosiltransferases, *cosK* e *cosG*, cujos produtos gênicos estão encarregados da adição de açúcares à molécula aglicona. Também foi identificada a presença de alguns genes ainda não caracterizados, como os genes *cosY* e *cosS*, este último com provável função de regulador transcricional.

Com a finalidade de compreender a provável função destes genes no processo de produção do antibiótico foi planejado o estudo transcricional destes genes durante a produção de cosmomicina.

6.1. Análises bioinformáticas dos genes *cosS* e *cosY*

Neste trabalho, confirmamos através de análises bioinformáticas as anotações dos genes *cosS* e *cosY* realizada por Garrido em 2006.

O gene *cosS*, de 561pb, possui similaridade com reguladores transcricionais descritos em *S. avermitilis*, *S. coelicolor* e com o gene *acIS* descrito como uma proteína hipotética reguladora em *S. galileus*, tal como foi apresentado na Figura 17; além de ter homologia com os domínios COG1695 e PadR, com similaridade de aproximadamente 64% (120 aa) e 37% (70 aa), respectivamente, com a proteína CosS. Estes domínios pertencem às famílias consideradas como reguladores transcricionais.

Segundo os trabalhos realizados por Gury e colaboradores (2004) em *Lactobacillus plantarum*, o domínio PadR é considerado como um regulador transcricional da família “PadR-like” (Pfam PF03551), envolvido na regulação negativa do metabolismo dos ácidos fenólicos. Nesse trabalho, foi verificado que a deleção do gene *padR* induziu a super-expressão de outro regulador transcricional PadA. Baseando-se nestas informações poderíamos atribuir ao CosS um papel de regulador negativo na expressão de genes envolvidos na biosíntese da cosmomicina.

A proteína CosS (187 aa) possui um tamanho pequeno quando comparada com outras proteínas reguladoras de *Streptomyces* (Boos e Shuman, 1998), como por exemplo, as proteínas da família SARPs variam entre 277 até 665 aa, e da família LuxR (LAL), caracterizada pelo seu tamanho entre 872 e 1159 aa. Devido ao baixo número de aminoácidos presentes na proteína CosS, pode ser que exista uma

outra proteína que complemente sua função ou atue concomitantemente. Estudos posteriores sob a função do gene poderão confirmar esta hipótese.

O outro gene analisado é o *cosY* que apesar de ter a função desconhecida e ter uma baixa similaridade quando comparado com proteínas do banco de dados do NCBI no programa BlastX, apresenta homologia com a enzima ornitina ciclodeaminase (Ocd). Esta proteína tem a função de converter L-ornitina a L-prolina com a liberação de uma amônia que poderia participar na síntese de açúcares como a rodosamina. A presença desta proteína ainda não foi descrita nas vias biossintéticas dos policetídeos, porém já foi relatada na via biossintética dos polipeptídeos não ribossomais (NRPS) no seqüenciamento do genoma de *S. avermitilis* (Omura *et.al.*, 2001), e também foi descrita por Thomas e colaboradores (2003) no antibiótico viomicina, produzido por *Streptomyces* sp. ATCC 11861. A função da enzima VioK (homóloga a Ocd) consiste na liberação de uma amônia para a conversão de L-serina em L-2,3-diaminopropionato. Este antibiótico também pertence à via biossintética dos NRPS.

Apesar de não ter encontrado similaridades com outros genes, *cosY* apresenta os padrões característicos do gênero *Streptomyces*; com um alto conteúdo G+C na terceira posição dos códons, além de estar presente no “cluster” biossintético da cosmomicina ao lado de um gene hipotético regulador.

6.2. Produção do antibiótico cosmomicina e análise transcricional de genes durante a ativação da via biossintética

Uma variedade de condições estressantes no meio ambiente pode contribuir para produção de metabólitos secundários como: temperatura, pH, radiação e concentração de oxigênio, entre outras. Durante o processo de adaptação, devido à falta de nutriente no meio ocorre a produção de metabólitos e conseqüentemente acúmulos de intermediários metabólicos (precursores) que induzem a produção de drogas. Os precursores em excesso podem ser excretados para o meio ou convertidos em produtos que são metabolizados.

Para compreender o mecanismo no qual fatores externos regulam a produção do antibiótico no nível transcricional é preciso avaliar o comportamento transcricional de genes envolvidos na via biossintética nas mudanças do meio de cultura durante a produção do antibiótico.

No trabalho realizado por Jones em 1985, mostrou-se como o gene PHS (phenoxazinone synthase) envolvido na biossíntese do antibiótico actinomicina produzido pelo *S. antibioticus* é influenciado pela concentração de glicose presente no meio de cultura. Assim mesmo, Inoue e colaboradores em 2007, mostraram que em altas concentrações de glicose no meio de cultura a biossíntese do antibiótico cosmomicina é reprimida.

Existe uma direta conexão entre a repressão pela fonte de carbono, ativação de biossíntese de antibióticos e desenvolvimento morfogenético (Ni & Westpheling, 1997). A regulação da utilização de carbono tem um papel importante nos mais variados processos da biologia de *Streptomyces*. Em resposta à limitação nutricional de fontes de carbono em *S. coelicolor*, inicia-se o processo de morfogênese e são produzidos diversos metabólitos secundários, incluindo quatro antibióticos diferentes. A produção de metabólitos secundários é prejudicada pela concentração de carbono. Em *S. olindensis*, concentrações elevadas de glicose no meio de cultura reprimem a biossíntese do antibiótico retamicina, também conhecido como cosmomicina (Inoue *et al.*, 2007).

A produção de antibióticos é também influenciada pela glicose, nitrogênio e fosfato (Keiser *et al.*, 2000). Estudos realizados por Ni & Westpheling em 1997 demonstraram que a limitação da fonte de carbono em *S. coelicolor* inicia o processo de produção de antibióticos. No trabalho realizado por Martins & Soto-Maior (2003), observou-se um aumento da atividade antibiótica intra e extracelular nas condições de limitação nutricional. Posteriormente, foi observada uma perda contínua da atividade antibiótica após a exaustão de glicose do meio. Estes resultados mostraram que o nível de glicose e nitrogênio no meio de cultura devem ser, preferencialmente, substratos limitantes do processo.

A progressiva limitação de carbono traz dramáticas mudanças globais na expressão gênica, milhares de genes que participam em outros processos celulares e outros genes com função desconhecida, mostram mudanças significativas durante a contínua limitação de carbono (Gasch *et al.*, 2000). Muitas das alterações específicas na expressão podem acontecer devido a esta contínua limitação de carbono, que leva à queda do crescimento ativo, em contraste com a resposta de outras células, que insistem em retomar o crescimento após se adaptar às novas condições.

Neste trabalho, durante a produção da cosmomicina foi avaliado o consumo de glicose, para compreender a influência da concentração de glicose no meio de produção do antibiótico. Os resultados corroboram com a literatura, pois foi observado que em concentrações limitantes de glicose houve um aumento da atividade antibacteriana. Este aumento da atividade da cosmomicina foi verificado nos experimentos de atividade antimicrobiana devido ao aumento do diâmetro do halo de inibição. Neste sentido, existe uma relação direta entre a atividade antibacteriana e a concentração do antibiótico.

Com relação à produção do antibiótico, observa-se que a bactéria não produz cosmomicina na ausência de sais. Além disso, foi demonstrado que os genes *cosS*, *cosY*, *cosG*, *cosK* e *KS* envolvidos na biossíntese da cosmomicina estão induzidos quando há a produção do antibiótico pela presença de sais. A produção do antibiótico nas culturas de *S. olindensis* em meio R5M foi avaliada por espectro de absorção apresentando dois picos de absorbância numa faixa de 450 a 650 nm, e o antibiótico obtido foi confirmado por HPLC com espectrofotometria de massa, dados que corroboram os resultados obtidos por Furlan em 2002 e Garrido em 2005.

A identificação das variações na transcrição dos genes envolvidos na via biossintética da cosmomicina durante a produção do antibiótico pode mostrar que a expressão dos genes envolvidos na via biossintética é iniciada antes da presença do antibiótico no meio de cultura ser detectada. Estes resultados são demonstrados através dos resultados das análises de RT-PCR e da atividade antibacteriana contra a bactéria *Bacillus subtilis*.

No antibiograma, o halo de inibição foi observado após 24 horas do início do experimento, enquanto que no espectro de absorção foi detectada a cosmomicina somente às 36 horas. Esta diferença no tempo de detecção da cosmomicina e da atividade antibacteriana pode ser devido à diferença entre a concentração mínima necessária para ter atividade antibacteriana e a concentração mínima necessária para a detecção do antibiótico no espectro de absorção.

Baseando-se nas informações que atribuem à proteína CosS um papel de regulador transcricional, e nos resultados obtidos da expressão do gene *cosS* através da cinética de expressão na produção do antibiótico, na qual observou-se o aumento da expressão do gene *cosS* com relação à produção da cosmomicina, podemos deduzir que se trata de um regulador positivo e não de um regulador

negativo como foi atribuído anteriormente com referência aos trabalhos realizados por Gury e colaboradores em 2004.

Com relação à cinética de expressão do gene *cosG* pode-se observar o aumento da sua expressão (indução) após 12 horas de cultivo provavelmente porque esta é a proteína encarregada de transferir a rodosamina que é o primeiro açúcar a ser adicionado à aglicona. De forma diferente do que foi observado com a cinética de expressão do gene *cosK*, para o qual observou-se o aumento da expressão (indução) após 20 horas, provavelmente porque *CosK* é a glicosiltransferase responsável pela adição da L-desoxifucose, que é o segundo açúcar da cadeia trissacarídica da cosmomicina.

A produção do antibiótico em *Streptomyces* depende geralmente da fase de crescimento iniciando sua produção na fase estacionária. No meio sólido, coincide com a diferenciação morfológica. O início da biossíntese do antibiótico é determinada e influenciada por muitos fatores ambientais e fisiológicos, incluindo taxa de crescimento, sinalização de γ -butirolactonas (*quorum sensing*), desbalanços metabólicos e vários estresses fisiológicos. Em geral, os micélios da bactéria começam a se empilhar aumentando sua densidade, ocorrendo novas mudanças, essas alterações podem ser como resposta à limitação nutricional ou estresse fisiológico (Ochi, 1986; Takano & Bibb, 1994; Chakraborty *et al.*, 1997).

Como resposta às diversas condições de estresse, encontra-se altamente induzida uma família de proteínas nomeadas HSP (proteínas de choque térmico). Assim mesmo, os desbalanços nutricionais ativam os processos de resposta às mudanças na expressão gênica associados à regulação destas proteínas de choque térmico (Grandvalet *et al.*, 1998). As proteínas HSP são chaperonas, ou chaperoninas, cuja função principal está na resposta ao estresse e no re-novelar das proteínas desnaturadas. Alguns dos membros desta família tem a capacidade de desagregar os aglomerados de proteínas desnaturadas, que uma vez livres podem então ser re-naturadas pela ação da HSP70 e HSP40 (*DnaJ*) (Gaustschi *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2001; Schffol *et al.*, 1998). Durante a produção do antibiótico cosmomicina, avaliou-se o comportamento transcricional de dois membros da família de HSP, os genes *hsp18* e *dnaJ*, e como esperado, a resposta à limitação nutricional e/ou estresse fisiológico, encontraram-se estes genes induzidos durante o período de produção do antibiótico, apresentando uma maior indução o gene *dnaJ* em comparação ao gene *hsp18*. Cabe ressaltar que a contínua limitação de nutrientes

também envolve mudanças em vários parâmetros ambientais ao longo do tempo, como a densidade celular, pH e esgotamento dos diversos nutrientes, fato que contribuem para resposta às mudanças na expressão gênica.

6.3. Triagem de prováveis novas enzimas glicosiltransferases

Os microrganismos, principalmente os actinomicetos produzem uma alta variedade de compostos glicosilados como antibióticos e antitumorais (Pérez *et al.*, 2006). Atualmente, vários grupos de pesquisa estão trabalhando para compreender melhor o funcionamento destas proteínas, (Prof. Dr. José Salas - Universidade de Oviedo). Estes grupos desenvolvem trabalhos modificando os padrões de glicosilação de diferentes compostos bioativos usando a técnica conhecida como biossíntese combinatória, e/ou construindo mutantes com o intuito de produzir moléculas com um padrão de glicosilação alterado. As principais moléculas de compostos bioativos glicosilados são os desoxiaçúcares, importantes carboidratos presentes na maioria dos compostos antitumorais que estão associados à atividade da molécula. Em termos gerais, existe uma glicosiltransferase no agrupamento gênico para cada açúcar adicionado à molécula, entretanto, em alguns casos como na mitramicina (Fernandes *et al.*, 1998 e Branco *et al.*, 2000) e na cromomicina (Menedez *et al.*, 2004) existem apenas 4 glicosiltransferases descritas para 5 açúcares presentes nas moléculas. Utilizando-se um exemplo mais próximo da cosmomicina, verificamos que a aclacinomicina possui 3 açúcares e somente 2 glicosiltransferases presentes em seu agrupamento gênico (Raty *et al.*, 2002).

Além dos genes *cosS* e *cosY* também estudamos a presença de outros genes que codificam para as enzimas glicosiltransferases em *S. olindensis*. Segundo os estudos realizados por Garrido *et al.* (2006), levantou-se a hipótese da presença de mais duas glicosiltransferases, além daquelas codificadas por *cosK* e *cosG* que participariam na adição dos açúcares na aglicona. A adição dos primeiros açúcares poderia ser realizada pela enzima CosG e os seguintes pela CosK. O segundo açúcar das cadeias trissacarídicas apresenta uma flexibilidade natural, sendo que este pode ser tanto uma L-rodinose quanto uma L-2-desoxi-fucose. Para a síntese de cosmomicina, o número mínimo de glicosiltransferases envolvidas na biossíntese deve ser 3 e no máximo 4. A triagem das possíveis glicosiltransferases foi realizada pela amplificação de fragmentos com tamanho aproximado de 1,1 kb utilizando

primers degenerados para as regiões conservadas dos genes mencionados. Análises de bioinformática foram realizadas através do programa SEARCHGTr, que através dos programas N&W e BLAST realizam uma comparação das seqüências traduzidas nas 6 possíveis fases de leitura. Utilizando uma base não-redundante de seqüências de proteínas GTrs homólogas de banco de dados GENBANK, SWISS-PROT, CAZY, PDB, PDBSum e PUBMED. Com estas ferramentas de análise de dados foi verificada a presença de um domínio específico de glicosiltransferases e que apresentaria resíduos que se ligariam a possíveis doadores específicos para o antibiótico. A seqüência gênica por ter sido obtida a partir de oligonucleotídeos degenerados poderia ter amplificado outras glicosiltransferases diferentes dos genes *cosK* e *cosG* (Garrido *et al.*, 2006), mas as comparações realizadas entre as três seqüências, demonstraram que a nova e provável glicosiltransferase não corresponde a nenhuma das já descritas. Através destes dados, pode-se considerar que se trata de um novo gene que codifica uma nova glicosiltransferase.

Os protocolos de seqüenciamento e PCR padrão, sugeridos pelos fabricantes resultaram inapropriados para obter-se uma seqüência do DNA de boa qualidade e ampliações de PCR em *Streptomyces*, principalmente devido ao alto grau de nucleotídeos G+C nesta espécie. Por estes motivos, otimizações tiveram que ser realizadas, entre elas a adição de DMSO à reação na concentração final de 5%, como também a adição de um passo de desnaturação inicial e o aumento no tempo de anelamento, contribuíram para uma melhor leitura e maior reprodutibilidade dos resultados. O DMSO é utilizado como co-solvente e atua como redutor da T_m (temperatura de fusão) do iniciador (Chester, 1993), além de minimizar as pontes de hidrogênio e evitar a formação de estruturas secundárias (Adams *et al.*, 1999).

6.4. Construção de cassetes de interrupção dos genes *cosS* e *cosY*

Este trabalho deu continuidade ao trabalho de Garrido (2005) tentando caracterizar dois genes (*cosS* e *cosY*), descritos como associados à via biossintética do antibiótico antitumoral cosmomicina. Um trabalho prévio com a descrição dos genes biossintéticos da cosmomicina e a caracterização dos genes das glicosiltransferases (*cosG* e *cosK*), responsáveis pela adição de açúcares na aglicona, foi a base do presente estudo.

Nesta parte do trabalho, descrevemos a construção de dois cassetes de interrupção para os genes *cosS* e *cosY* específicos de *S. olindenses* visando a

futura obtenção de mutantes nulos nos quais estes genes estariam bloqueados. O uso destes mutantes seria fundamental na tarefa de desvendar a função específica das proteínas codificadas por esses genes na via biossintética da cosmomicina.

Nas subclonagens realizadas para os genes *cosS* e *cosY*, observou-se uma baixa porcentagem de clones tanto quando foi utilizado o vetor pBS quanto com o vetor pBC. Por isso, foi necessário fazer uma triagem de 250 clones por hibridação (“colony-blot”) para se obter o clone pBS5G. Nesta etapa, se encontrou problemas na hibridização. Visando solucionar os falsos-positivos observados na hibridização por “colony-blot”, optou-se por fazer lavagens das colônias fixadas nas membranas de nylon com algodão embebido em TE, com o intuito de retirar os restos celulares que pudessem estar atrapalhando ou interferindo na obtenção dos clones positivos (Garrido, comunicação pessoal).

Com o intuito de se obter um mutante bloqueado para o gene *cosY*, algumas alterações e modificações foram feitas no protocolo convencionalmente utilizado, pois ainda não se obteve o mutante esperado do gene *cosY*. A estratégia de utilizar o antibiótico tioestrepton para a seleção do mutante Δ *cosY*, foi para auxiliar na seleção dos mutantes, pois a marca de seleção do plasmídeo pHZ1358 é o antibiótico tioestrepton. Provavelmente, um dos motivos porque ainda não se tenha encontrado o mutante seria que a recombinação dupla não está acontecendo, possivelmente pela instabilidade do plasmídeo conjugativo. Um outro motivo para não acontecer recombinação poderia ser devido ao vetor pHZ1358 ser um plasmídeo suicida, e neste caso não teria tempo suficiente para acontecer à recombinação. Com este intuito foram realizados vários tempos de “flooding” variando entre 18-26 horas.

A transformação por conjugação é a forma de transferência genética mais comumente utilizada entre *E.coli* e *Streptomyces* (Mazodier, Petter e Thompson 1989). Neste trabalho, foi utilizada uma cepa de *E. coli* defectiva na metilação (ET12567/pUB307) e um vetor de conjugação específico para esta transferência (pHZ1358). Este vetor é um plasmídeo de *Streptomyces* com múltiplo número de cópias e contém um sítio de *sti+* do vetor pJI101, é por causa deste sítio de replicação instável que os plasmídeos são rapidamente perdidos em ausência do antibiótico de seleção (Deng e Bai, 2006). Esta característica de instabilidade leva a perda do plasmídeo, às vezes antes de ter acontecido à recombinação homóloga. Por este motivo, o tempo para a adição dos antibióticos apramicina e ácido nalidíxico

de 24 h foi diminuído para 18 horas (Paranthaman e Dharmalingam, 2003; Garrido, 2005) para evitar a perda do plasmídeo e favorecer só o crescimento das colônias que tenham o gene da apramicina. Outros trabalhos sob conjugação, também adicionaram o antibiótico de seleção por “flooding” entre 18-20h depois de realizada a conjugação (Ryding *et al.*, 1999).

O plasmídeo pHZ1358 tem como marca de resistência o tioestrepton (Sun, *et al.*, 2002). Desta forma, foi realizado o “flooding” com este antibiótico depois de 7 horas da conjugação, mas não se obtiveram resultados positivos, provavelmente porque o tempo foi muito curto para ter acontecido a transferência genética. Outra alternativa utilizada para a realização da conjugação foi usar o micélio de *S. olindensis* como cepa receptora, devido à dificuldade de produzir esporos. Nos estudos realizados por Ryding e colaboradores (1999) em cepas mutantes de *S. coelicolor*, utilizou-se como suplemento 10 mM de MgCl₂ no meio de cultura, provavelmente usado para permeabilizar a membrana celular do micélio e facilitar a transferência genética, já que quando utilizado o micélio como célula receptora, não é necessário dar o choque térmico.

Para realizar a recombinação homóloga é necessário que ocorra a troca alélica entre o vetor (com o inserto de interesse) e o cromossomo. Esta recombinação é de baixa frequência e depende do comprimento do DNA homólogo e do tamanho do inserto do pHZ1358 (Flett, 1997).

O lento crescimento da cepa ET12567/pUB307 também foi observado por Flett e colaboradores (1997), por esse motivo a incubação das culturas foi entre 20-24 horas.

Com este trabalho estamos abrindo novas portas de estudo da via biossintética para a caracterização dos genes mediante o perfil transcricional, através da análise da cinética de expressão e visando confirmá-la com a construção de mutantes nulos. Espera-se que outros trabalhos dêem continuidade a estes estudos.

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram abertos novos horizontes com relação aos estudos de análise transcricional em *Streptomyces olindensis*, conseguindo-se avaliar o perfil transcricional de genes presentes na via biossintética da cosmomicina.

As análises bioinformáticas das seqüências dos genes *cosS* e *cosY* confirmaram a anotação destes genes e através de técnicas moleculares foram construídos cassetes de interrupção destes genes.

Pode-se concluir que os genes *coS*, *cosY*, *cosG*, *cosK* e *ks* presentes na via biossintética da cosmomicina estão ativos durante a produção do antibiótico.

Pelos resultados obtidos do perfil transcricional do gene *cosY* e *cosK* pode-se concluir que eles estão agindo exclusivamente durante a produção do antibiótico.

O gene *cosS* que codifica um possível regulador transcricional encontra-se induzido na presença e ausência da produção do antibiótico, resultados que poderiam estar evidenciando a participação do produto deste gene em outros processos biológicos além da biossíntese do antibiótico. Partindo da hipótese dos dados bibliográficos sobre a possível função reguladora deste gene, e os resultados do aumento na sua expressão com relação ao tempo de produção do antibiótico, conclui-se que ele poderia ser um regulador positivo.

Através da técnica de RT-PCR foram demonstrados que os genes *dnaJ* e *hsp18* estão sendo induzidos durante a produção da cosmomicina, e eles poderiam estar cumprindo um papel importante na adaptação às diferentes mudanças adversas durante a produção do antibiótico.

Na comparação entre a concentração de glicose e a atividade biológica, observou-se que a queda de glicose durante a produção da cosmomicina está inversamente relacionada à atividade antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, pois quando há limitação de glicose o antibiótico é produzido em maior quantidade.

Através do seqüenciamento e análises bioinformáticas foi determinada a existência de uma nova possível glicosiltransferase que poderia estar agindo durante a produção do antibiótico.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de terem sido atingidos os objetivos para este trabalho, novos estudos deverão ser realizados para completar a caracterização dos genes *cosS* e *cosY* e para atingi-los devem ser realizados os seguintes objetivos específicos:

- Deverão ser testadas outras cepas conjugativas de *E.coli* e outros vetores conjugativos para a obtenção do mutante nulo.
- Para concluir que a possível nova glicosiltransferase esta agindo durante a produção do antibiótico, se deverá fazer a interrupção deste gene e analisar a produção do antibiótico.
- O experimento do RT-PCR deverá ser realizado com pontos desde o pré-inóculo até a produção do antibiótico, para observar se os genes encontram-se ativos

9. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, P.S.; Dolejsi, M.K.; Grills, G.; McMinimy, D.; Morrison, M.; Rush, J.; Goff, S.; Milnamow, M.; Morgan, A.; Karlovitz, M.A.; Dial, C.E.; Hardin, S.H. 1999. An Analysis Of Techniques Used To Improve The Accuracy Of Automated DNA Sequencing Of A GC-rich Template: Results From The 2nd ABRF DNA Sequence Research Group Study. *J Biomol Techniques*. 9:4, [about 14 p.] Available from: www.abrf.org/jbt/1998/december98/dec98adams_a.html [2001 Jun 07].
2. Aguirrezabalaga, I.; Olano, C.; Allende, N.; Rodriguez, L.; Brana, A.F.; Mendez, C.; Salas, J.A. 2000. Identification and expression of genes involved in biosynthesis of L-oleandrose and its intermediate L-olivose in the oleandomycin producer *Streptomyces antibioticus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:5, 1266-1275.
3. Alam, S.; Wang, S.C.; Ruzicka, F.J.; Frey, P.A. e Wedekinda, J.E. 2004. Crystallization and X-ray diffraction analysis of ornithine cyclodeaminase from *Pseudomonas putida*. *Acta Cryst. D*60, 941-944.
4. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-10.
5. Antón, N.; Mendes, M.V.; Martín, J.F.; Aparicio, J.F. 2004. Identification of PimR as a Positive Regulator of Pimaricin Biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J. Bacteriol.*; 186:9, 2567–2575.
6. Aparicio, J. F.; I. Molnar, T. Schwecke, A. König, S. F. Haydock, L. E. Khaw, J. Staunton, and P. F. Leadlay. 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169:9–16.
7. Barnstable. C.J. 1993. Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 520–525.

8. Bate, N.; G. Stratigopoulos, and E. Cundliffe. 2002. Differential roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 43:449–458.
9. 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.; Rabinowitsch, 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. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417:6885, 141-147.
10. Berdy, J. 1995. "Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites?". *Proceedings of the 9th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Part 1.* Allerton Press, New York: 3-23.
11. Bibb, M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142:1335–1344.
12. Bisang, C.; Long, P.F.; Cortes, J.; Westcott, J.; Crosby, J.; Matharu, A.L.; Cox, R.J.; Simpson, T.J.; Staunton, J.; Leadlay, P.F. 1999. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature.* 401:6752, 502-505.
13. Blanco, G.; Patallo, E.P.; Brana, A.F.; Trefzer, A.; Bechthold, A.; Rohr, J.; Mendez, C.; Salas, J.A. 2001. Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin. *Chem. Biol.* 8:3, 253-63.
14. Boos, W.; Shuman, H. 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 204–229.
15. Brown, D.P.; Chiang, S.J.D. 1988. "Site-specific integration in *Saccharopolyspora erythraea* and multisite integration in *Streptomyces lividans* of actinomycete plasmid pSE101." *J. Bacteriol.* 170: 2287-2295.

16. Chakraborty, R.; Bibb, M. 1997. The ppGpp synthase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.*; 179, 5854-5861.
17. Champness, W. C.; Chater, K. F. 1994. Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp.; p. 61–93. In P. Piggot, C. P. Moran, and P. Youngman (ed.), *Regulation of bacterial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
18. Chater, K. F.; and M. Bibb. 1997. Regulation of bacterial antibiotic production, p. 59–105. In H. Kleinkauf and H. von Doëren (ed.), *Biotechnology*, vol. 7. *Products of secondary metabolism*. VCH, Weinheim, Germany.
19. Chater, K.F.; Bruton, C.J. 1985. Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. *EMBO J.* 4:7, 1893-1897.
20. Chester, N.; Marshak, D.R. 1993. Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 209:2, 284-90.
21. Chung, J.Y.; Fujii, I.; Harada, S.; Sankawa, U.; Ebizuka, Y. 2002. Expression, purification, and characterization of AknX anthrone oxygenase, which is involved in aklavinone biosynthesis in *Streptomyces galilaeus*. *J Bacteriol.* 184:22, 6115-6122.
22. Combes, P.; Till, R.; Bee, S.; Smith, M.C.M. 2002. "The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the (phi) C31-encoded site-specific recombination system." *J. Bacteriol.* 184:20, 5746-5752.
23. Cortés, J.; Haydock, S.F.; Roberts, G.A.; Bevitt, D.J.; Leadlay, P.F. 1990. "An unusually large multifunctional polypeptide in erythromycin-producing polyketide synthase in *Saccharopolyspora erythraea*." *Nature.* 348:6297, 176-178.
24. De Schrijver, A.; and R. De Mot. 1999. A subfamily of MalT-related ATPdependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* 145:1287–1288.
25. Demain, A. L. 1989. *Functions of secondary metabolites*. Em: *Genetic and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*. Editor: Hershberger C.L.,

- Queener S.W., Hegeman G. editora: American Society for Microbiology, Washington, DC, 1-11.
26. Demain, A. L. 1992. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. CIBA Found. Symp. 171:3–16.
 27. Demain, A. L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 52: 455-463.
 28. Deng, Z.; Bai, L. 2006. Antibiotic biosynthetic pathways and pathways engineering-a growing research field in China. Nat. Prtod. Rep. 23, 811-827.
 29. Donadio, S.; Staver, M. J.; McAlpine, J. B.; Swanson, S. J.; Katz, L.1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. Science 252:675–679.
 30. Endo, A.; Hamusami, K. 1992. HMG-CoA Redutase Inhibitors. Natural product Reports. 541-549.
 31. Fernandez, E.; Weissbach, U.; Sanchez, R.C.; Brana, A.F.; Mendez, C.; Rohr, J.; Salas, J.A. 1998. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. J Bacteriol. 180:18, 4929-4937.
 32. Fernández-Moreno, M.A.; Martínez, E.; Boto, L.; Hopwood, D.A.; Malpartida, F. 1992. Nucleotide sequence and deduced functions of a set of co-transcribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. J. Biol. Chem. 267: 19278-19290.
 33. Flett, F.; Mersinias, V.; Smith, C.P. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. FEMS Microbiology Letters. 155:223-229.
 34. Furlan, R.; Watt, S.J.; Garrido, L.; Amarante-Mendes GP, Nur-e-Alam M, Rohr J, Braña A, Mendez C, Salas JA, Sheil MM, Beck JL, Padilla G (2004) DNA-Binding properties of Cosmomycin D, an anthracycline with two trisaccharide chains. J Antibiot 57:647–654.
 35. Furlan, R.L.A. 1997. Obtenção e estudos de mutantes com produção alterada do antibiótico retamicina sintetizado por *Streptomyces olindensis*

- DAUFRE 5622. São Paulo. Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas/Depto. Microbiologia da Universidade de São Paulo.
36. Furlan, R.L.A. 2002. O antitumoral retamicina: Produção e efeitos biológicos. São Paulo. Tese de Doutorado apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas/Depto. Microbiologia da Universidade de São Paulo.
 37. Galperin, M.Y. 2006. Structural Classification of Bacterial Response Regulators: Diversity of Output Domains and Domain Combinations. *J. Bacteriol.*; 188:12, 4169–4182.
 38. Garrido, L.M. 2005. Identificação e caracterização de genes envolvidos na biossíntese da antraciclina cosmomicina, produzida por *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622. Dissertação de Doutorado em Biotecnologia. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
 39. Garrido, L.M.; Lombo, F.; Baig, I.; Nur-E-Alam, M.; Furlan, R.L.; Borda, C.C.; Braña, A.; Mendez, C.; Salas, J.A.; Rohr, J.; Padilla, G. 2006. Insights in the glycosylation steps during biosynthesis of the antitumor anthracycline cosmomycin: characterization of two glycosyltransferase genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73:1, 122-131. Online.
 40. Gasch, A.P.; Spellman, P.T.; Kao, C.M.; Carmel-Harel, O.; Eisen, M.B.; Storz, G.; Botstein, D.; Brown, P.O. 2000. Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell.* 11, 4241-4257.
 41. Gautschi, M.; Lilie, H.; Fünfschilling, U.; Mun, A.; Rospert, S. 2001. RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin. *PNAS.* 98:3762-67.
 42. Goodman, J.; Wang, S.; Alam, S.; Ruzicka, F.J.; Perry A. Frey, P.A.; Joseph E.; Wedekind, J.E. 2004. Ornithine Cyclodeaminase: Structure, Mechanism of Action, and Implications for the -Crystallin Family. *Biochemistry,* 43:44, 13883 -13891.
 43. Grandvalet, C.; Rapoport, G.; Mazodier, P. 1998. hrcA, Encoding the Repressor of the groEL Genes in *Streptomyces albus* G, Is Associated with a Second dnaJ Gene. *Journal of Bacteriology.* 180:19, 5129-5134.

44. Gury, J.; Barthelmebs, L.; Tran, N.P.; Diviès, C.; Cavin, J. 2004. Cloning, Deletion, and Characterization of PadR, the Transcriptional Repressor of the Phenolic Acid Decarboxylase-Encoding padA Gene of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*.70:4, 2146–2153.
45. Hautala, A.; Torkkell, S.; Raty, K.; Kunnari, T.; Kantola, J.; Mantsala, P.; Hakala, J.; Ylihonko, K. 2003. Studies on a second and third ring cyclization in anthracycline biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)*.56:2, 143-153.
46. Hoffmeister, D.; Ichinose, K.; Domann, S.; Faust, B.; Trefzer, A.; Drager, G.; Kirschning, A.; Fischer, C.; Kunzel, E.; Bearden, D.; Rohr, J.; Bechthold, A. 2000. The NDP-sugar co-substrate concentration and the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: cloning and characterization of desoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster. *Chem Biol*. 7:11, 821-831.
47. Hopwood, D.A. 1997. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Syntases. *Chem Rev*. 97, 2465-97.
48. Hopwood, D.A.; Bibb, M.J.; Chater, K.F.; Kieser, T.; Bruton, C.J.; Kieser, H.M.; Lydiate, J.; Smith, C.P.; Ward, J.M.; Schrempf, H. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich, England.
49. Hopwood, D.A.; Sherman, D.H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acids biosynthesis. *Annual Reviews of Genetic*. 24: 37-66.
50. Hutchinson, C.R. 1997. Biosynthetic Studies of Daunorubicin and Tetracenomycin C. *Chem Rev*. 97:7, 2525-2536.
51. Hutchinson, C.R.; Fujii, I. 1995. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu Rev Microbiol*. 49:201-238.
52. Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Ōmura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21:526–531.

53. Inoue, O.O.; Netto, W.S.; Padilla, G.; Facciotti, M.C.R. 2007. Brazilian Journal of Microbiology. 38:58-61.
54. Ishizuka, H.; Horinouchi, S.; Kieser, H.M.; Hopwood, D.A.; Beppu, T. 1992. A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. J Bacteriol. 74:23, 7585-7594.
55. Itoh, Z.; Suzuki, T.; Nakaya, M.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. 1984. "Gastrointestinal motor-stimulating activity of macrolide antibiotics and analysis of their effects on the canine gut." Antimicrob. Agents. Chemother. 26: 863-869.
56. Izumikawa, M.; Shipley, P.R.; Hopke, J.N.; O'Hare, T.; Xiang, L.; Noel, J.P.; Moore, B.S. 2003. "Expression and characterization of the type III polyketide synthase 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30:8, 510-515.
57. Jones, G.H. 1985. Regulation of Phenoxazinone synthase Expression in *Streptomyces antibioticus*. Journal of Bacteriology. 1215-1221.
58. Kamra, P.; Gokhale, R.S.; Mohanty, D. 2005. SEARCHGTr: a program for analysis of glycosyltransferases involved in glycosylation of secondary metabolites. Nucleic Acids Research. 33:220-225.
59. Kantola, J.; Kunnari, T.; Hautala, A.; Hakala, J.; Ylihonko, C.; Mäntsälä, P. 2000. Elucidation of anthracyclinone biosynthesis by stepwise cloning of genes for anthracyclines from three different *Streptomyces* spp. Microbiology. 146:155-163.
60. Katz, L.; Donadio, S. 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. Ann. Rev. Microbiol. 47: 875-912.
61. Keatinge-Clay, A.T.; Maltby, D.A.; Medzihradzky, K.F.; Khosla, C.; Stroud, R.M. 2004. An antibiotic factory caught in action. Nat Struct Mol Biol. 11:9, 888-893.
62. Kendrew, S.G.; Katayama, K.; Deutsch, E.; Madduri, K.; Hutchinson, C.R. 1999. DnrD cyclase involved in the biosynthesis of doxorubicin: purification and characterization of the recombinant enzyme. Biochemistry. 38:15, 4794-4799.

63. Kieser, H.M.; Kieser, T.; Hopwood, D.A. 1992. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J.Bacteriol.* 174: 5496-5507.
64. Kieser, T.; Bibb M.J.; Buttner, M.J.; Chater, K.F.; Hopwood, D.A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich (Inglaterra): The John Innes Foundation. 613p.
65. Kim, R.Y.; Gasser, R.; Wistow, G.J. 1992. Mu-crystallin is a mammalian homologue of *Agrobacterium* ornithine cyclodeaminase and is expressed in human retina. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 89:19, 9292-9296.
66. Kinashi, H.; Shimaji-Murayama, M. 1991. Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 173:1523-1529.
67. Kino, T.; Hatanaka, H.; Miyata, S.; Inamura, N.; Nishiyama, M.; Yajima, T.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; et al. 1987. "FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro." *J. Antibiot.* 40:9, 1256-1265.
68. Labeda, D.P. 1990. *Isolation of biotechnological organisms from nature*. McGraw-Hill Publishing Company, New York, N.Y.
69. Leblond, P.; Demuyter, P.; Simonet, J.M.; Decaris, B. 1990. Genetic instability and hypervariability in *Streptomyces ambofaciens*: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. *Mol. Microbiol.* 4: 707-714.
70. Leblond, P.; Redenbach, M.; Cullum, J. 1993. Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J.Bacteriol.* 175: 3422-3429.
71. Lezhava, A.; Mizukami, T.; Kajitani, T.; Kameoka, D.; Redenbach, M.; Shinkawa, H.; Nimi, O.; Kinashi, H. 1995. Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J.Bacteriol.* 177: 6492-6498.
72. Lombó, F.; Siems, K.; Braña, A.F.; Méndez, C.; Bindseil, K.; Salas, J.A. 1997. Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin. *J. Bacteriol.* 179:3354-3357.
73. Long, C.M.; Virolle, M.J.; Chang, S.Y.; Chang, S.; Bibb, M.J.; 1987. "Alpha-amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression

- motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate alpha-amylases." *J. Bacteriol.* 169:12, 5745-5754.
74. Lu, W.; Leimkuhler, C.; Oberthur, M.; Kahne, D.; Walsh, C.T. 2004. AknK is an L-2-desoxyfucosyltransferase in the biosynthesis of the anthracycline aclacinomycin A. *Biochemistry* 43:4548–4558.
75. Madduri, K.; Hutchinson C. 1995. Functional characterization and transcriptional analysis of the *dnrR1* locus, which controls daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol.* 177:1208–1215.
76. Martins, C.S.; Souto-Maior, A.M. 2003. Anthracycline Production by *Streptomyces capoamus* in Batch Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 46:3, 483-488.
77. Mazodier, P.; Petter, R.; Thompson, Ch. 1989. Intergeneric Conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *Journal of Bacteriology.* 171:6, 3583-3585.
78. Mazodier, P.; Thompson, C.J.; Petter, R. 1990. "The chromosomal integration site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes." *Mol. Gen. Genet.* 222: 431-434.
79. McDaniel, R.; Ebert-Khosla, S.; Hopwood, D.A.; Khosla, C. 1995. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature.* 375:549–554.
80. Méndez, C.; Salas, J. A. 2001. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends Biotechnol.* 19:11, 449-56.
81. Menendez, N.; Nur-e-Alam, M.; Brana, A.F.; Rohr, J.; Salas, J.A.; Mendez, C. 2004. Biosynthesis of the antitumor chromomycin A3 in *Streptomyces griseus*: analysis of the gene cluster and rational design of novel chromomycin analogs. *Chem Biol.* 11:1, 21-32.
82. Miyamoto, Y.; Johdo, O.; Nagamatsu, Y.; Yoshimoto, A. 2002. Cloning and characterization of a glycosyltransferase gene involved in the biosynthesis of anthracycline antibiotic β -rhodomycin from *Streptomyces violaceus*
1. *FEMS Microbiology Letters.* 206:2, 163–168.
83. Mizuno, T.; and I. Tanaka. 1997. Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators. *Mol. Microbiol.* 24:665–667.

84. Moore, B.S.; Hopke, J.N. 2001. "Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway." *Chem. Biochem.* 2:1, 35-38.
85. Morioka, H.; Etoh, Y.; Horino, I.; Takezawa, M.; Ando, T.; Hirayama, K.; Kano, H.; Shibai, H. 1985. Production and Isolation of Cosmomycins A, B, C and D: New Differentiation Inducers of Friend Cell F5-5. *Agric. Biol Chem.* 49:7, 1951 -1958.
86. Morosoli, R.; Bertrand, J.L.; Mondou, F., Shareck, F.; Kluepfel, D. 1986. "Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*." *Biochem. J.* 239: 587-592.
87. Narva, K. E.; and J. S. Feitelson. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the redD locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 172:326–333.
88. Ni, X.; Westpheling, J. 1997. Direct repeat sequences in the *Streptomyces* chitinase-63 promoter direct both glucosa repression and chitin induction. *PNAS*, 94: 13116-13121.
89. Ochi, K. 1986. Occurrence of the stringent response in *Streptomyces* sp. And its significance for the inhibition of morphological and physiological differentiation. *J. Gen. Microbiol.*; 132: 2621-2631.
90. 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. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci* . 98: 21, 12215-20.
91. Pandza, K.; Pfalzer, G.; Cullum, J.; Hranueli, D. 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology.* 143:1493–1501.
92. Paranthaman, S.; Dharmalingam, K. 2003. Intergeneric Conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: Chromosomal Integration and Expression of Recombinant Plasmids Carrying the chiC Gene. *Applied and Environmental Microbiology.* 69:1, 84-91.
93. Pérez, M.; Lombo, F.; Baig, I.; Braña, A.F.; Rohr, J.; Salas, J.A.; Méndez, C. 2006. Combinatorial Biosynthesis of Antitumor Desoxysugar Pathways in *Streptomyces griseus*: Reconstitution of "Unnatural Natural Gene

- Clusters” for the Biosynthesis of Four 2,6-D-Dideoxyhexoses. *Applied And Environmental Microbiology*. 72:10, 6644–6652.
94. Pérez-Llarena, F. J.; P. Liras, A. Rodríguez-García, and J. F. Martín. 1997. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both β -lactam compounds. *J. Bacteriol.* 179:2053–2059.
95. Programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>).
96. Programa de comparação entre seqüências de DNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).
97. Programa Nebcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).
98. Rätty, K.; Kantola, J.; Hautala, A.; Hakala, J.; Ylihonko, K.; Mäntsälä, P. 2002. Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycin polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene*. 293: 115-122.
99. Redenbach, M.; Kieser, H.M.; Denapaite, D.; Eichner, A.; Cullum, J.; Kinashi, H.; Hopwood, D.A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 MB *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* 21: 77-96.
100. Reeves, C.D. 2003. The enzymology of combinatorial biosynthesis. *Crit Rev Biotechnol.* 23(2):95-147.
101. Romero, J.; Liras, P.; Martín, J.F. 1986. Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. *Appl Environ Microbiol.* 52:4, 892-897.
102. Rondon, M.R.; Goodman, R.M. & Handelsman, J. 1999. The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Tibtech* 17: 403-409.
103. Ryding, N.J.; Bibb, M.J.; Molle, V.; Findlay, K.C.; Chater, K.; Buttner, M.J. 1999. New Sporulation Loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 181: 17, 5419–5425.
104. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1988. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2 ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory. 1659.
105. Sanchez, C.; Zhu, L.; Braña, A.; Salas, A.; Rohr, J.; Carmen Méndez, C.; Salas, J. 2005. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *PNAS*. 102:2, 461–466.

106. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS. 74:5463-7.
107. Saxena, P.; Yadav, G.; Mohanty, D.; Gokhale, R.S. 2003. "A new family of type III polyketide synthase in *Mycobacterium tuberculosis*." J. Biol. Chem. 278:45, 44780-44790.
108. Schindler, U.; Sans, U. e Schröder, J. 1989. Ornithine cyclodeaminase from octopine Ti plasmid Ach5: identification, DNA sequence, enzyme properties, and comparison with gene and enzyme from nopaline Ti plasmid C58. J Bacteriol. 171:2, 847–854.
109. Schoffl, F.; Prandl, R.; Reindl, A. 1998. Regulation of the Heat-Shock Response. Plant. Phisiol. 117:1135-1141.
110. Schwecke, T.; J. F. Aparicio, I. Molnar, A. König, L. E. Khaw, S. F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortes, J. B. Lester, G. A. Böhm, J. Staunton and P. F. Leadlay. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. Proc. Natl. Acad. 92:7839–7843.
111. Stackebrandt, E.D.; Liesack, W.; Witt, D. 1992. Ribosomal RNA and rDNA sequence analysis. Gene. 115: 255-260.
112. Strohl, W.R.; Dickens, M.L.; Rajgarhia, V.B.; Woo, A.J.; Priestley, N.B. 1997. Anthracyclines In: Strohl WR, editor. Biotechnology of antibiotics. 2a ed. New York : Marcel Dekker. 577-657
113. Sun, Y.; Zhou, X.; Liu, J.; Bao, K.; Zhang, G.; Tu, G.; Kieser, K.; Zixin Deng, Z. 2002. '*Streptomyces nanchangensis*', a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin, contains multiple polyketide gene clusters. Microbiology. 148, 361–371.
114. Sung, D.Y.; Vierling, E.; Guy, C.L. 2001. Comprehensive Expression Profile Analysis of the Arabidopsis Hsp70 Gene Family. Plant Physiol. 126: 789-800.
115. Tabela de códons utilizados nos genes de *Streptomyces coelicolor* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Streptomyces+coelicolor+A3%282%29+%5Bgbt%5D&aa=1&style=GCG>).
116. Takano, E.; Bibb, M.J. 1994. The stringent response ppGpp and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Actinomycetol.; 8, 1-16.

117. Thibodeaux, C.J.; Melançon, C.E.; Liu, H. 2007. Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification. *Nature*. 446:7139, 1008-1016.
118. Thomas, M.; Chan, Y.; Ozanick, S. 2003. Deciphering Tuberactinomycin Biosynthesis: Isolation, Sequencing, and Annotation of the Viomycin Biosynthetic Gene Cluster. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:9, 2823-2830.
119. Trefzer, A.; Fischer, C.; Stockert, S.; Westrich, L.; Kunzel, E.; Girreser, U.; Rohr, J.; Bechthold, A. 2001. Elucidation of the function of two glycosyltransferase genes (lanGT1 and lanGT4) involved in landomycin biosynthesis and generation of new oligosaccharide antibiotics. *Chem. Biol.* 8:12, 1239-52.
120. Walker, J. E.; M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1:945–951.
121. Wang, J. e Wilkinson, M. F. 2001. Deletion Mutagenesis of Large (12-kb) Plasmids by a One-Step PCR Protocol. *BioTechniques*. 31:4, 722-724.
122. Wang, Y.; Niemi, J.; Airas, K.; Ylihonko, K.; Hakala, J.; Mantsala, P. 2000. Modifications of aclacinomycin T by aclacinomycin methyl esterase (RdmC) and aclacinomycin-10-hydroxylase (RdmB) from *Streptomyces purpurascens*. *Biochim Biophys Acta*. 1480(1-2):191-200.
123. Wietzorrek, A.; and M. Bibb. 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol. Microbiol.* 25:1177–1184.
124. Wilson, D.J.; Xue, Y.; Reynolds, K.A.; Sherman D.H. 2001. Characterization and Analysis of the PikD Regulatory Factor in the Pikromycin Biosynthetic Pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J. Bacteriol.*; 183:11, 3468–3475.
125. Wright, H.M.; Hopwood, D.A. 1976. A chromosomal gene for chloramphenicol acetyltransferase in *Streptomyces acrimycini*. *J.Gen.Microbiol.* 102: 417-421.
126. Yanisch-Perron, C.; J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–119.

127. Yeats, C.; Bentley, S. e Bateman, A. 2003. New knowledge from old: in silico discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. Microbiol. 3:3. Online.
128. Zhang. Z.; Raghavachari, B.; Hardison, R.C.; Miller, W. 1994. Chaining multiple-alignment blocks. J Comput Biol. 1:3, 217-26.

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
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
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
ER	enoilredutase
FAS	sintase de ácidos graxos
HPLC	Cromatografia Líquida de alto desempenho
IPTG	isopropil tio β -D-galactosídeo
Kb	kilobase
Klenow	fragmento maior do DNA polimerase de <i>E. coli</i>
KR	cetorreductase
KS	cetosintase
Mb	megabase
mM	milimolar
MOPS	ácido 3N-(morfolino)-propano-sulfónico
nm	nanômetros
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase

PKS	policetídeo sintase
RMN	ressonância magnética nuclear
rpm	revoluções por minuto
RNA	ácido ribonucleico
TBE	tris-ácido-bórico-EDTA
TE	tioesterase
Tris	tris-2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol
RBS	sítio de união ao ribossomo
UV	ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

APÊNDICE

