

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

VIDA MARINA BARRETO LEITE

**Caracterização da produção de moléculas antitumorais por *Streptomyces* sp.
BRB081, guiada por mineração genômica**

São Paulo
2022

VIDA MARINA BARRETO LEITE

**Caracterização da produção de moléculas antitumorais por *Streptomyces* sp.
BRB081, guiada por mineração genômica**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

Versão Original

São Paulo

2022

RESUMO

LEITE, V. M. B. **Caracterização da produção de moléculas antitumorais por *Streptomyces* sp. BRB081, guiada por mineração genômica.** 2022. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Departamento de Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Há quase um século, metabólitos secundários microbianos têm sido ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos, e o gênero *Streptomyces*, do filo Actinobacteria, destaca-se como a mais proeminente fonte de bioativos. Embora amplamente estudado, o conhecimento sobre sua diversidade metabólica não foi exaurido e muitas novas moléculas continuam a ser descobertas a partir deste táxon. A literatura relata a citotoxicidade do extrato de *Streptomyces* sp. BRB081 contra a linhagem celular HCT-116, atribuindo-a sobretudo às surugamidas, bem como a uma profusão de outras moléculas não identificadas por abordagens metabolômicas. Empregando a mineração genômica, pois, este trabalho teve como objetivo caracterizar mais profundamente o repertório metabólico deste isolado marinho para a biossíntese de antitumorais. O DNA genômico de *Streptomyces* sp. BRB081 foi sequenciado (Illumina HiSeq System) e um pipeline de montagem foi executado através das plataformas Geneious R11, MEGA X, MeDuSa 1.6 e gVolante 1.2.1. O software AntiSMASH 5.0 foi utilizado para a anotação de agrupamentos gênicos biosintéticos (BGCs). Como resultado, 27 BGCs foram anotados, sendo 4 destes associados a desferrioxaminas, surugamidas, ectoína e sibiromicina, bioativos antitumorais. Este é o primeiro relato da biossíntese de sibiromicina por *Streptomyces*. Por meio de uma rede de similaridade de sequências (SSN) e de diagramas de vizinhança do genoma (GNDs), localizamos este agrupamento putativo em outros 11 membros da classe Actinomycetia. Diversos outros BGCs fracamente compatíveis a agrupamentos gênicos conhecidos foram identificados em BRB081, e muito possivelmente codificam vias ainda não descritas. Nossos resultados demonstram a relevância da incorporação de análises genômicas à triagem de produtos naturais, sobrepujando reveses como a dependência das condições de cultivo e extração. Além disso, descrevemos um genoma bacteriano notadamente especializado na produção de moléculas com atividade antitumoral, o que assevera as condições encontradas em ambientes marinhos como catalisadoras da produção de metabólitos citotóxicos.

Palavras-chave: *Streptomyces*. Mineração Genômica. Antitumorais.

ABSTRACT

LEITE, V. M. B. **Characterization of antitumor molecules production by *Streptomyces* sp. BRB081, guided by genome mining.** 2022. 60 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

For almost a century, microbial secondary metabolites have been the starting point for drug development, and the genus *Streptomyces*, from the phylum Actinobacteria, stands out as the most prominent source of bioactives. Although widely studied, knowledge about its metabolic diversity has not been exhausted and many new molecules continue to be discovered from this taxon. The literature reports the cytotoxicity of *Streptomyces* sp. BRB081 against the HCT-116 cell line, attributing it mainly to surugamides, as well as a profusion of other molecules not identified by metabolomics approaches. Employing genome mining, therefore, this work aimed to characterize in more detail the metabolic repertoire of this marine isolate for the biosynthesis of antitumors. The genomic DNA of *Streptomyces* sp. BRB081 was sequenced (Illumina HiSeq System) and an assembly pipeline was run through Geneious R11, MEGA X, MeDuSa 1.6 and gVolante 1.2.1 platforms. AntiSMASH 5.0 software was used to annotate biosynthetic gene clusters (BGCs). As a result, 27 BGCs were noted, 4 of which were associated with desferrioxamines, surugamides, ectoine and sibiromycin, antitumor bioactives. This is the first report of sibiromycin biosynthesis by *Streptomyces*. Using a sequence similarity network (SSN) and genome neighborhood diagrams (GNDs), we located this putative cluster in 11 other members of the Actinomycetia class. Several other BGCs that are weakly compatible with known gene clusters were identified in BRB081, and quite possibly encode pathways not yet described. Our results demonstrate the relevance of incorporating genomic analysis into the screening of natural products, overcoming setbacks such as dependence on cultivation and extraction conditions. Furthermore, we describe a bacterial genome notably specialized in the production of molecules with antitumor activity, which asserts the conditions found in marine environments as catalysts for the production of cytotoxic metabolites.

Keywords: *Streptomyces*. Genome Mining. Antitumors.

INTRODUÇÃO

Definido como um conjunto de mais de cem condições clínicas marcadas pelo crescimento desordenado de células (INCA, 2020), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e está associado a quase uma em cada seis ocorrências de óbito (WHO, 2022). Limitações encontradas na abordagem quimioterápica - a alta toxicidade não seletiva dos compostos antineoplásicos e a resistência celular a múltiplas drogas (MDR) - contribuem consideravelmente para estes números e substanciam, também, a busca por moléculas antitumorais inéditas.

Há quase um século, metabólitos secundários de origem bacteriana têm sido o ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos e, dentre o pequeno número de táxons responsáveis pela enorme quantidade de moléculas relatadas, o gênero *Streptomyces*, do filo Actinobacteria, destaca-se como a mais proeminente fonte microbiana de bioativos. Sozinho, este gênero é responsável por mais da metade de todos os antibióticos em uso clínico e por imunomoduladores, antifúngicos, antivirais, antiparasitários e antitumorais (ZHAO et al., 2019).

Embora o estudo de estreptomicetos terrestres tenha se difundido expressivamente já em 1940 (LEWIS, 2013), ainda hoje, muitas novas moléculas continuam sendo descobertas a partir de *Streptomyces*, especialmente através da bioprospecção de nichos subexplorados. Desde os anos 70, com o advento de técnicas e equipamentos de mergulho mais seguros, a amostragem de microbiomas marinhos foi favorecida (NEWMAN & CRAGG, 2016) e uma vasta lista de antitumorais tem sido creditada a estreptomicetos residentes em mares e oceanos (GOMATHI & GOTHANDAM, 2016; BUSI & PATTNAIK, 2018).

Em resposta à complexa combinação de condições encontradas nestes ambientes, os microrganismos marinhos desenvolveram muitas estratégias de sobrevivência para colonizar peixes, moluscos, esponjas, algas, manguezais, água e sedimentos. Essas estratégias se traduziram em capacidades metabólicas únicas (HUTCHINGS & FU, 2017; YANG et al., 2020) e estima-se que sua natureza sem precedentes represente um recurso promissor contra a MDR (NIGAM et al., 2019).

Recentemente, Tangerina et al. (2020) utilizaram abordagens metabolômicas para descrever o potencial anticâncer do extrato bruto de *Streptomyces* sp. BRB081, isolada de sedimentos coletados na Praia do Araçá, litoral norte do estado de São Paulo. A citotoxicidade demonstrada contra a linhagem celular de adenocarcinoma de

côlon (HCT-116 ATCC CCL-247) foi, sobretudo, atribuída à presença de surugamidas, mas também a uma profusão de outras moléculas não identificadas.

A mineração genômica é uma competente abordagem para a triagem de produtos naturais e elucidação de suas vias metabólicas, chegando, por vezes, à identificação dos seus produtos finais, ainda que sejam biossintetizados em quantidades mínimas ou indetectáveis. A notabilidade deste método se deve, entre outros motivos, à precisão independente de expressão gênica e de condições de cultivo e extração, variáveis determinantes para a validade dos dados gerados por técnicas de metabolômica.

Deste modo, o presente trabalho apresentou como objetivo geral caracterizar o potencial metabólico secundário do isolado BRB081 para a biossíntese de bioativos antitumorais, empregando a mineração genômica como principal abordagem. Consistiam em objetivos específicos (i) a montagem do *draft* deste genoma, (ii) a localização e a descrição de agrupamentos gênicos associados à biossíntese de antitumorais, e (iii) a identificação de moléculas potencialmente biossintetizadas e não demonstradas por Tangerina et al. (2020), cuja atividade pode concorrer à citotoxicidade relatada.

CONCLUSÕES

A busca por bioativos antitumorais derivados de microbiomas marinhos vem agregando dados muito interessantes à literatura. Os metabólitos produzidos em resposta ao estresse por infecções virais, por exemplo, demonstram a capacidade de mediar atividades inibitórias específicas em alguns processos celulares chave, incluindo vias de apoptose, angiogênese e migração (HE et al., 2009).

A triagem metabolômica de *Streptomyces* sp. BRB081 revelou a biossíntese de surugamidas e de alguns outros metabólitos citotóxicos, possivelmente responsáveis pela elevada atividade antitumoral desse extrato, observada *in vitro* contra células humanas de adenocarcinoma de côlon (TANGERINA et al., 2020). No presente trabalho, propondo a mineração genômica como principal abordagem, alcançamos uma compreensão mais profunda sobre este repertório biossintético.

A montagem de um *draft* genômico para *Streptomyces* sp. BRB081 consistiu em uma importante etapa de pré-análise. De acordo com Lee et al. (2020), mais de 86% dos 1.614 genomas de estreptomicetos depositados no NCBI Assembly, até

dezembro de 2019, continham múltiplos *contigs* fragmentados ou sequências ambíguas, sendo este o principal obstáculo para a obtenção de informações genômicas confiáveis. A produção de um conjunto de dados de alta qualidade foi fundamental para que nossos resultados subsequentes fossem suficientemente informativos e estivessem isentos de ruídos.

Embora categorizar este genoma a nível de espécie não tenha sido um dos nossos objetivos, a análise fenética conduzida como parte da montagem nos forneceu fortes evidências de que BRB081 pertence a *Streptomyces rutgersensis*. Este indício foi corroborado pela distribuição quase idêntica de BGCs nos genomas de BRB081 e *S. rutgersensis* NBH77, isolada do solo desértico da Antártida (BENDAUD et al., 2021). Como demonstrado por Vicente et al. (2018) e Sottorff et al. (2019), cepas de *Streptomyces* filogeneticamente muito próximas, mas geograficamente distantes, podem apresentar perfis metabólicos secundários distintos.

Ao minerar agrupamentos de genes biossintéticos no genoma recém-montado, localizamos 27 BGCs distribuídos em 21 regiões do cromossomo. Diversas moléculas previstas como produtos das vias identificadas eram comuns ao gênero e, duas destas, com atividade antitumoral - surugamidas e desferrioxaminas -, foram também relatadas por Tangerina et al. (2020). Duas outras, quanto, não foram reportadas no trabalho supracitado.

A ectoína, um soluto de baixo peso molecular, é amplamente produzida por *Streptomyces* (NICAULT et al., 2020; JACKSON et al., 2018) e representa um atributo de sobrevivência ao meio abiótico. Sua atividade antitumoral é conhecida *in vitro* (SHAIKHPOUR et al., 2019), embora este conhecimento seja ainda incipiente. A sibiromicina, por sua vez, possui uma potente atividade citotóxica extensamente estudada (HURLEY et al., 1977; HURLEY & THURSTON, 1984) e, curiosamente, nunca havia sido descrita a partir de outro produtor além da actinobactéria terrestre *Streptosporangium sibiricum*.

Dispondo de robustas evidências genômicas para a biossíntese desta molécula por BRB081, os extratos de cultura deste isolado foram novamente analisados pelo Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências/ USP. Nossos dados foram validados pela análise por HPLC-MS/MS, que apontou a presença dos íons da própria sibiromicina, bem como das suas formas imina e metoxilato. Em análises químicas, compostos de baixo rendimento, mesmo com alta atividade biológica, podem ser suprimidos por outros componentes principais do extrato. Acreditamos que este possa

ser o motivo pelo qual a sibiromicina e seus análogos não foram detectados no trabalho de Tangerina et al. (2020).

Aqui, reportamos pela primeira vez a presença de um BGC de sibiromicina em *Streptomyces*, cuja expressão foi quimicamente comprovada. Além disso, através de uma rede de similaridade de sequências (SSN) e de diagramas de vizinhança do genoma (GNDs), evidenciamos *in silico* a distribuição deste agrupamento gênico em outros onze genomas da classe Actinomycetia, do filo Actinobacteria.

Os microrganismos que abrigam o BGC putativo de sibiromicina foram isolados principalmente do solo ou associam-se a insetos, porém, esse grupo também inclui espécies isoladas de líquens (*Streptomyces uncialis*), fontes termais (*Streptomyces calidiresistens*) e esponjas marinhas (*Actinomadura craniellae*). Como não há um padrão evidente entre estes nichos, não está claro a quais características ambientais responde a expressão desse BGC. Contudo, nossos dados demonstram que, para além do potencial já descoberto em actinobactérias, muito é ainda desconhecido.

Embora tenhamos obtido este significativo resultado, sabemos que a sibiromicina não compõe o grupo de compostos citotóxicos não identificados por Tangerina et al. (2020), uma vez que, apesar de desconhecidas, estas moléculas foram detectadas e agrupadas através da plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking), ao contrário da sibiromicina.

Além de identificar metabólitos antitumorais seguramente biossintetizados por *Streptomyces* sp. BRB081 (ID $\geq 85\%$), não obstante, nossos dados de mineração compreendem uma série de BGCs fracamente relacionados a agrupamentos experimentalmente caracterizados e que, dessemelhantes da informação contida em bancos de dados químicos e genômicos, podem tratar-se de estruturas inéditas.

Por exemplo, a existência de um BGC híbrido LAP-tiopeptídeo (Região 11, Tabela 5) é incomum, embora já tenha sido apontada *in silico* em alguns genomas de *Streptomyces* (ALMEIDA et al., 2019). LAPs (peptídeos lineares contendo azolina) e tiopeptídeos são duas classes de peptídeos ribossomais modificados pós-tradicionalmente (RiPPs). Tendo em vista que os RiPPs são moléculas biologicamente ativas e que poucos LAPs foram descritos a partir de estreptomicetos, o produto desta via combinada pode ser melhor investigado.

Da mesma maneira, dois BGCs adjacentes de bacteriocinas (Regiões 5 e 6, Tabela 5) requerem estudos mais detalhados. Tratam-se de agrupamentos gênicos sem similaridade a quaisquer BGCs de mesmo tipo e, portanto, sem produtos

previstos. Estas regiões, no entanto, são compartilhados por uma série de outras *Streptomyces* spp. (Apêndice D). A atividade anticâncer de bacteriocinas é relatada desde a década de 70 e a sua citotoxicidade seletiva direciona pesquisas focadas em aplicação terapêutica (KAMARAJAN et al., 2015; BAINDARA et al.; 2018).

Nossos resultados asseveram a relevância da incorporação de análises genômicas em programas de triagem de produtos naturais. As perspectivas criadas por este trabalho incluem o uso de elicitores ou sistemas de expressão heterólogos para aumentar a produção de metabólitos de baixo rendimento não detectados, combinando uma abordagem genômica e metabolômica para elucidar a diversidade química deste isolado.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. L.; CARRILLO, R. A. F.; JACKSON, S. A.; DOBSON, A. D. W. Comparative Genomics of Marine Sponge-Derived *Streptomyces* spp. Isolates SM17 and SM18 With Their Closest Terrestrial Relatives Provides Novel Insights Into Environmental Niche Adaptations and Secondary Metabolite Biosynthesis Potential. **Front Microbiol.**, v. 10, 2019.
- ALMEIDA, E. L.; KAUR, N.; JENNINGS, L. K.; CARRILLO, R. A. F.; JACKSON, S. A.; THOMAS, O. P.; DOBSON, A. D. W. Genome Mining Coupled with OSMAC-Based Cultivation Reveal Differential Production of Surugamide A by the Marine Sponge Isolate *Streptomyces* sp. SM17 When Compared to Its Terrestrial Relative *S. albidoflavus* J1074. **Microorganisms**, v. 7, 2019.
- ANTORAZ, S.; SANTAMARÍA, R. I.; DÍAZ, M.; SANZ, D.; RODRÍGUEZ, H. Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. **Front Microbiol.**, v. 6, 2015.
- BAINDARA, P.; KORPOLE, S.; GROVER, V. Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 102, p. 10393 – 10408, 2018.
- BAUMAN, K. D.; SHENDE, V. V.; CHEN, P. Y-T.; TRIVELLA, D. B. B.; GULDER, T. A. M.; VELLALATH, S.; ROMO, D.; MOORE, B. S. Enzymatic assembly of the salinosporamide γ-lactam-β-lactone anticancer warhead. **Nat Chem Biol.**, v. 18, p. 538 – 546, 2022.
- BELKNAP, K. C.; PARK, C. J.; BARTH, B. M.; ANDAM, C. P. Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. **Sci Rep.**, v. 10, 2020.
- BENAUD, N.; EDWARDS, R.J.; AMOS, T.G.; D'AGOSTINO, P.M.; GUTIERREZ-CHAVEZ, C.; MONTGOMERY, K.; NICETIC, I.; FERRARI, B.C. Antarctic desert soil bacteria exhibit high novel natural product potential, evaluated through long-read

genome sequencing and comparative genomics. **Environ Microbiol.**, v. 23, p. 3646 – 3664, 2021.

BENTLEY, S.; CHATER, K.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, p. 141 – 147, 2002.

BIERMANN, F.; HELFRICH, E. J. N. Hidden Treasures: Microbial Natural Product Biosynthesis off the Beaten Path. **mSystems**, e0084621, 2021.

BLIN, K.; SHAW, S.; STEINKE, K.; VILLEBRO, R.; ZIEMERT, N.; LEE, S. Y.; MEDEMA, M. H.; WEBER, T. AntiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. **Nucleic Acids Res.**, v. 47, 2019.

BOSI, E.; DONATI, B.; GALARDINI, M.; BRUNETTI, S.; SAGOT, M. F.; LIÓ, P.; CRESCENZI, P.; FANI, R.; FONDI, M. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. **Bioinformatics**, v. 31, p. 2443 - 2451, 2015.

BRAHNIKOVA, M.G.; KONSTANTINOVA, N. V.; MESENTSEV, A. S. Sibiromycin: isolation and characterization. **J Antibiot Res.**, v. 25, p. 668 - 673, 1972.

BURSY, J.; KUHLMANN, A. U.; PITTELKOW, M.; HARTMANN, H.; JEBBAR, M.; PIERIK, A. J.; BREMER, E. Synthesis and Uptake of the Compatible Solutes Ectoine and 5-Hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in Response to Salt and Heat Stresses. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, p. 7286 – 7296, 2008.

BUSI, S.; PATTNAIK, S. S. **Chapter 9 - Current Status and Applications of Actinobacteria in the Production of Anticancerous Compounds**. In: SINGH, B. P.; GUPTA, V. K.; PASSARI, A. K. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering - Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications. p. 137-153, 2018.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat Prod Rep.**, v. 36, p. 122 – 173, 2019.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat Prod Rep.**, 2022.

CHALLIS, G. L.; NAISMITH, J. H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. **Curr Opin Struct Biol.**, v. 14, p. 748 - 756, 2004.

CHALLIS, G. L. Genome Mining for Novel Natural Product Discovery. **J Med Chem.**, v. 51, p. 2618 – 2628, 2008.

CIMERMANCIC, P.; MEDEMA, M. H.; CLAESSEN, J.; KURITA, K.; BROWN, L. C. W.; MAVROMMATHIS, K.; PATI, A.; GODFREY, P. A.; KOEHRSEN, M.; CLARDY, J.; BIRREN, B. W.; TAKANO, E.; SALI, A.; LININGTON, R. G.; FISCHBACH, M. A. Insights into Secondary Metabolism from a Global Analysis of Prokaryotic Biosynthetic Gene Clusters. **Cell**, v. 158, p. 412 - 421, 2014.

DOROGHAZI, J.; ALBRIGHT, J.; GOERING, A. et al. A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. **Nat Chem Biol.**, v. 10, p. 963 – 968, 2014.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 1792 – 1797, 2004.

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

GAUSE, G. F; DUDNIK, Y. V. **Interaction of Antitumor Antibiotics with DNA: Studies on Sibiromycin.** In: Hahn, F. E. Progress in Molecular and Subcellular Biology: Complexes of Biologically Active Substances with Nucleic Acids and Their Modes of Action. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, p. 33 - 39, 1971.

GAUSE, G. F.; PREOBRAZHENSAYA, T. P.; IVANITSKAYA, L. P.; SVESHNIKOVA, M. A. Production of an antibiotic sibiromycin by *Streptosporangium sibiricum* sp. nov. **Antibiotiki**, v. 14, p. 963 - 969, 1969.

GERLT, J. A.; BOUVIER, J. T.; DAVIDSON, D. B.; IMKER, H. J.; SADKHIN, B.; SLATER, D. R.; WHALEN, K. L. Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST): A web tool for generating protein sequence similarity networks. **Biochim Biophys Acta**, v. 1854, p. 1019-1037, 2015.

GERLT, J. A. Genomic Enzymology: Web Tools for Leveraging Protein Family Sequence-Function Space and Genome Context to Discover Novel Functions. **Biochemistry**, v. 56, p. 4293 - 4308, 2017.

GOMATHI, A.; GOTHANDAM, K. M. Ocean Dwelling Actinobacteria as Source of Antitumor Compounds. **Braz Arch Biol Technol.**, Curitiba, v. 59, 2016.

HAFT, D. H.; DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A.; BROVER, V.; CHETVERNIN, V.; O'NEILL, K.; LI, W.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; ZHENG, C.; THIBAUD-NISSEN, F.; GEER, L. Y.; MARCHLERBAUER, A.; PRUITT, K. D. RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. **Nucleic Acids Res.**, v. 4, 2018.

HE, T.; XU, C.; ZHANG, X. **Chapter 9: Antitumor Activities of Secondary Metabolites from Marine Microbe Stress Responses to Virus Infection.** In: Zhang, X. Virus Infection and Tumorigenesis, p. 285 – 318, 2019.

HILLIER, L. W.; MILLER, R. D.; BAIRD, S. E.; CHINWALLA, A.; FULTON, L. A.; KOBOLDT, D. C.; WATERSTON, R. H. Comparison of *C. elegans* and *C. briggsae* Genome Sequences Reveals Extensive Conservation of Chromosome Organization and Synteny. **PLoS Biol.**, v. 5, 2007.

HOFF, G.; BERTRAND, C.; PIOTROWSKI, E.; THIBESSARD, A.; LEBLOND, P. Genome plasticity is governed by double strand break DNA repair in *Streptomyces*. **Sci Rep**, v. 8, p. 5272, 2018.

HURLEY, L. H.; GAIROLA, C.; & ZMIJEWSKI, M. Pyrrolo(1,4)benzodiazepine antitumor antibiotics *In vitro* interaction of anthramycin, sibiromycin and tomaymycin with DNA using specifically radiolabelled molecules. **Biochim Biophys Acta (BBA)** - Nucleic Acids and Protein Synthesis, v. 475, p. 521 – 535, 1977.

HURLEY, L. H.; THURSTON, D. E. Pyrrolo(1,4)benzodiazepine Antitumor Antibiotics: Chemistry, Interaction with DNA, and Biological Implications. **Pharm Res.**, v. 1, p. 52 – 59, 1984.

HUTCHINS, D.A.; FU, F. Microorganisms and ocean global change. **Nat Microbiol.**, v. 2, 17058, 2017.

Instituto Nacional de Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2019. O que é câncer? Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: maio 2022.

JACKSON, S. A.; CROSSMAN, L.; ALMEIDA, E. L.; MARGASSERY, L. M.; KENNEDY, J.; DOBSON, A. D. W. Diverse and Abundant Secondary Metabolism Biosynthetic Gene Clusters in the Genomes of Marine Sponge Derived *Streptomyces* spp. **Mar Drugs**, v. 16, 2018.

JIANG, J.; HE, X.; CANE, D. E. Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. **Nat Chem Biol.**, v. 3, p. 711 – 715, 2007.

JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y.; MEREZHUK, Y.; MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, 2008.

JUKES, T. H.; CANTOR, C.R. **Evolution of protein molecules**. In: Munro, H. N. Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, p. 21 - 132, 1969.

KAMARAJAN, P.; HAYAMI, T.; MATTE, B.; LIU, Y.; DANCIU, T.; RAMAMOORTHY, A.; WORDEN, F.; KAPILA, S.; KAPILA, Y. Nisin ZP, a Bacteriocin and Food Preservative, Inhibits Head and Neck Cancer Tumorigenesis and Prolongs Survival. **PLoS One**, v. 10, 2015.

KARTHIKEYAN, A.; JOSEPH, A.; NAIR, B. G. Promising bioactive compounds from the marine environment and their potential effects on various diseases. **J Genet Eng Biotechnol.**, v. 20, 2022.

KATSUYAMA, Y.; OHNISHI, Y. Type III Polyketide Synthases in Microorganisms. **Methods Enzymol.**, p. 359 – 377, 2012.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural Product Discovery: past, present and future. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 43, p. 155 - 176, 2016.

KEMP, G. C.; TIBERGHIEN, A. C.; PATEL, N. V.; D'HOOGE, F.; NILAPWAR, S. M.; ADAMS, L. R.; CORBETT, S.; WILLIAMS, D. G.; HARTLEY, J. A.; HOWARD, P. W.; Synthesis and in vitro evaluation of SG3227, a pyrrolobenzodiazepine dimer antibody-drug conjugate payload based on sibiromycin. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 27, p. 1154 - 1158, 2017.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol.**, v. 16, p. 111 - 120, 1980.

KLAPPENBACH, J. A.; DUNBAR, J. M.; SCHMIDT, T. M. rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. **Appl Environ Microbiol.**, v. 66, p. 1328 - 1333, 2000.

KOMAKI, H.; TAMURA, T. Reclassification of *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus*, *Streptomyces gougerotii* and *Streptomyces rutgersensis*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 70, p. 4291 – 4297, 2020.

KOSKINIEMI, S.; SUN, S.; BERG, O. G.; ANDERSSON, D. I. Selection-Driven Gene Loss in Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 8, e1002787, 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Bio Evol.**, v. 35, p. 1547 - 1549, 2018.

LABEDA, D. P.; DOROGHAZI, J. R.; JU, K.S.; METCALF, W. W. Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to emend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, pt. 3, p. 894 – 900, 2014.

LEE, N.; KIM, W.; HWANG, S.; LEE, Y.; CHO, S.; PALSSON, B.; CHO, B-K. Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. **Sci Data**, v. 7, 2020.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 12, p. 371-387, 2013.

LI, K. *Streptomyces koyangensis* strain VK-A60T chromosome, complete genome. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP031742.1>. Acesso em: maio 2022.

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces>>. Acesso em: maio 2022.

LI, W.; KULLAR, A.; CHOU, S.; SACRAMO, A.; GERRATANA, B. Biosynthesis of Sibiromycin, a Potent Antitumor Antibiotic. **Appl Environ Microbiol.**, v. 75, p. 2869 – 2878, 2009.

MAGGLOT, D.; OSTELL, J.; PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, D26-D31, 2007.

NAFIS, A.; RAKLAMI, A.; BECHTAOUI, N.; EI KHALLOUF, F.; EI ALAOUI, A.; GLICK, B. R.; HAFIDI, M.; KOUISNI, L.; OUHDOUCH, Y.; HASSANI, L. Actinobacteria from Extreme Niches in Morocco and Their Plant Growth-Promoting Potentials. **Diversity**, v. 11, p. 139, 2019.

National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine. Help for Assembly. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/help/>>. Acesso em: maio 2022.

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **J Biol Chem.**, v. 270, p. 26723 - 26726, 1995.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod.**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NICAULT, M.; TIDJANI, A.-R.; GAUTHIER, A.; DUMARCAY, S.; GELHAYE, E.; BONTEMPS, C.; LEBLOND, P. Mining the Biosynthetic Potential for Specialized Metabolism of a *Streptomyces* Soil Community. **Antibiotics**, v. 9, p. 271, 2020.

NIGAM, M.; SULERIA, H.A.R.; FARZAEI, M.H.; MISHRA, A.P. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. **DARU J Pharm Sci.**, v. 27, p. 491-515, 2019.

NINOMIYA, A.; KATSUYAMA, Y.; KURANAGA, T.; MIYAZAKI, M.; NOGI, Y.; OKADA, S.; WAKIMOTO, T.; OHNISHI, Y.; MATSUNAGA, S.; TAKADA, K. Biosynthetic Gene Cluster for Surugamide A Encompasses an Unrelated Decapeptide, Surugamide F. **ChemBioChem**, v. 17, p. 1709 – 1712, 2016.

NISHIMURA, O.; HARA, Y.; KURAKU, S. gVolante for standardizing completeness assessment of genome and transcriptome assemblies. **Bioinformatics**, v. 33, p. 3635 - 3637, 2017.

ŌMURA, S.; IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A. et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. **PNAS**, v. 98, p. 12215 – 12220, 2001.

PRABHU, J.; SCHAUWECKER, F.; GRAMMEL, N.; KELLER, U.; BERNHARD, M. Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. **Environ Microbiol.**, v. 70, p. 3130 - 3132, 2004.

RIBEIRO DA CUNHA, B.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go?. **Antibiotics**, v. 8, p. 45, 2019.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, p. 19126 – 19131, 2009.

RONG, X.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Syst Appl Microbiol.**, v. 35, p. 7-18, 2012.

SALVO, M. L.; SAFO, M. K.; MUSAYEV, F. N.; BOSSA, F.; SCHIRCH, V. Structure and mechanism of *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase. **Biochim Biophys Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1647, p. 76 - 82, 2003.

SALWAN, R.; SHARMA, V. **Chapter 15 - Bioactive compounds of Streptomyces: Biosynthesis to applications.** In: ATTA-UR-RAHMAN. Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products. v. 64, p. 1572 - 5995, 2020.

SANTOS, O.; SOARES, A.; MACHADO, F.; ROMANOS, M.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M. Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast. **Lett Appl Microbiol.**, v. 60, p. 140 - 147, 2015.

SEXTON, D. L.; TOCHEVA, E. I. Ultrastructure of Exospore Formation in *Streptomyces* Revealed by Cryo-Electron Tomography. **Front Microbiol.**, v. 11, 2020.

SHAIKHPOUR, M.; SADEGHI, A.; YAZDIAN, F.; MANSOORI, A.; MOVAFAGH, A. Anticancer and Apoptotic Effects of Ectoine and Hydroxyectoine on Non-Small Cell Lung Cancer cells: An in-vitro Investigation. **Multidiscip. cancer investig.**, v. 3, p. 14 - 19, 2019.

SHEN, B.; DU, L.; SANCHEZ, C.; EDWARDS, D. J.; CHEN, M.; MURRELL, J. M. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 27, p. 378 – 385, 2001.

SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, p. 3210 - 3212, 2015.

SOTTORFF, I.; WIESE, J.; LIPFERT, M.; PREUßKE, N.; SÖNNICHSEN, F. D.; IMHOFF, J. F. Different Secondary Metabolite Profiles of Phylogenetically almost Identical *Streptomyces griseus* Strains Originating from Geographically Remote Locations. **Microorganisms**, v. 7, p. 2076-2607, 2019.

SULC, M.; FADRHNCOVA, I.; JELINKOVA, M.; CHUDOMELOVA, M.; FELSBERG, J.; OLSOVSKA, J. Determination of sibiromycin and its natural derivatives using new analytical and structural approaches. **J Chromatogr A.**, v. 1218, p. 83 – 91, 2011.

SUNG, A. A.; GROMEK, S. M.; BALUNAS, M. J. Upregulation and Identification of Antibiotic Activity of a Marine-Derived *Streptomyces* sp. via Co-Cultures with Human Pathogens. **Mar Drugs**, v. 15, 2017.

TAKADA, K.; NINOMIYA, A.; NARUSE, M., SUN, Y.; MIYAZAKI, M., NOGI, Y.; OKADA, S.; MATSUNAGA, S. Surugamides A–E, Cyclic Octapeptides with Four d-Amino Acid Residues, from a Marine *Streptomyces* sp.: LC–MS-Aided Inspection of Partial Hydrolysates for the Distinction of d- and l-Amino Acid Residues in the Sequence. **J Org Chem.**, v. 78, p. 6746 – 6750, 2013.

TANGERINA, M.M.P.; FURTADO, L.C.; LEITE, V.M.B.; BAUERMEISTER, A.; VELASCO-ALZATE, K.; JIMENEZ, P.C.; GARRIDO, L.M.; PADILLA, G.; LOPES, N.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, M.J.P. Metabolomic study of marine

Streptomyces sp.: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds. **PLoS ONE**, v. 15, e0244385, 2020.

TATUSOVA, T.; DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A.; CHETVERNIN, V.; NAWROCKI, E.P.; ZASLAVSKY, L.; LOMSADZE, A.; PRUITT, K.D.; BORODOVSKY, M.; OSTEY, J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Res.**, v. 44, p. 6614-6624, 2016.

THURSTON, D. E.; BOSE, D. S.; HOWARD, P. W.; JENKINS, T. C.; LEONI, A.; BARALDI, P. G.; GUIOTTO, A.; CACCIARI, B.; KELLAND, L. R.; FOLOPPE, M. P.; RAULT, S. Effect of A-ring modifications on the DNA-binding behavior and cytotoxicity of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. **J Med Chem.**, 1999.

VICENTE, C. M.; THIBESSARD, A.; LORENZI, J-N.; BENHADJ, M.; HÔTEL, L.; GACEMI-KIRANE, D.; LESPINET, O.; LEBLOND, P.; AIGLE, B. Comparative Genomics among Closely Related *Streptomyces* Strains Revealed Specialized Metabolite Biosynthetic Gene Cluster Diversity. **Antibiotics**, v. 7, 2018.

VOLFF, J. N.; ALTENBUCHNER, J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. **Mol Microbiol.**, v. 5, p. 233 – 235, 1998.

WAKSMAN, S. A.; HENRICI, A. T. The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. **J Bacteriol.**, v. 46, n. 4, p. 337 – 341, 1943.

WANG, S.; GAI, Y.; ZHANG, S.; KE, L.; MA, X.; XIANG, G. Synthesis and evaluation of a class of 1,4,7-triazacyclononane derivates as iron depletion antitumor agents. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 28, p. 117 - 121, 2018.

WANG, L.; LI, X.; MU, Y.; LU, C.; TANG, S.; LU, K.; QIU, X.; WEI, A.; CHENG, Y.; WEI, W. The iron chelator desferrioxamina synergizes with chemotherapy for cancer treatment. **J Trace Elem Med Biol.**, v. 56, p. 131 - 138, 2019.

WATVE, M. G.; TICKOO, R.; JOG, M. M.; BHOLE, B. D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Arch Microbiol.**, v. 176, p. 386 – 390, 2001.

World Health Organization (WHO), 2018. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: maio 2022.

XU, F.; NAZARI, B.; MOON, K.; BUSHIN, L. B.; SEYEDSAYAMDOST, M. R. Discovery of a Cryptic Antifungal Compound from *Streptomyces albus* J1074 Using High-Throughput Elicitor Screens. **J Am Chem Soc.**, v. 139, p. 9203 – 9212, 2017.

XU, L.; YE, K.-X.; DAI, W.-H.; SUN, C.; XU, L.-H.; HAN, B.-N. Comparative Genomic Insights into Secondary Metabolism Biosynthetic Gene Cluster Distributions of Marine *Streptomyces*. **Mar Drugs**, v. 17, p. 498, 2019.

YANG, Z.; HE, J.; WEI, X.; JU, J.; MA, J. Exploration and genome mining of natural products from marine *Streptomyces*. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 104, p. 67–76, 2020.

YE, S.; MOLLOY, B.; BRAÑA, A. F.; ZABALA, D.; OLANO, C.; CORTÉS, J.; MORÍS, F.; SALAS, J. A.; MÉNDEZ, C. Identification by Genome Mining of a Type I Polyketide Gene Cluster from *Streptomyces argillaceus* Involved in the Biosynthesis of Pyridine and Piperidine Alkaloids Argimycins P. **Front Microbiol.**, v. 8, 2017.

YONEMOTO, I. T.; LI, W.; KHULLAR, A.; REIXACH, N.; GERRATANA, B. Mutasynthesis of a Potent Anticancer Sibiromycin Analogue. **ACS Chem Biol.**, v. 7, p. 973 - 977, 2012.

ZABURANNYI, N.; RABYK, M.; OSTASH, B.; FEDORENKO, V.; LUZHESTSKYY, A. Insights into naturally minimized *Streptomyces albus* J1074 genome. **BMC Genomics**, v. 15, 2014.

ZALLOT, R.; OBERG, N.O.; GERLT, J. A. 'Democratized' genomic enzymology web tools for functional assignment. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 47, p. 77 - 85, 2018.

ZALLOT, R.; OBERG, N.; GERLT, J. A. The EFI Web Resource for Genomic Enzymology Tools: Leveraging Protein, Genome, and Metagenome Databases to Discover Novel Enzymes and Metabolic Pathways. **Biochemistry**, v. 58, p. 4169 - 4182, 2019.

ZERIKLY, M.; CHALLIS, G. L. Strategies for the Discovery of New Natural Products by Genome Mining. **ChemBioChem**, v. 10, p. 625 - 233, 2009.

ZHANG, B.; ZHU, T. *Streptomyces sampsonii* strain KJ40 chromosome, complete genome. 2016. Disponível em:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP016824.1. Acesso em: maio 2022.

ZHAO, Q.; WANG, L.; LUO, Y. Recent advances in natural products exploitation in *Streptomyces* via synthetic biology. **Eng Life Sci.**, v. 19, pp. 452-462, 2019.

ZIEMERT, N.; ALANJARY, M.; WEBER, T. The evolution of genome mining in microbes - a review. **Nat Prod Rep.**, v. 33, p. 988 – 1005, 2016.