

LAURA ALEJANDRA RIVAS ARENAS

Biologia estrutural de enzimas relacionadas com a formação do grupo (S)-4-amino-2-hidroxitirato (AHBA) durante a biossíntese de butirato

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. Marcio Vinícius Bertacine Dias

Versão corrigida

São Paulo

2020

RESUMO

RIVAS L.A. **Biologia estrutural de enzimas relacionadas com a formação do grupo (S)-4-amino-2-hidroxi-butirato (AHBA) durante a biossíntese de butirosina.** 2020. 73 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A butirosina é um aminoglicosídeo produzido por *Bacillus circulans* que apresenta um grupo (S)-4-amino-2-hidroxi-butirato (AHBA) ligado à aglicona 2-deoxiestreptamina (2-DOS). A presença do grupo AHBA é capaz de diminuir a suscetibilidade do antibiótico às enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) produzidas por bactérias patogênicas. Porém, a biossíntese do grupo AHBA é pouco compreendida. Com a intenção de entender a biossíntese desse grupo, estudamos estruturalmente duas enzimas desta via: a BtrJ que catalisa a ligação de uma molécula de L-glutamato com a *holo*-BtrI, uma proteína carreadora de peptidil (PCP); e a BtrK que descarboxila o intermediário da reação anterior. As enzimas foram super expressas em células competentes de *E. coli* e posteriormente purificadas por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. Foram realizados ensaios de cristalização mediante as técnicas de difusão de vapor para as proteínas nativas e em presença do sus cofatores. Obtivemos cristais da BtrK e BtrJ que foram difratados em fonte de luz Síncrotron. Os cristais da BtrK pertencem ao grupo espacial P2₁2₁2. A estrutura da BtrK foi determinada mediante substituição molecular. Estruturalmente, a BtrK apresenta dois domínios: um barril TIM e um barril β sanduíche que interagem entre si. A dimerização acontece pela interação de domínios entre dois monómeros constituindo dois sítios ativos. Um resíduo de lisina Lys49 conservado forma uma base Schiff com o cofator piridoxal-5'-fosfato (PLP). O sítio ativo é altamente conservado quando comparado com enzimas homólogas, sendo principalmente hidrofóbico e com um potencial eletropositivo. De acordo com os ensaios de ancoragem molecular, o L-glutamato, substrato parcial da BtrK, não interage diretamente com o PLP, mas faz ligações com resíduos próximos que podem ajudar na sua estabilização no bolsão catalítico. Não foi possível detectar um sinal anômalo derivado da incorporação de metais pesados para a BtrJ, mas obtivemos cristais promissores com incorporação de selenometionina. Mediante ensaios de DSF, pudemos inferir a necessidade de *holo*-BtrI para a formação de um complexo estável com a BtrJ.

Palavras chave: Produtos naturais. Aminoglicosídeos. Butirosina. AHBA. Cristalografia.

ABSTRACT

RIVAS L.A. **Structural biology of enzymes involved in the (S)-4-amino-2-hydroxybutyrate (AHBA) biosynthesis from the aminoglycoside butirosin.** 2020. 73 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Butirosin is an aminoglycoside produced by *Bacillus circulans* which has a (S)-4-amino-2-hydroxybutyrate (AHBA) moiety bonded to a 2-deoxystreptamine (2-DOS) aglycone. The presence of AHBA decreases the antibiotic susceptibility to aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) produced by pathogenic bacteria. However, the several points of the biosynthesis of AHBA remain unclear. With the objective to understand the biosynthesis of this chemical group, herein we perform a structural study of two enzymes of this pathway: BtrJ which catalyses the bounding of a L-glutamate molecule with the *holo*-BtrI, a peptidyl carrier protein (PCP); and BtrK which decarboxylates the intermediary of BtrJ's reaction. The enzymes were overexpressed in *E. coli* competent cells and purified by affinity chromatography followed by size exclusion chromatography. Crystallization assays were performed through vapor diffusion technique for the proteins in their native conformations as well as in the presence of their cofactors. BtrK and BtrJ crystals were obtained and were exposed to X-ray to obtain diffraction data in the Synchrotron light source. BtrK protein crystals belong to P2₁2₁2 space group. Phasing was done by molecular replacement and two domains were identified: one TIM barrel and another β -sandwich interacting between themselves. Dimerization occurs with the interaction of the domains between two monomers that constitutes two active sites. A conserved lysine Lys49 residue forms a Schiff base with pyridoxal-5'-phosphate (PLP) cofactor. Active site is highly conserved when compared to homologous enzymes, being mostly hydrophobic and electropositive. According to the molecular docking assays, L-glutamate, partial BtrK's substrate, does not interact directly with the PLP, but bonds with nearby residues that can aid stabilize it in the catalytic pocket. It was not possible to identify an anomalous scattering from the heavy metal soaking for BtrJ crystals, however, we obtained promising crystals with selenomethionine incorporation. Through DSF experiments, we inferred the need for *holo*-BtrI for the formation of a stable complex with BtrJ.

Keywords: Natural products. Aminoglycosides. Butirosin. AHBA. Crystallography.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Produtos naturais*

Vários produtos naturais são agentes anticancerígenos e antibióticos importantes devido à sua diversidade e propriedades farmacológicas. Estes compostos bioativos são produtos do metabolismo secundário principalmente de plantas, fungos, actinomicetos e cianobactérias, capazes de interagir com alvos essenciais de diferentes organismos. Os efeitos destas moléculas incluem uma grande variedade de ações biológicas, incluindo a modulação do canal de sódio, inibição de proteases e inibição de vias biossintéticas (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006; HARVEY, 2008). Desta forma, produtos naturais também podem ser usados como agentes imunossuppressores, hipocolesterolêmicos, antifúngicos, anti-inflamatórios, entre outras aplicações médicas e veterinárias.

Os produtos naturais apresentam grandes vantagens, entre elas a sua novidade e diversidade estrutural pois seus centros quirais, anéis e grupos funcionais são mais complexos do que compostos sintéticos (ZHANG; DEMAINE, 2005). Essas moléculas, também, têm evoluído para se ligar a novos alvos já que são selecionados pela natureza para interações específicas. Apesar dos produtos naturais serem amplamente inexplorados, podem direcionar o desenho de compostos sintéticos gerando análogos com melhores propriedades farmacológicas (HARVEY, 2008) e ainda podem apresentar novos mecanismos de ação não descobertos (ZHANG; DEMAINE, 2005).

Geralmente os genes responsáveis pela biossíntese de produtos naturais estão localizados em agrupamentos gênicos que levam à transcrição de diferentes classes de enzimas envolvidas em sua biossíntese, transporte e resistência (WRIGHT, 2014). Entre estas enzimas, é comum encontrar glicosiltransferases, aminotransferases e deoxiredutases que são capazes de transformar moléculas intermediárias da via glicolítica ou derivados de acetil-CoA, em compostos altamente funcionalizados, como os aminoglicosídeos e policetídeos.

A exploração dos produtos naturais permitiu o seu reconhecimento como uma fonte potencial de moléculas antibióticas. A maioria de antibióticos de uso clínico implementados nos últimos 70 anos, são produtos naturais sintetizados por diferentes microrganismos como uma resposta de adaptação ao seu ambiente. Isso acontece especificamente na fase estacionária, quando os microrganismos precisam competir por espaço e nutrientes o que leva à ativação de

genes que codificam enzimas capazes de produzir tais moléculas (WALSH, 2003; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Os antibióticos ou antimicrobianos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação que interferem na: (1) biossíntese da parede celular como os β -lactâmicos; (2) biossíntese de proteínas como os aminoglicosídeos; (3) replicação do DNA e reparo como as quinolonas e (4) biossíntese de folato como as sulfonamidas (**Figura 1**) (WALSH, 2003).

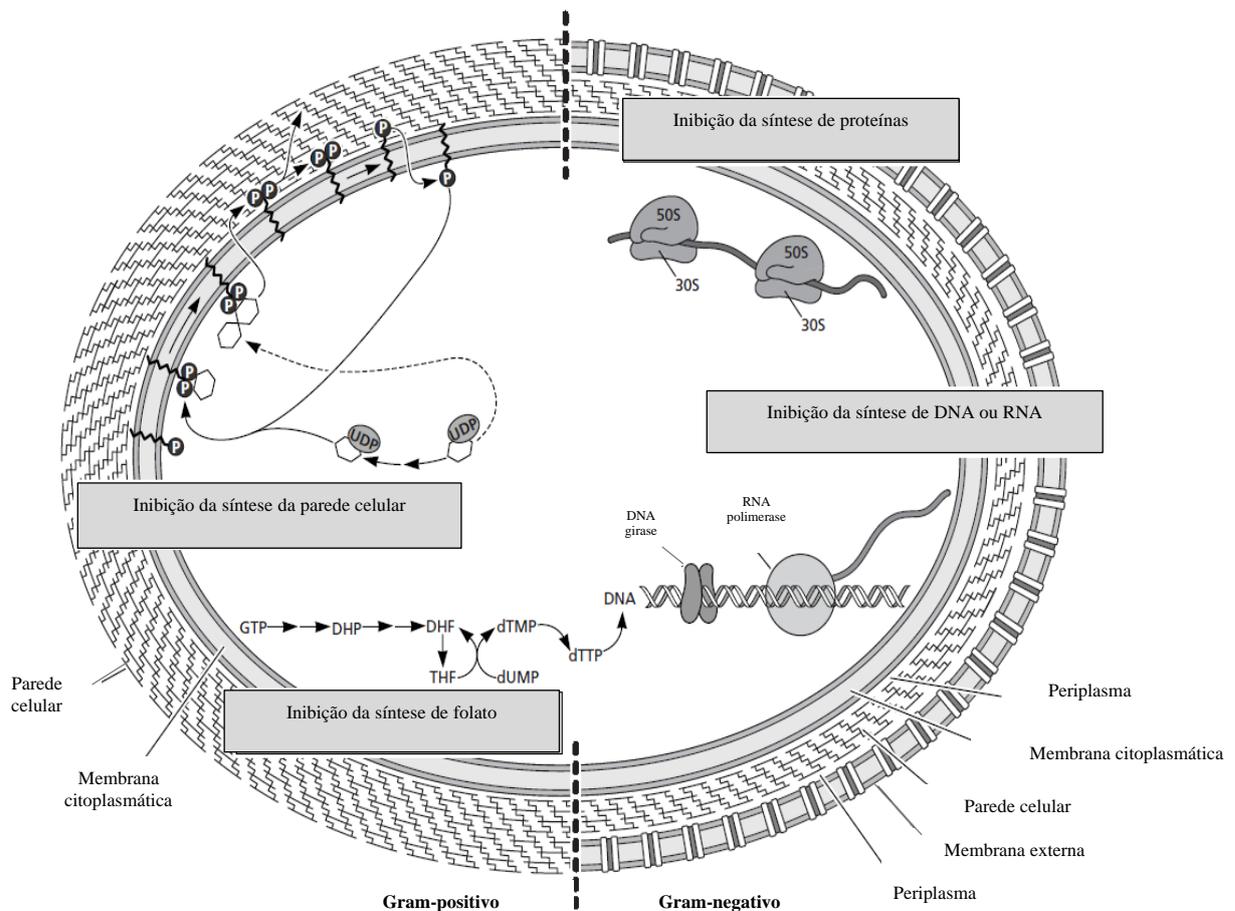


Figura 1. Principais mecanismos de ação dos antimicrobianos.

Os antimicrobianos atuam sobre diferentes organelas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas causando uma perda da estabilidade celular. Imagem adaptada de Walsh, 2003.

Clinicamente, entre os antibióticos mais utilizados encontram-se os poliketídios, peptídeos não ribossomais e aminoglicosídeos (PHAM et al., 2019). Tanto os poliketídios como os peptídeos não ribossomais são primariamente produzidos por megasintases que consistem em múltiplos domínios organizados em módulos que adicionam progressivamente unidades extensoras ligadas na fosfopanteteína de uma proteína carreadora de acila (ACP do inglês *acyl*

carrier protein) ou uma proteína carreadora de peptidil (PCP do inglês *peptidyl carrier protein*). A diversidade destas moléculas depende de enzimas como as cetossintases, que são capazes de incorporar uma ampla variedade de unidades extensoras naturais e não naturais e cetoreduases que reduzem estereoespecificamente as β -carbonilas (TIBREWAL; TANG, 2014).

Após a montagem da aglicona ou o antibiótico em maturação, podem acontecer mudanças que transformem a molécula em um composto ativo. Essa ação é coordenada por enzimas conhecidas como “alfaiates” (*tailoring enzymes* em inglês) que realizam a adição de diferentes grupos funcionais como grupos amino, amidos, acetil, açúcares e átomos de halogênio. Estes contribuem não só com a diversidade estrutural, mas também com o reconhecimento de novos alvos, com a solubilidade e com a estabilidade das moléculas (TIBREWAL; TANG, 2014). Além disso, as enzimas alfaiates podem ainda, realizar modificações dos grupos químicos nas cadeias policetílicas através de reduções ou oxidações (NGUYEN et al., 2013; TIBREWAL; TANG, 2014).

1.1.1 Ferramentas de exploração de produtos naturais

A descoberta de novos antibióticos tem se tornado essencial no combate às diferentes bactérias multi-resistentes, à aparição de novas doenças e à geração de moléculas menos tóxicas, criando uma necessidade para o estudo de novos alvos biológicos. Graças ao desenvolvimento de diferentes instrumentos e de plataformas como a triagem de alto desempenho (HTS do inglês *High-Throughput Screening*), hoje é possível realizar uma avaliação dos compostos de uma maneira mais rápida e econômica (ZHANG; DEMAIN, 2005). Porém, para a exploração dos produtos naturais como fonte farmacêutica, deve-se superar alguns desafios como o isolamento de microrganismos não cultiváveis, a caracterização de um volume grande de moléculas, a escassa produção do composto ativo e a redundância dos metabólitos estudados (WRIGHT, 2014).

Portanto, existem diferentes estratégias amplamente estudadas para superar esses problemas, como a exploração sistemática dos ecossistemas através de novas técnicas de coleta que permitem o crescimento e isolamento de espécies representativas de uma população (ZHANG; DEMAIN, 2005). Também tem sido implementada a expressão de DNA do ambiente em hospedeiros heterólogos que permite a inserção de novos agrupamentos gênicos e consequentemente a produção heteróloga dos metabólitos desejados (ZHANG; DEMAIN,

2005; CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006; HARVEY, 2008). Do mesmo modo, a manipulação e diversificação das condições fisiológicas dos microrganismos facilita a geração de diferentes compostos químicos. O uso de cepas geneticamente modificadas que produzem compostos microbianos ‘não naturais’ derivados de compostos naturais também tem permitido o desenvolvimento de várias novas moléculas bioativas. Isso ocorre graças a técnicas de biossíntese combinatorial onde há uma troca de genes presentes nos agrupamentos que geram vias biossintéticas híbridas permitindo a síntese de novas moléculas (HARVEY, 2008; PHAM et al., 2019). Igualmente, a implementação de técnicas como espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS), cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD) permitem a comparação dos perfis de metabólitos em uma amostra que facilita a construção de bibliotecas de produtos naturais (ZHANG; DEMAIN, 2005).

Finalmente, o desenvolvimento e avanço da biologia estrutural tem permitido uma melhor exploração da engenharia de proteínas que auxilia na elucidação de mecanismos catalíticos (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Estudos estruturais permitem a visualização de modos de ligação de substratos facilitando o processo de descoberta de um novo candidato tanto na triagem inicial como nas etapas de otimização (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Ferramentas bioinformáticas também são utilizadas para prever quais microrganismos poderão produzir novos compostos químicos com base nas sequências de genes presentes nos agrupamentos gênicos ortólogos (HARVEY, 2008).

Assim, a integração da bioquímica e biologia estrutural tem contribuído enormemente na pesquisa e no desenvolvimento de novas moléculas naturais e sintéticas. Por exemplo, Bury et al., 2007 elucidou as bases estruturais do mecanismo de metilação de uma *N*- metiltransferase na biossíntese de gentamicina, bem como mostrado que essa enzima é promiscua para a interação com outros aminoglicosídeos gerando novos derivados de canamicina e tobramicina (BURY et al., 2017).

1.2 Aminoglicosídeos (AGs)

A exploração de pequenos compostos bioativos em microrganismos do solo permitiu a descoberta da estreptomicina, o primeiro aminoglicosídeo a ser caracterizado (ARYA, 2007). Isso conduziu à consolidação da indústria biofarmacêutica moderna e ao isolamento de diferentes moléculas de bactérias do solo e de outros ambientes com propriedades importantes no tratamento de doenças, sejam elas infecciosas ou não (ARYA, 2007). A estreptomicina,

isolada de *Streptomyces griseus*, foi introduzida para uso clínico em 1944 e nos anos posteriores foram implementados outros aminoglicosídeos como a canamicina, gentamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina e ampicacina, isolados de diferentes espécies de *Streptomyces* e *Micromonospora* (KRAUSE et al., 2016).

Os AGs são antibióticos de amplo espectro altamente aminos que se unem irreversivelmente à unidade ribossomal 30S interferindo na leitura do código genético e produzindo sequências proteicas erradas (**Figura 2A**). Também podem interferir na ligação do tRNA com o respectivo rRNA na tradução ou impedido a translocação do tRNA do sítio-A ao sítio-P (**Figura 2B**) (EDSON; TERRELL, 1999)(KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000).

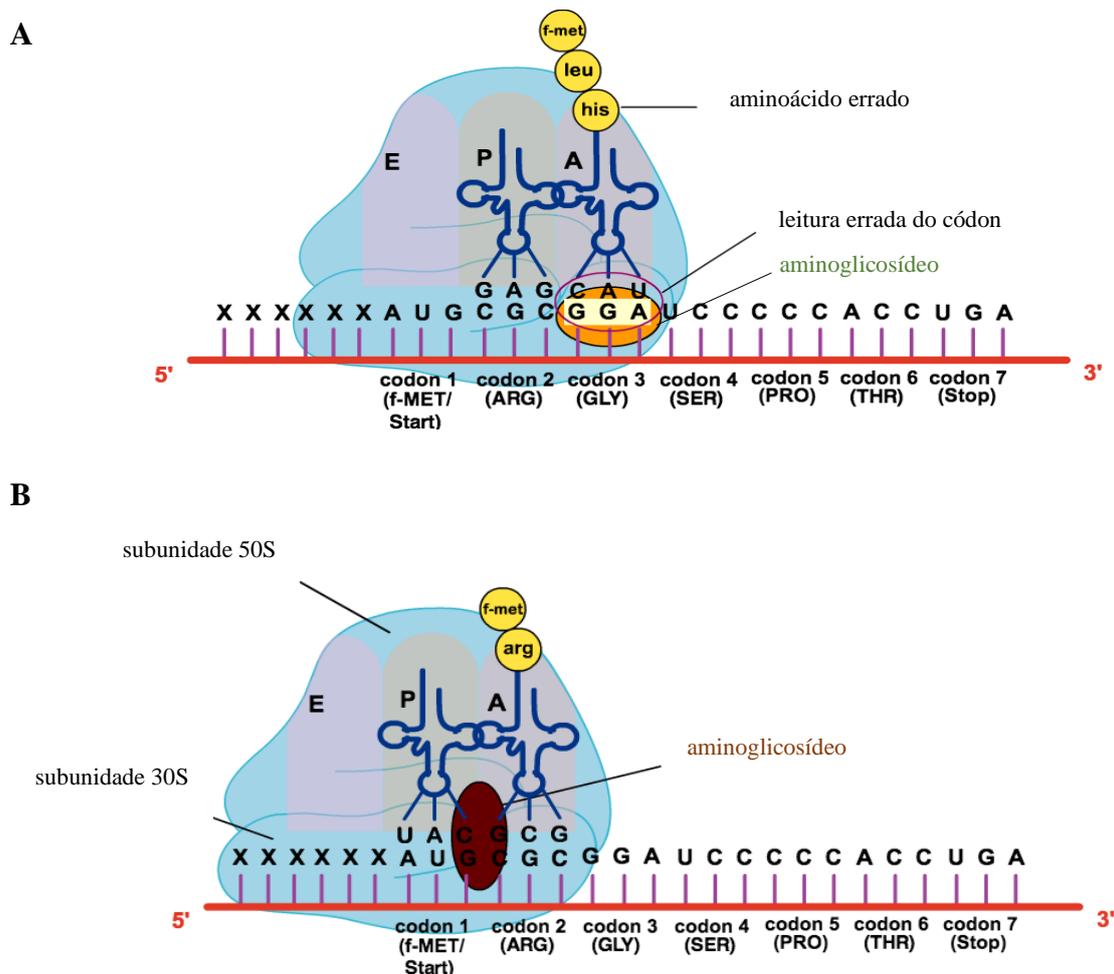


Figura 2. Mecanismos de ação dos aminoglicosídeos.

(A) O antibiótico se liga irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo causando a leitura errada do códon afetando a síntese da proteína. (B) O antibiótico interfere com a translocação do tRNA do sítio-A para o sítio-P. Imagem adaptada de Kaiser, Gary (Community College of Baltimore).

Os AGs apresentam grupos amino que são carregados positivamente e interagem com os componentes da membrana bacteriana carregados negativamente (como fosfolipídios e ácidos teicóicos), deslocando íons de magnésio que levam à ruptura da membrana externa para facilitar a entrada do antibiótico (KRAUSE et al., 2016). Uma vez que o AG se encontra no citoplasma, acontece a inibição da síntese de proteínas ou a geração de proteínas erradas causando a morte celular (KUDO; EGUCHI, 2009a; KRAUSE et al., 2016).

Estes antibióticos geralmente são eficazes para o tratamento de infecções graves causadas por ambas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e são particularmente eficazes no combate às enterobactérias (KRAUSE et al., 2016). Também apresentam boa atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra *Mycobacterium* spp, sendo a estreptomicina o primeiro tratamento efetivo contra a tuberculose (EDSON; TERRELL, 1999; KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000; ARYA, 2007; KUDO; EGUCHI, 2009a; KRAUSE et al., 2016).

As estruturas dos AGs, apresentam ligações glicosídicas entre as posições 4 e 5 ou 4 e 6 de um ciclitol e diferentes aminoaçúcares, e são altamente funcionalizados por diversas enzimas que rendem estruturas químicas complexas. De acordo com o tipo de ciclitol ou aglicona que apresentam no centro da estrutura, os AGs podem ser classificados em aqueles derivados da 2-deoxiestreptamina (2-DOS) (**Figura 3A**) e os derivados do *mio*-inositol (**Figura 3B**) (KUDO; EGUCHI, 2009b). As duas estruturas são derivadas da glicose-6-fosfato, que mediante a ação de diferentes enzimas, geram os núcleos dos AGs.

Os genes responsáveis pela produção dos AGs estão organizados em agrupamentos gênicos, embora alguns genes de resistência tenham sido encontrados fora desta região (**Figura 4**). A descoberta dos genes *btr* da butirosina, impulsionou a exploração de agrupamentos gênicos da família de AGs derivados da 2-DOS (KUDO; EGUCHI, 2009b). Nesta família, é identificado um grupo de 7 enzimas conservadas (2DOI sintase, L-glutamina:2DOI aminotransferase, desidrogenase NAD-dependente, glicosiltransferase, deacetilase, desidrogenase FAD-dependente e uma aminotransferase) associadas à biossíntese da estrutura em comum da neamina, tanto dos AGs 4,5-disubstituídos (e.g. butirosina e neomicina) como dos 4,6-disubstituídos (e.g. canamicina, tobramicina e gentamicina) (ARYA, 2007; KUDO; EGUCHI, 2009a) (**Figura 4 e 5**).

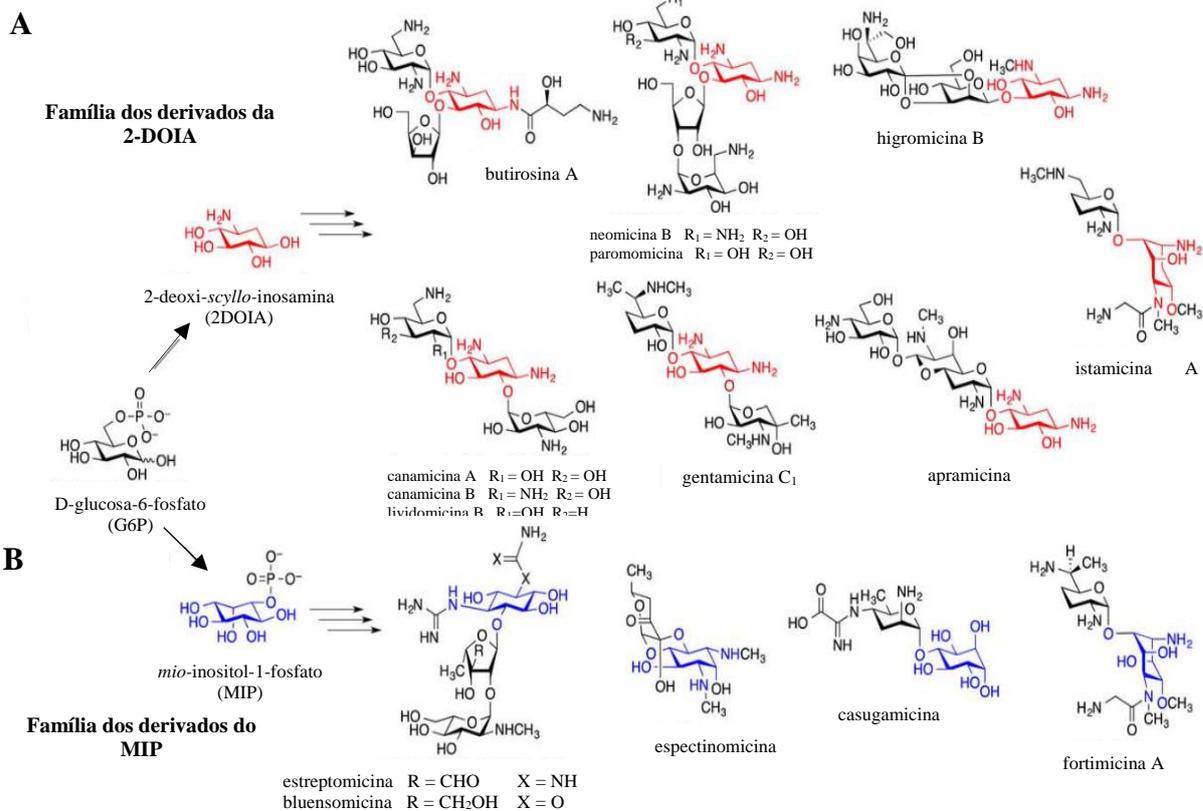


Figura 3. Classificação dos aminoglicosídeos de acordo com o aminociclitol.

(A) Família dos derivados da 2-deoxiestreptamina (2-DOS) identificada em vermelho que compreende a maioria dos AGs. (B) Família dos derivados do mio-inositol-1-fosfato (MIP) identificado em azul. Imagem adaptada de Kudo e Eguchi, 2016.

A 2-DOI sintase permite a formação do intermediário 2-deoxi-scilo-inonosa (2DOI) a partir da glicose-6-fosfato, que posteriormente é convertido em 2-deoxi-scilo-inosamina (2DOIA) pela ação de uma aminotransferase (**Figura 5**). No agrupamento gênico para a butirosina, a aminotransferase é nomeada BtrR, uma enzima dimérica dependente de PLP que apresenta similaridade estrutural com outras aminotransferases de aspartato associadas ao metabolismo secundário (POPOVIC et al., 2006). Em seguida, uma desidrogenase dependente de NAD atua sobre o C-1 que gera o amino-DOI (KUDO et al., 2005). No caso da butirosina, a enzima responsável pela desidrogrenação é a BtrN, uma radical SAM que pertence a um grupo de proteínas que catalisa uma grande diversidade de reações (WANG; FREY, 2007). Novamente, a 2-DOI aminotransferase ajuda na biossíntese do aminociclitol 2-DOS que posteriormente é glicosilado mediante uma glicosiltransferase estruturando o intermediário *N*-acetilparomamina com a adição de uma molécula de *N*-acetil-*D*-glucosamina (YOKOYAMA

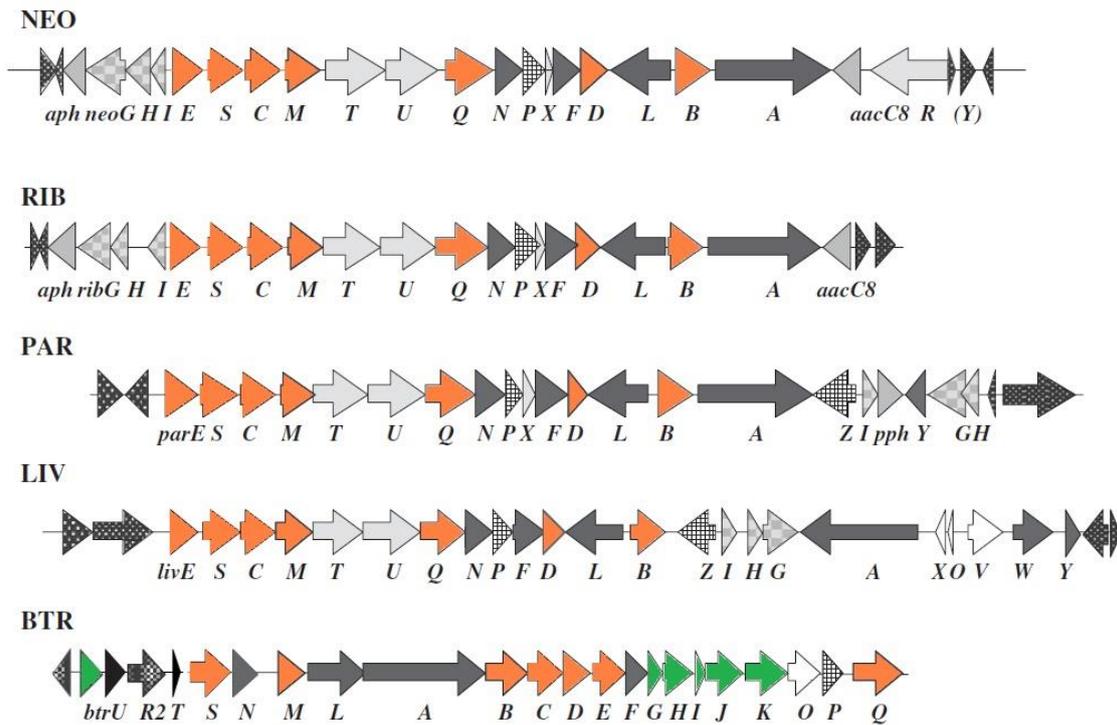


Figura 4. Agrupamentos gênicos da família de aminoglicosídeos derivados da neomicina. NEO neomicina, RIB ribostamicina, PAR paramomicina, LIV livodomocina e BTR butirosina. Em laranja, os genes associados com a formação da neomicina. Em verde, os 7 genes responsáveis pela codificação das enzimas envolvidas na biossíntese do grupo AHBA. Imagem adaptada de Arya, 2007.

et al., 2008). A 2'-N-acetilparomamina deacetilase remove o grupo N-acetil produzindo a paromamina, sobre a qual atua uma desidrogenase que oxida o C-6' para finalmente formar a neamina graças à intervenção de outra aminotransferase. A neamina é convertida em ribostamicina pela intervenção de 2 enzimas, uma fosforibosiltransferase e fosforibostamicina fosfatase. Esta é a via em comum para a biossíntese de AGs derivados da via do 2-DOS, especificamente os ribosilados como a neomicina e a butirosina, cuja estrutura final vai depender de genes exclusivos para cada agrupamento gênico.

1.2.1 Mecanismos de resistência e toxicidade

Apesar dos aminoglicosídeos apresentarem excelentes características como agentes bactericidas de amplo espectro, a resistência microbiana tem reduzido o interesse nestas moléculas. A resistência pode acontecer por 3 mecanismos: (1) a modificação das proteínas ribossomais devido a mutações pontuais no rRNA 16S (ARYA, 2007); (2) o surgimento de cepas mutantes deficientes da cadeia transportadora de elétrons incapazes de internalizar o

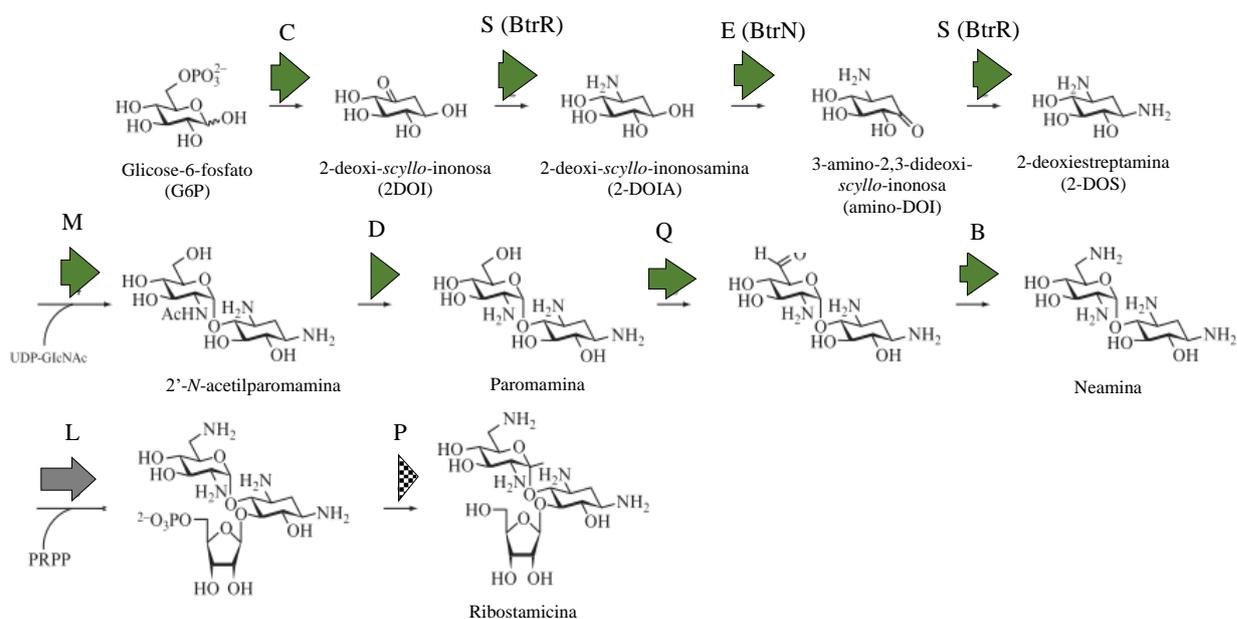


Figura 5. Biossíntese da estrutura comum da neamina da família dos AGs derivados da 2-DOS.

As enzimas estão identificadas em laranja de acordo com os genes da Figura 4. O nome das enzimas depende do aminoglicosídeo correspondente, por exemplo para a butirosina o prefixo é Btr. Posterior à ação da neamina, ilustra-se a ação de outras duas enzimas (L e P) encarregadas de estruturar a ribostamicina. Imagem adaptada de Kudo, Eguchi, 2009a.

aminoglicosídeo, assim como a presença de bombas de efluxo que liberam os antibióticos fora da célula (ARYA, 2007); e (3) a alteração do antibiótico devido às enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (KUDO; EGUCHI, 2016). Estas enzimas têm se espalhado pelas comunidades bacterianas, uma vez que muitos dos genes que as codificam são encontrados em elementos genéticos móveis como transposons e plasmídeos facilitando a geração de novas variantes enzimáticas capazes de aceitar novos aminoglicosídeos como substratos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). As EMAs mais representativas estão identificadas na **Figura 6** e podem ser classificadas em 3 grupos principais:

- N-acetiltransferases (AACs): presentes em Gram-positivas e Gram-negativas com um amplo perfil de resistência aos aminoglicosídeos (ARYA, 2007). Dependendo do subgrupo, estas enzimas podem acetilar os grupos nas posições 1 (AAC(1')) e 3 (AAC(3')) do anel 2-DOS (KRAUSE et al., 2016). A ACC(1') é encontrada em *E. coli* e pode catalisar a acetilação de aminoglicosídeos como a butirosina e a diacetilação da ribostamicina e neomicina (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). As AAC(6') são as mais comuns e os seus genes foram reportados em plasmídeos, cromossomos e elementos genéticos móveis.

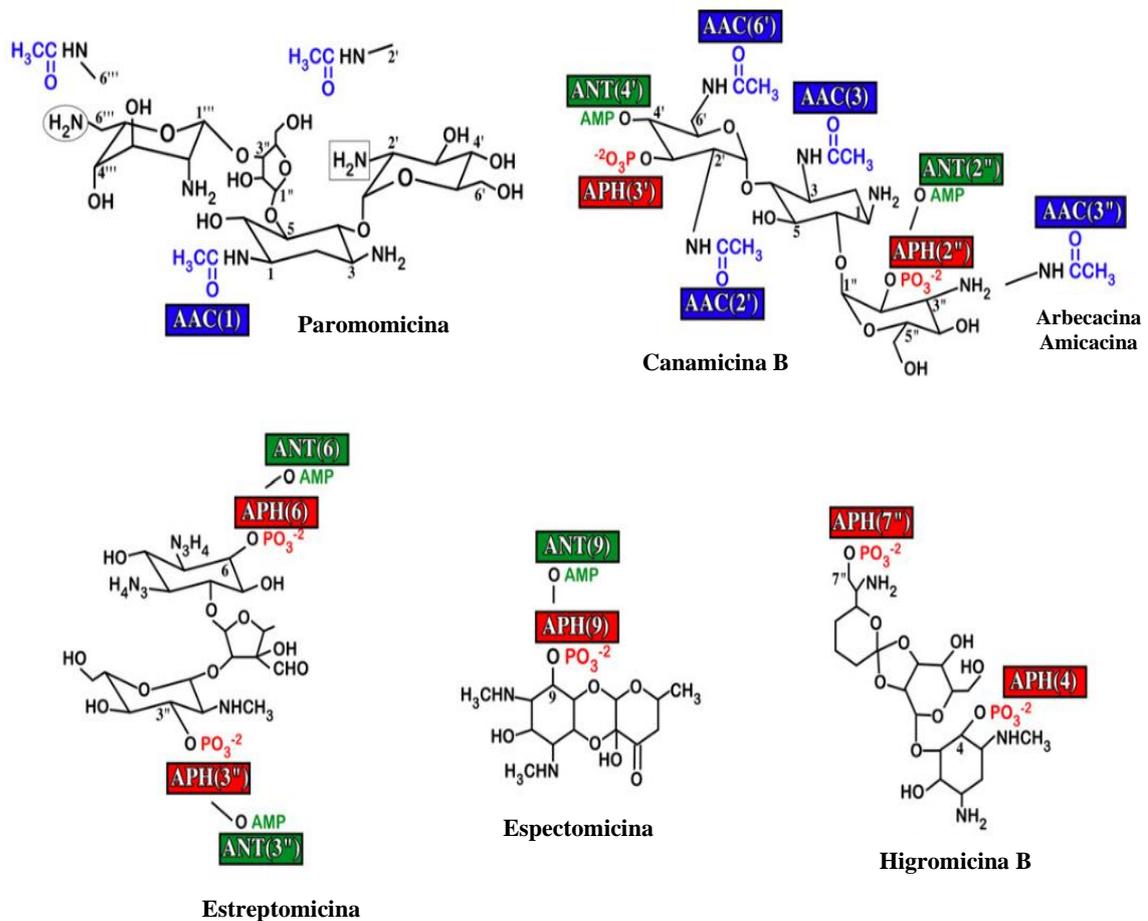


Figura 6. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) mais representativas.

Em azul as *N*-acetiltransferases (AACs) que catalisam a acetilação do antibiótico nas posições 1, 3, 2 ou 6'. Em verde as *O*-nucleotidiltransferases (ANTs) que catalisam a adenililação nas posições 6, 9, 4', 2'' ou 3''. Em vermelho as *O*-fosfotransferases (APHs) que transferem um grupo fosfato nas posições 4, 6, 9, 3', 2'', 3'' e 7''. Imagem tomada de Ramirez e Tomalsky, 2010.

- *O*-nucleotidiltransferases (ANTs): estas enzimas são dímeros obrigatórios na qual cada subunidade interage com o substrato formando um complexo Mg-ATP, seguido pela ligação ao aminoglicosídeo permitindo a transferência do grupo adenila. Assim, a molécula adenilada é liberada. As duas subunidades geram uma carga negativa na superfície da enzima que atrai o aminoglicosídeo carregado positivamente (ARYA, 2007). As ANT(3'') são as mais comuns e conferem resistência à espectomicina e estreptomicina (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).
- *O*-fosfotransferases (APHs): estão presentes em Gram-positivas e realizam uma fosforilação nos grupos hidroxilas dependente de ATP, perdendo a capacidade de formar pontes de hidrogênio com resíduos do rRNA (KRAUSE et al., 2016). Apresentam dois domínios: o N-terminal que é responsável pela ligação de ATP e

o C-terminal que fornece o sítio de reconhecimento do aminoglicosídeo onde acontece a transferência do fosfato (ARYA, 2007). Entre as APHs mais comuns, estão as APH(3') que evidenciaram ser efetivas na modificação de diversos AGs como canamicina, neomicina, butirosina, ribostamicina, etc (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Adicionalmente à resistência, as características nefrotóxicas e ototóxicas dos AGs têm reduzido drasticamente o interesse no uso destes antibióticos. Os AGs têm uma forte afinidade e seletividade com os fosfolípidios do rim causando uma forte absorção do medicamento. Também, podem estar envolvidos em mecanismos enzimáticos de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem destruir células ciliadas no ouvido devido a quelação de íons metálicos que regulam as vias de morte celular (WALSH, 2003; ARYA, 2007). A ação tóxica deve-se às cargas positivas dos AGs em um pH fisiológico que os permite se ligar a uma variedade de componentes celulares carregados negativamente. Os efeitos adversos foram percebidos inicialmente com a introdução da estreptomicina, mas posteriormente foram constatados em outros AGs como a gentamicina, canamicina e amicacina. (KUDO; EGUCHI, 2009b, 2016).

Mesmo que os AGs apresentem numerosas adversidades, estes antibióticos ainda são a primeira escolha para o tratamento de diferentes doenças infecciosas, apresentando um amplo espectro de atividade que melhora quando atuam sinergicamente com outros antimicrobianos. Embora sejam numerosos e altamente eficazes, os mecanismos de resistência para os AGs são bem estudados o que facilita a pesquisa de estratégias para combatê-los. A combinação com β -lactâmicos é efetiva contra sepse severas e infecções nosocomiais e são importantes em terapia de combinação para infecções tuberculoso-resistentes (KRAUSE et al., 2016). Adicionalmente, a otimização da dosagem dos AGs pode contribuir para a redução da sua toxicidade mantendo a eficiência do antibiótico (KRAUSE et al., 2016).

O desenvolvimento de moléculas que evitem esses contratempos, especialmente os mecanismos de resistência, tem sido amplamente empregado para a geração de novos AGs. É o caso da plazomicina, um aminoglicosídeo que foi projetado a partir da sisomicina com uma modificação na posição N-1 pela adição de um grupo ácido hidroxilaminobutírico que impede a ação da AAC(3), ANT(2'') e APH (2'') e que conferem resistência à gentamicina e tobramicina (KRAUSE et al., 2016). Adicionalmente, a plazomicina não apresenta grupos hidroxila nas posições 3' e 4' protegendo-a da ANT(4') e a APH(3') (ELJAALY et al., 2019).

Também existem outros AGs como a arbecacina, um derivado da dibecacina que é efetiva contra as EMAs encontradas em *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e com boa atividade contra *P. aeruginosa* e *Acinobacter spp* (LABBY; GARNEAU-TSODIKOVA, 2013; KRAUSE et al., 2016; KUDO; EGUCHI, 2016). Desta forma, a biossíntese combinatorial dos aminoglicosídeos pode ser uma alternativa para resolver este problema permitindo o desenvolvimento de moléculas mais eficazes.

1.3 Butirosina

A butirosina é um AG obtido a partir de *Bacillus circulans*, com atividade contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (DION; WOO; WILLMER, 1972). A butirosina é um AG 4,5-disubstituído que, em lugar de apresentar uma unidade glicosídica adicional, tem um grupo (S)-4-amino-2-hidroxitirato (AHBA) acoplado ao C-1 do 2-DOS mediante uma ligação amida (**Figura 3**). Na evolução do agrupamento gênico da butirosina, a perda da capacidade de biossíntese da molécula de açúcar pode ter acontecido durante a transferência horizontal de um agrupamento para a neomicina de um actinomiceto para o filo dos firmicutes (ARYA, 2007).

A presença do grupo AHBA torna a butirosina um antibiótico bastante interessante pela evidência de causar insensibilidade frente a ação de algumas EMAs (LI et al., 2005). AHBA já foi inserido na posição C-1 da canamicina e dibecacina que derivou na amicacina e arbecacina. O C-1 é um alvo frequente das *N*-acetiltransferases e a adição do grupo AHBA evita a sua ação (LI et al., 2005; ARYA, 2007). Entre todos os AGs disponíveis, a amicacina é o que apresenta melhor capacidade de evitar os diferentes mecanismos das EMAs; porém já foi reportada resistência a este antibiótico em espécies como *Klebsiella pneumoniae* (RAMIREZ; TOLMASKY, 2017). Isso demonstra a importância das aproximações semissintéticas para a criação de AGs mais eficientes no combate aos diferentes mecanismos de resistência anteriormente mencionados.

A biossíntese do grupo AHBA ocorre a partir de uma molécula de L-glutamato e envolve a ação de enzimas codificadas por 7 genes (*btrI*, *btrK*, *btrG*, *btrH*, *btrO*, *btrJ* e *btrV*) que não são encontrados em nenhum outro agrupamento gênico (**Figura 4**) (LLEWELLYN; LI; SPENCER, 2007). O mecanismo de biossíntese acontece da seguinte maneira (**Figura 7**):

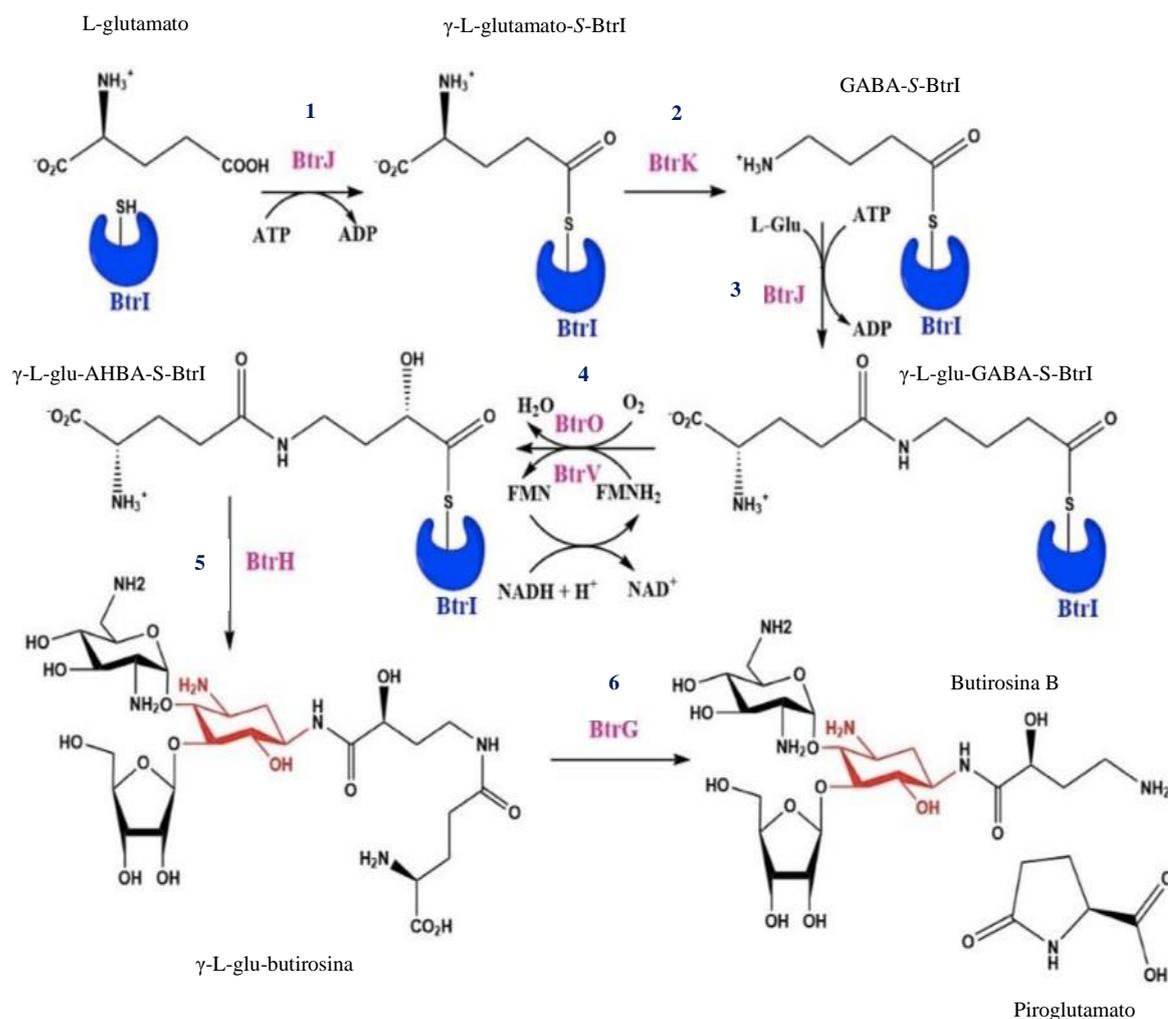


Figura 7. Biossíntese da butirosina B em *Bacillus circulans*.

Em rosa as enzimas encarregadas da biossíntese, em azul a BtrI, em vermelho o ciclitol 2-DOS. (1) Ligação entre o L-glutamato e a holo-BtrI mediada pela BtrJ. (2) Descarboxilação do γ -aminobutirato-S-BtrI pela BtrK. (3) Ligação de outra molécula de L-glutamato. (4) Hidroxilação do γ -L-glu-GABA-S-BtrI pelo sistema mono-oxigenase BtrO/BtrV. (5) Ligação do intermediário γ -L-glu-AHBA-S-BtrI à ribostamicina pela ação da BtrH. (6) Desproteção do γ -glutamyl-AHBA pela BtrG gerando o produto butirosina B e piroglutamato. Imagem adaptada de Llewellyn et al., 2017 e Li et al., 2005.

1. Primeiramente ocorre a atuação de uma ligase dependente de ATP, BtrJ, que catalisa a ligação de uma molécula de L-glutamato à PCP BtrI, que está em sua conformação *holo*, ou seja, na presença do seu grupo prostético 4'-fosfopantetenina (4'PP) (derivado da coenzima A) (LAMBALOT; WALSH, 1995). O produto desta reação é o intermediário biossintético γ -L-glutamato-S-BtrI.
2. Posteriormente, acontece uma descarboxilação no carbono α ($C\alpha$) pela descarboxilase BtrK para produzir uma molécula de γ -aminobutirato-S-BtrI (GABA-S-BtrI).

3. Uma segunda molécula de L-glutamato é adicionada ao intermediário anterior, novamente pela BtrJ, para formar uma molécula de γ -L-glu-GABA-S-BtrI.
4. Uma posterior hidroxilação do C α é feito pelo sistema mono-oxigenase BtrO/BtrV. A BtrV catalisa a redução da flavina mononucleótido (FMN) usando NAD(P)H como doador de elétrons e a BtrO adiciona uma hidroxila no substrato na presença de FMNH₂ e O₂. Essa reação gera como produto o γ -L-glu-AHBA-S-BtrI.
5. A transferência do γ -L-glu-AHBA-S-BtrI para a ribostamicina é realizado pela aciltransferase BtrH.
6. Um último processo de desproteção do grupo γ -glutamil-AHBA é feito pela ciclotransferase BtrG que gera como produto a butirosina B e a liberação de uma molécula de piroglutamato.

Graças ao estudo do grupo de Li e colaboradores, 2005, foi possível esclarecer os mecanismos das diferentes enzimas para a biossíntese do grupo AHBA. Inicialmente, pensava-se que a BtrJ seria responsável pela ligação entre o grupo AHBA e a molécula de ribostamicina, mas quando esta foi incubada na presença de ATP e Mg⁺², não foi possível detectar a presença de butirosina. Assim, foi deduzido que a sua participação estava associada à ativação de um precursor carboxila e à transferência do acil-S-BtrI para a *holo*-BtrI. Uma posterior incubação da reação da BtrJ com a BtrK revelou um produto com maior massa do que o esperado, o que levou à hipótese que, após a descarboxilação mediada pela BtrK, acontece a ligação de uma segunda molécula de L-glutamato realizada pela BtrJ. Assim, o intermediário γ -L-glu-GABA-S-BtrI seria o verdadeiro substrato do sistema mono-oxigenase BtrO/BtrV e não GABA-S-BtrI como era pensado anteriormente. A BtrI tem um papel muito relevante, pois funciona como plataforma na qual acontecem as modificações do L-glutamato e dos diferentes intermediários.

Um segundo estudo de Llewellyn e colaboradores, 2007, permitiu esclarecer a segunda parte da biossíntese da butirosina, na qual acontece a transferência e desproteção do grupo AHBA. A enzima BtrH foi caracterizada *in vitro* e provou ser uma enzima com atividade 1-N-acetiltransferase catalisando a ligação do γ -L-Glu-AHBA ao 2-DOS da butirosina, enquanto a enzima BtrG realiza a desproteção do γ -L-Glu-AHBA para produzir butirosina B e piroglutamato. As enzimas BtrH e BtrG podem atuar sobre outros AGs 4,5-disubstituídos como a paromomicina e neomicina, mas não 4,6-disubstituídos como canamicinas e gentamicinas (LLEWELLYN; LI; SPENCER, 2007; LLEWELLYN; SPENCER, 2008), o que representa uma utilidade no uso destas enzimas para a produção de novos AGs.

Porém, não há informações sobre as características estruturais destas enzimas, apesar de estudos funcionais já terem sido realizados. Assim, um melhor entendimento estrutural delas poderia ajudar com a geração de moléculas de AGs modificadas que sejam mais efetivas frente a bactérias multi-resistentes. Embora a enzima BtrK já apresente uma estrutura resolvida no Protein Data Bank PDB (entrada 2J66) de 2006, não há qualquer relato de sua descrição estrutural na literatura. Um estudo detalhando da mesma ainda é necessário para entender os mecanismos de descarboxilação nos passos iniciais da biossíntese do grupo AHBA.

5 CONCLUSÃO

Foi determinada a estrutura da BtrK na presença do seu cofator PLP. Na unidade assimétrica existe um único protômero embora a proteína seja um dímero obrigatório em solução. O protômero contém 2 domínios, um N-terminal com um enovelamento tipo barril TIM que é altamente conservado e um C-terminal constituído por um β sanduíche. A interação entre eles permite a dimerização da enzima. Resíduos dos dois domínios e das duas cadeias ajudam na conformação do sítio ativo. O PLP liga-se covalentemente com um resíduo de lisina (Lys49) mediante a formação de uma base Schiff. Resíduos como a Tyr187(A) e a Glu269(A) ajudam na estabilização do cofator mediante um empilhamento dos anéis aromáticos e na retirada de elétrons do anel. Embora o substrato real da enzima seja o intermediário γ -L-glutamato-S-BtrI, que consiste em uma molécula de L-glutamato ligada à *holo*-BtrI, realizou-se uma simulação da possível interação do L-glutamato no sítio ativo. O ligante não interage diretamente com o PLP, mas faz ligações com os resíduos Tyr375(A) e Thr190 que podem estabilizar a posição do substrato no bolsão catalítico.

Apesar de várias tentativas de resolução da estrutura da BtrJ, não foi possível obter dados com um sinal anômalo para a determinação da fase utilizando a técnica de incorporação de metais pesados por *soaking*. Para a determinação da fase, também foi realizada a incorporação de SeMet e foram obtidos cristais promissores. Ainda, se espera continuar esse experimento pois a BtrJ, por tratar-se de um novo tipo de enzima capaz de ativar grupos carboxila de resíduos como o L-glutamato e catalisar a ligação com proteínas carreadoras de peptidil (PCP), resulta um alvo interessante de estudo.

Mediante ensaios de DSF, obtiveram-se resultados sobre uma possível interação entre a BtrJ e o seu substrato L-glutamato onde pode inferir-se a necessidade da presença da *holo*-BtrI para a formação de um complexo estável.

As análises dos mecanismos e ligações das diferentes enzimas têm implicações biológicas muito relevantes desde que é possível estudar se têm a capacidade para reconhecer outros substratos ou para a criação de enzimas híbridas que permitam a constituição de moléculas mais efetivas.

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, P. D. et al. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 94–106, 2011.
- AFONINE, P. V et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 68, n. Pt 4, p. 352–367, 2012.
- ARYA, D. P. **Aminoglycoside Antibiotics. For Chemical Biology to Drug Discovery**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2007.
- BANDLA, S. et al. ATPase activity of human binding immunoglobulin protein (BiP) variants is enhanced by signal sequence and physiological concentrations of Mn²⁺. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 8, p. 1355–1369, 2019.
- BITER, A. B. et al. DSF Guided Refolding As A Novel Method Of Protein Production. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.
- BRYLINSKI, M. Aromatic interactions at the ligand-protein interface: Implications for the development of docking scoring functions. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 91, n. 2, p. 380–390, 2018.
- BURY, P. D. S. et al. Structural Basis of the Selectivity of GenN, an Aminoglycoside N-Methyltransferase Involved in Gentamicin Biosynthesis. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 11, p. 2779–2787, 2017.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 12–21, 2010.
- CIMPERMAN, P. et al. A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 7, p. 3222–3231, 2008.
- CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. v. 24, n. 12, p. 1541–1550, 2006.
- DESSAU, M. A.; MODIS, Y. Protein crystallization for X-ray crystallography. **Journal of Visualized Experiments**, v. 9, n. 47, p. 1–6, 2010.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. p. 303–336, 2012.
- DION, H.; WOO, P.; WILLMER, N. Butirosin, a new aminoglycosidic antibiotic complex: isolation and characterization. **Antimicrobial agents**, v. 2, n. 2, p. 89–94, 1972.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

DU, Y. L.; RYAN, K. S. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 3, p. 430–457, 2019.

EDSON, R. S.; TERRELL, C. L. The Aminoglycosides. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 5, p. 519–528, 1999.

ELIOT, A. C.; KIRSCH, J. F. Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 383–415, 2004.

ELJAALY, K. et al. Plazomicin: A Novel Aminoglycoside for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v. 79, n. 3, p. 243–269, 2019.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126–2132, 2004.

EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 62, n. Pt 1, p. 72–82, 2006.

GAO, K.; OERLEMANS, R.; GROVES, M. R. Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. **Biophysical Reviews**, v. 12, n. 1, p. 85–104, 2020.

GRISHIN, N. V. et al. X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: The native structure and the structure in complex with α difluoromethylornithine. **Biochemistry**, v. 38, n. 46, p. 15174–15184, 1999.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 4, n. 2, p. 155–161, 1990.

HAGEMANS, D. et al. A script to highlight hydrophobicity and charge on protein surfaces. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 2, 13 out. 2015.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. v. 13, n. October, 2008.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 125–132, 2010.

KILGOUR, S. L. et al. A Light-Activated Acyl Carrier Protein “Trap” for Intermediate Capture in Type II Iterative Polyketide Biocatalysis. **Chemistry - A European Journal**, v. 25, n. 72, p. 16515–16518, 2019.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3249–3256, 2000.

KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides : An Overview. p. 1–18, 2016.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774–797, 2007.

KUDO, F. et al. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine by three crucial enzymes in *Streptomyces fradiae* NBRC 12773. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 12, p. 766–774, 2005.

KUDO, F.; EGUCHI, T. **Chapter 20: Biosynthetic Enzymes for the Aminoglycosides Butirosin and Neomycin**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009a. v. 459

KUDO, F.; EGUCHI, T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 9, p. 471–481, 2009b.

KUDO, F.; EGUCHI, T. Aminoglycoside Antibiotics : New Insights into the Biosynthetic Machinery of Old Drugs. p. 4–18, 2016.

LABBY, K. J.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1285–1309, 2013.

LAMBALOT, R. H.; WALSH, C. T. Cloning, overproduction, and characterization of the *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24658–24661, 1995.

LI, M. X.; CORSON, D. C.; SYKES, B. D. Isotope Labeling. **Encyclopedia of Biophysics**, v. 173, n. 3, p. 1161–1161, 2013.

LI, Y. et al. Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: Possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein-mediated pathway. **Chemistry and Biology**, v. 12, n. 6, p. 665–675, 2005.

LIANG, J. et al. Current advances on structure-function relationships of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. MAR, 2019.

LLEWELLYN, N. M.; LI, Y.; SPENCER, J. B. Biosynthesis of Butirosin: Transfer and Deprotection of the Unique Amino Acid Side Chain. **Chemistry & Biology. Cell Press**, v. 14, n. April, p. 379–386, 2007.

LLEWELLYN, N. M.; SPENCER, J. B. Chemoenzymatic acylation of aminoglycoside antibiotics. **Chemical Communications**, n. 32, p. 3786–3788, 2008.

MCCOY, A. J.; READ, R. J. Experimental phasing: Best practice and pitfalls. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 4, p. 458–469, 2010.

MODAK, R.; SINHA, S.; SUROLIA, N. Isothermal unfolding studies on the apo and holo forms of *Plasmodium falciparum* acyl carrier protein: Role of the 4'-phosphopantetheine group in the stability of the holo form of *Plasmodium falciparum* acyl carrier protein. **FEBS Journal**, v. 274, n. 13, p. 3313–3326, 2007.

MURSHUDOV, G. N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 67, n. Pt 4, p. 355–367, 2011.

NGUYEN, H. et al. Post-PKS Tailoring Steps of the Spiramycin Macrolactone Ring in *Streptomyces ambofaciens*. v. 57, n. 8, p. 3836–3842, 2013.

NI, J. et al. Hyperconjugation promoted by hydrogen bonding between His98/His241 and a carboxyl group contributes to tyrosine decarboxylase catalysis. **Catalysis Science and Technology**, v. 9, n. 22, p. 6222–6226, 2019.

PHAM, J. et al. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Biologics. Front. Microbiol**, v. 10, p. 1404, 2019.

POPOVIC, B. et al. Crystal Structures of the PLP- and PMP-Bound Forms of BtrR, A Dual Functional Aminotransferase Involved in Butirosin Biosynthesis. **PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 65, p. 220–230, 2006.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2010.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. **Molecules**, v. 22, n. 12, 2017.

RAY, S. S. et al. Cocrystal Structures of Diaminopimelate Decarboxylase. **Structure**, v. 10, n. 11, p. 1499–1508, 2003.

RAYCHAUDHURI, S. et al. Backbone makes a significant contribution to the electrostatics of α/β -barrel proteins. **Protein Science**, v. 6, n. 9, p. 1849–1857, 1997.

RUPP, B. **Biomolecular Crystallography. Principles, Practice, and Application to Structural Biology**. [s.l.] Garland Science, 2010.

SAGONG, H. Y. et al. Crystal structure and pyridoxal 5-phosphate binding property of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2016.

SCAPIN, G. Molecular replacement then and now. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 11, p. 2266–2275, 2013.

SCHNEIDER, G.; KÄCK, H.; LINDQVIST, Y. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. **Structure**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2000.

SEELIGER, D.; DE GROOT, B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 5, p. 417–422, 2010.

TIBREWAL, N.; TANG, Y. **Biocatalysts for Natural Product Biosynthesis**. 2014.

TIWARI, S. P.; REUTER, N. Similarity in Shape Dictates Signature Intrinsic Dynamics Despite No Functional Conservation in TIM Barrel Enzymes. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 3, p. 1–26, 2016.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 22–25, 2010.

VANDUYNE, G. D. **Protocol for SeMet incorporation by metabolic inhibition**, 1993. .

WALSH, C. T. Antibiotics: Actions, origins, resistance. v. 95, n. Walsh 1998, p. 3059–3060, 2003.

WANG, S. C.; FREY, P. A. S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 101–110, 2007.

WIERENGA, R. K. The TIM-barrel fold: A versatile framework for efficient enzymes. **FEBS Letters**, v. 492, n. 3, p. 193–198, 2001.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 67, n. Pt 4, p. 235–242, 2011.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery 1. **Research Press**, v. 60, p. 147–154, 2014.

WU, T. et al. Three Essential Resources to Improve Differential Scanning Fluorimetry (DSF) Experiments. 2020.

YOKOYAMA, K. et al. Involvement of two distinct N-acetylglucosaminyltransferases and a dual-function deacetylase in neomycin biosynthesis. **ChemBioChem**, v. 9, n. 6, p. 865–869, 2008.

ZHANG, L.; DEMAINE, A. L. Natural products and drug discovery. In: **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**. [s.l.] Humana Press, 2005. p. 3–29.